



ANÁLISE DAS MEMBRANAS PLACENTÁRIAS HUMANA APÓS PROCESSO DE OZONIZAÇÃO POR SISTEMA FLUÍDO HIDRODINÂMICO

Melissa Zuccolotti Soares; Jessica Sthefanny Carvalho Souza; Pedro Augusto Laurindo Marrafa; Bianca Akemi Kawata; Carlos José de Lima; Dr^a Adriana Barrinha Fernandes.

Universidade Anhembi Morumbi
adrianamorett@ulife.com.br

Introdução

A placenta humana é um órgão em forma de disco composto por componentes fetais e maternos. Os componentes fetais incluem o disco placentário, as membranas amniótica e coriônica (frequentemente referidas como membranas fetais), Devido às diversas propriedades biológicas, a membrana amniótica humana (MAh) tem sido usada atualmente como um produto de base biológica muito promissor na prática clínica, especialmente na oftalmologia e no tratamento de uma ampla variedade de condições patológicas, como no manejo das queimaduras, como curativo temporário ou de longo prazo, como material de enxerto sobre úlceras de pele, em artroplastia e cirurgia reconstrutiva (EDQM, 2017; JIRSOVA; JONES, 2017; KHOSRAVIMELAL et al. 2020; KOLLER; ORSAG, 2006; MERMET et al., 2007). A membrana coriônica (ACM) também é muito popular nesta indicação porque proporcionam não apenas melhor manuseio e espessura, mas também fornecem fatores de crescimento intrínsecos, bem como benefícios para a cicatrização de feridas em várias áreas de reconstrução oral (FENELON et al., 2018). A inativação de microrganismos pode ser realizada por métodos físicos ou químicos. O ozônio dissolvido em água é uma excelente promissora opção com maior eficácia que o hipoclorito no controle de microrganismos, na desinfestação e desinfecção de superfícies e alimentos, pois possui uma forte ação contra bactérias, cistos de protozoários, vírus, fungos e esporos de fungos (MAXIMIANO, 2017).

Objetivos

Analisar as membranas placentárias humanas após processo de ozonização e as possíveis alterações morfológicas e bioquímicas decorrentes do processamento de ozonização das membranas placentárias humana, por meio de histologia, MEV, FT-IR e perfilometria óptica.

Metodologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Anhembi Morumbi aprovou a realização do estudo (parecer nº 3.984.423, CAAE:289370020.0.0000.5492). conforme determina as Normas Técnicas para o funcionamento dos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário segundo a Resolução - RDC nº 190, de 18 de julho de 2003. O material será coletado na Santa Casa de Misericórdia de Pindamonhangaba. Na sequência o material será acondicionado em um recipiente de vidro imerso em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e o recipiente contendo o material e esta solução acondicionados em um recipiente térmico refrigerado a uma temperatura de 10 a 15°C e transportado ao Laboratório de Biotecnologia do Centro de Inovação, Tecnologia e Educação – CITÉ, em São José dos Campos.

Lavagem das membranas placentárias

As membranas placentárias serão lavadas manualmente por 10 vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril para remoção dos resíduos biológicos tais como sangue e líquido amniótico, e na sequência segmentadas e fixadas com adesivo à base de cianoacrilato em um porta-amostra retangular confeccionada em chapa de aço inoxidável.

Protocolo para desinfecção das amostras das membranas placentárias

As amostras das membranas placentárias, após o processo de lavagem serão cortadas com lâmina estéril de bisturi em fragmentos de aproximadamente 2 cm de largura e 5 cm de comprimento e submetidas ao processo de ozonização por fluido hidrodinâmico em protocolos de 15 e 40 minutos (Awoyama et al., 2022; Botelho et al., 2024).

Análise da superfície das membranas placentárias por meio de Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fixação das amostras biológicas após as diferentes etapas de desinfecção será realizada por imersão, imediatamente após a coleta. As amostras de membranas serão analisadas por MEV, para tal será empregada uma solução fixadora contendo glutaraldeído 25% em tampão fosfato 0,2 M e água destilada. Após a fixação, as amostras serão mantidas de 2 a 8 °C, sendo que o tempo mínimo de fixação de uma semana. Após a desidratação o material será metalizado por uma metalizadora da marca Denton Vacuum Desk II com o intuito de tornar o material condutivo por meio de deposição de um metal, no caso ouro, sobre a amostra. As amostras montadas sobre stubs, identificadas e acondicionadas em caixa apropriada para visualização no microscópio eletrônico de varredura modelo VEJA 3 LMU, marca Tecsán.

Análise da superfície das membranas placentárias por meio de FT- IR

A utilização da espectroscopia de FTIR para análise das membranas placentárias que foi submetida a protocolos de desinfecção/esterilização será realizada através de um espectrômetro FTIR, operando no infravermelho próximo, com acessório de reflexão, varredura com 1 de ganho para 20 scans e resolução do espectrógrafo de 2 cm⁻¹ sendo que sua banda espectral útil se encontra na região de 4000-500 cm⁻¹.

Análise por Perfilometria Óptica

Para as análises de perfilometria em superfície dos itens, serão realizadas com o microscópio óptico interferométrico WYKO NT1100 (Veeco Instruments Inc., EUA), o qual permite a obtenção de imagens tridimensionais e medidas quantitativas de rugosidade com alta precisão (Figura 10). As amostras foram preparadas em triplicata, incluindo cones de GP in natura e aqueles expostos ao sistema hidrodinâmico com água ozonizada por sete minutos. A análise da rugosidade foi realizada utilizando o método de perfil único.

Análise por Histologia

As amostras serão fixadas com solução de formol 10% e em seguida passaram pelos processos para desidratação, diafanização, impregnação e inclusão da amostra em bloco de parafina. O material foi cortado por micrótomo rotativo e corado com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram visualizadas em um microscópio óptico (TNB-01T, Anatomic, Brazil) e as imagens obtidas a partir de software TCapture®

Resultados

Os resultados esperados são que a ozonização das membranas placentárias não cause alterações estruturais significativas no biomaterial, sendo que a integridade do scaffold seja preservada para um possível uso como curativo biológico.

Conclusões

O presente estudo está na fase de execução dos protocolos experimentais. Contudo, espera-se com o estudo identificar possíveis alterações nas membranas placentárias decorrentes do processo de ozonização.

Bibliografia

AWOYAMA, Sílvia Móbille et al. Disinfection of Human Amniotic Membrane Using a Hydrodynamic System with Ozonated Water. **Ozone: Science & Engineering**, p. 1- 13, 2022.
BOTELHO, Túlia et al. Sterilization of Human Amniotic Membrane Using an Ozone Hydrodynamic System. **Annals of Biomedical Engineering**, p. 1-10, 2024.
FÉNELON, Mathilde et al. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. **Membranes**, v.11, n.6,p.01-27, 2021.
LIMA, Manoel JA; FELIX, Erika P.; CARDOSO, Arnaldo A. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. **Química Nova**, v. 44, n. 09, p. 1151-1158, 2021.
MERMET, Isabelle et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v.15, n. 4, p.459-464.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Instituto Ânima pelo apoio à pesquisa realizada.