

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada
Mestrado Profissional

Sara Ellen Costa Silva Reis

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE MEMBRANA
AMNIÓTICA HUMANA DESIDRATADA CONTRA *Pseudomonas aeruginosa***

Belo Horizonte
2025

Sara Ellen Costa Silva Reis

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE MEMBRANA
AMNIÓTICA HUMANA DESIDRATADA CONTRA *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Caio Tavares Fagundes

Belo Horizonte
2025

043

Reis, Sara Ellen Costa Silva.

Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de membrana amniótica humana desidratada contra *Pseudomonas aeruginosa* [manuscrito] / Sara Ellen Costa Silva Reis. – 2025.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Caio Tavares Fagundes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada.

1. Microbiologia. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Âmnio. 4. Biofilmes. 5. Peptídeos Antimicrobianos. 6. Ciprofloxacina. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
MESTRADO PROFISSIONAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA
DESIDRATADA CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*”**

SARA ELLEN COSTA SILVA REIS

Matrícula 2023661000

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA APLICADA - MESTRADO PROFISSIONAL, área de concentração Microbiologia Aplicada, linha de pesquisa Diagnóstico Microbiológico e Epidemiologia, como requisito para a obtenção do grau de MESTRE EM MICROBIOLOGIA.

Aprovada em 10 de dezembro de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dra. Camila Pacheco Silveira Martins da Mata

Hospital Risoleta Tolentino Neves, (HRTN)

Prof. Santiago Martin Lattar

Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

Prof- Caio Tavares Fagundes- Orientador

Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Vera Lucia dos Santos
Subcoordenadora

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Santiago Martin Lattar, Professor do Magistério Superior**, em 11/12/2025, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 11/12/2025, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia dos Santos, Servidor(a)**, em 06/01/2026, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Pacheco Silveira Martins da Mata, Usuário Externo**, em 24/01/2026, às 21:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4814384** e o código CRC **28EEAC85**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder força e capacidade para perseguir e alcançar meus objetivos.

Agradeço principalmente a minha mãe, Elba, por estar presente comigo em todos os momentos, alegrias, dificuldades e aprendizados. Obrigada por sempre segurar a minha mão e me aconselhar com tanto amor. Sem você, eu não teria conseguido superar os desafios dos últimos anos. Nunca conheci alguém com o coração tão puro igual ao seu.

Ao meu pai Cláudio (*in memoriam*), que sempre me ensinou a importância dos estudos, e que, com dedicação podemos alcançar os nossos sonhos.

Aos meus irmãos, Gabriel e Raquel, agradeço pela presença constante, pela união e pelo carinho que tornam a caminhada da vida mais leve. Vocês são os maiores presentes que meus pais me deram.

Ao meu orientador Caio Tavares, minha gratidão por toda a paciência, conhecimento, orientação e ensinamentos que com certeza irei levar para o resto da minha vida.

Aos meus amigos, especialmente a Gabriela e Guilherme, e meu companheiro Rayan, por sempre se preocuparem comigo e me ajudarem a criar forças para lidar com a rotina intensa de trabalho e estudos.

Ao pessoal do Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro e do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos por todo apoio técnico e conhecimento compartilhado. Em especial ao Carlos e a Cíntia por todo aprendizado e apoio.

À Mediphacos e à ISP Surgical, pela cessão das amostras utilizadas no estudo.

A UFMG e ao Instituto de Ciências Biológicas por me conceder a oportunidade de adquirir tamanho conhecimento desde a minha graduação e tornarem possível essa conquista.

RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista classificado como prioritário pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em razão de seus múltiplos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e elevada virulência. A membrana amniótica humana (MA) tem se destacado por suas propriedades regenerativas e por possuir atividade antimicrobiana intrínseca. O objeto deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme da membrana amniótica humana desidratada (AmnioTek™), tanto isolada (MA) quanto impregnada com ciprofloxacino (MA-C), contra um isolado clínico de *P. aeruginosa*. Os objetivos incluíram verificar a atividade antimicrobiana e antibiofilme, avaliar se a impregnação com ciprofloxacino potencializa o efeito e investigar a natureza dos fatores solúveis envolvidos na MA. A metodologia utilizou ensaios de disco-difusão, ensaios de inibição de biofilme (quantificação por cristal violeta) após 24h ou 48h de exposição, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a avaliação do extrato condicionado pela MA (EXT-MA), tratado ou não com Proteinase K (PK). Os resultados do ensaio de disco-difusão mostraram atividade antimicrobiana significativamente maior para MA-C e Ciprofloxacino (CIPRO) em comparação com a MA isolada. Contudo, nos ensaios em meio líquido, a MA, MA-C e CIPRO demonstraram capacidade semelhante de inibir tanto o crescimento de células planctônicas quanto a formação de biofilme, além de atuar sobre biofilmes previamente estabelecidos. O extrato EXT-MA demonstrou atividade antimicrobiana e antibiofilme, que foi significativamente reduzida após o tratamento com PK, indicando que a ação é dependente de componentes de origem proteica da MA. A MEV confirmou a integridade estrutural da MA e revelou alterações morfológicas nas bactérias e lise celular, além da formação de biofilme na superfície da MA. Conclui-se que a membrana amniótica desidratada AmnioTek™ possui atividade antimicrobiana e antibiofilme intrínseca contra *P. aeruginosa*, mediada por componentes proteicos solúveis. Essa atividade não foi significativamente potencializada pela impregnação com ciprofloxacino em meio líquido, sugerindo que a membrana amniótica desidratada possui potencial para uso como terapia adjuvante a antimicrobianos convencionais no manejo e prevenção de infecções.

Palavras-chaves: Membrana amniótica humana; *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilme; Peptídeos antimicrobianos; Ciprofloxacino.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen classified as a priority by the World Health Organization (WHO) due to its multiple mechanisms of antimicrobial resistance and high virulence. The human amniotic membrane (AM) has stood out for its regenerative properties and intrinsic antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of dehydrated human amniotic membrane (AmnioTek™), both alone (AM) and impregnated with ciprofloxacin (AM-C), against a clinical isolate of *P. aeruginosa*. The objectives included assessing antimicrobial and antibiofilm activity, determining whether ciprofloxacin impregnation enhances the effect, and investigating the nature of the soluble factors involved in the AM. The methodology employed disk diffusion assays, biofilm inhibition assays (quantification by crystal violet) after 24 h or 48 h of exposure, scanning electron microscopy (SEM), and evaluation of the AM-conditioned extract (EXT-AM), treated or not with Proteinase K (PK). The disk diffusion assay results showed significantly greater antimicrobial activity for AM-C and ciprofloxacin (CIPRO) compared to AM alone. However, in liquid medium assays, AM, AM-C, and CIPRO demonstrated similar ability to inhibit both planktonic cell growth and biofilm formation, as well as to act on previously established biofilms. The EXT-AM extract demonstrated antimicrobial and antibiofilm activity, which was significantly reduced after PK treatment, indicating that the activity depends on protein-derived components of the AM. SEM confirmed the structural integrity of the AM and revealed morphological alterations in bacteria and cell lysis, as well as biofilm formation on the AM surface. It is concluded that dehydrated amniotic membrane AmnioTek™ exhibits intrinsic antimicrobial and antibiofilm activity against *P. aeruginosa*, mediated by soluble protein components. This activity was not significantly enhanced by ciprofloxacin impregnation in liquid medium, suggesting that dehydrated amniotic membrane has potential for use as an adjuvant therapy to conventional antimicrobials in the management and prevention of infections.

Keywords: Human amniotic membrane; *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilm; Antimicrobial peptides; Ciprofloxacin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismos de resistência antimicrobiana em <i>P. aeruginosa</i>	12
Figura 2 - Processo de formação de biofilme	15
Figura 3 - Camadas da Membrana Amniótica Humana	20
Figura 4 - Representação esquemática das três principais fases do reparo tecidual da pele	21
Figura 5 - Tratamento de paciente queimado com membrana amniótica.....	31
Figura 6 - AmnioTek™	38
Figura 7 - Processo esquemático do ensaio de inibição de biofilme	50
Figura 8 - Halos de inibição (mm) obtidos no ensaio de disco-difusão em ágar após 24 horas de incubação.....	54
Figura 9 - Placa de Petri representativa do ensaio de difusão em ágar após 24 horas de incubação.....	54
Figura 10 - Morfologia da membrana amniótica	56
Figura 11 - Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a formação de biofilme sobre a superfície da membrana amniótica (MA) em diferentes condições experimentais.. ..	58
Figura 12 - Células bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> com alterações morfológicas compatíveis com lise.....	59
Figura 13 - Quantificação de células planctônicas em 24 horas.. ..	60
Figura 14 - Aspecto visual dos poços após 24 horas de incubação.	61
Figura 15 - Quantificação da massa de biofilme após 24 horas de incubação.	62
Figura 16 - Quantificação de células planctônicas após 48 horas de incubação (os grupos de intervenção foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano).. ..	63
Figura 17 - Quantificação da massa de biofilme formada após 48 horas de incubação (os grupos de intervenção foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano).	64
Figura 18 - Registro fotográfico da coloração com cristal violeta nos poços da placa de cultivo após 48 horas de incubação (os grupos de intervenção foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano).	65
Figura 19 - Quantificação da massa de biofilme formada após 48 horas de incubação contínua dos grupos experimentais.. ..	66
Figura 20 - Quantificação da massa de biofilme formada após 24 horas de incubação dos grupos experimentais.	68

Lista de Quadros

Quadro 1 – Principais fatores biológicos da membrana amniótica	21
Quadro 2 - Fatores associados às propriedades terapêuticas da membrana amniótica.	26
Quadro 3 - Propriedades terapêuticas da membrana amniótica frente as aplicações clínicas	33
Quadro 4 - Métodos de processamento e efeitos na morfologia, conteúdo biológico da membrana amniótica.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Microgramas	GF – Fatores de crescimento
µL – Microlitros	HBD (β-defensinas) – β-defensinas humanas
AECs – Células epiteliais amnióticas	HBV – Hepatite B
AMP – Peptídeo antimicrobiano	HCV – Hepatite C
AMSCs – Células mesenquimais estromais amnióticas	HGF – Fator de Crescimento de Hepatócitos
ATM – Antimicrobiano	HIV – Vírus da imunodeficiência humana
bFGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico	HLA-G – Antígeno Leucocitário Humano G
CFM – Conselho Federal de Medicina	IDO – Indolamina 2,3-dioxigenase
CIPRO – Ciprofloxacino	IFN – Interferons
CM – Centro de Microscopia	IGF – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
CN – Controle negativo	IGFBP-2, -3, -4 e -6 – Proteína Ligadora do IGF 2, 3, 4 e 6
CONITEC – Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS	IL – Interleucinas
CV – Cristal violeta	IL1-RA – Antagonista do Receptor de Interleucina 1
DMSO – Dimetilsulfóxido	KGF – Fator de Crescimento de Queratinócitos
DO – Densidade óptica	LB – Luria-Bertani
DTT – Ditioneíol	LIMHO – Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro
E. coli – <i>Escherichia coli</i>	LPS – Lipopolissacarídeo
eDNA – DNA extracelular	M/V – Massa por volume
EGF – Fator de Crescimento Epidérmico	MA – Membrana amniótica
EPS – Substâncias poliméricas extracelulares	MA-C – Membrana amniótica impregnada com ciprofloxacina
EXT-MA – Extrato de membrana amniótica	M-CSF – Fator Estimulador de
FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos	
G-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos	

Colônias de Macrófagos

MDR – Multi-droga resistente

MEC – Matriz extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MM – Milímetro

MMP – Metaloproteinases da Matriz Extracelular

N – Número amostral

NGF – Fator de Crescimento Neural

NM – Nanômetros

NT-4 – Neurotrofina-4

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PEDF – Fator Derivado do Epitélio Pigmentar

PGE-2 – Prostaglandina E2

PIA – *Pseudomonas Isolation Agar*

PK – Proteinase K

P/V - Peso por volume

RAM – Resistência antimicrobiana

RPM – Rotações por minuto

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SBQ – Sociedade Brasileira de Queimaduras

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SLPI – Inibidor da Protease Leucocitária Secretada

SUS – Sistema Único de Saúde

TGF – Fator de Crescimento Transformador

TIMP – Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TSP-1 – Trombospondina-1

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

V/V – Volume por volume

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF-R3 – Receptor 3 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

α – Alfa

β – Beta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : características e relevância clínica.....	10
1.2.	A formação de biofilmes bacterianos	14
1.3.	Resistência Antimicrobiana: um alerta global e a busca por novas abordagens terapêuticas	17
1.4.	Membrana Amniótica Humana.....	19
1.5.	Propriedades biológicas da Membrana Amniótica.....	20
1.5.1.	Propriedades antimicrobianas da membrana amniótica.....	27
1.6.	Aplicações clínicas.....	30
1.7.	Processamento e preservação do tecido	34
1.8.	Amniotek	37
1.9.	Regulamentação brasileira frente ao uso de membrana amniótica em humanos.....	38
2.	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO E RELEVÂNCIA CIENTÍFICA.....	39
3.	OBJETIVOS.....	41
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1.	Obtenção da Membrana Amniótica Amniotek™.....	42
4.2.	Dispensa de Aprovação Ética	42
4.3.	Desenho experimental	43
4.3.1.	Preparação das amostras e grupos	43
4.3.2.	Linhagem de Isolado de Espécime Clínico	45
4.3.3.	Ensaio de Disco-Difusão em ágar.....	45
4.3.4.	Análise da formação de biofilme aderido à MA por Microscopia Eletrônica de Varredura 47	
4.3.5.	Ensaio de Inibição de Biofilme	48
4.3.5.1.	Inibição de Biofilme em 24 Horas.....	49
4.3.5.2.	Inibição de Biofilme em 48 Horas.....	50
4.3.5.3.	Inibição de Biofilme com Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica ...	51
4.3.6.	Quantificação de Proteínas	52

4.4.	Análise Estatística	52
5.	RESULTADOS	53
5.1.	Disco-difusão em ágar	53
5.1.1.	Disco-difusão em ágar por 24 Horas	53
5.1.2.	Disco-difusão em ágar durante reexposição a amostras	55
5.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
5.2.1.	Análise morfológica da membrana amniótica	55
5.2.2.	Análise de formação de biofilme na superfície da membrana amniótica	56
5.3.	Ensaio de Inibição Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme após 24 Horas com Membrana Amniótica.....	59
5.3.1.	Quantificação de Células Planctônicas (24 Horas).....	59
5.3.2.	Quantificação da Massa de Biofilme (24 Horas).....	61
5.4.	Inibição de Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme em 48 Horas (membrana amniótica adicionada após 24h de crescimento bacteriano).....	63
5.4.1.	Quantificação de Células Planctônicas (48 horas - membrana amniótica adicionada após 24h de crescimento bacteriano)	63
5.4.2.	Quantificação da Massa de Biofilme (48 horas - membrana amniótica adicionada após 24h de crescimento bacteriano)	64
5.5.	Inibição de Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme Após 48 Horas de Incubação Contínua com Membrana Amniótica	65
5.6.	Quantificação de Proteínas/Peptídeos Presentes no Extrato Condicionado de Membrana Amniótica.....	66
5.6.1.	Inibição de Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme em 24 Horas com Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica	67
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÃO	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*: características e relevância clínica

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete (bacilo) (VASIL, 1986; IDRIS *et al.*, 2023). Essa bactéria pertence ao grupo dos bacilos Gram-negativos não fermentadores, caracterizados pela incapacidade de fermentar carboidratos para obtenção de energia, utilizando predominantemente vias metabólicas oxidativas. Como consequência, esses bacilos apresentam ampla distribuição ambiental, atuando como saprófitos e colonizando preferencialmente nichos úmidos, como água, solo e superfícies vegetais (DI PILATO *et al.*, 2023). Além disso, é considerado de ocorrência ubíqua, sendo capaz de colonizar quase todos os lugares e condições ambientais (LYCZAK *et al.*, 2000; QIN *et al.*, 2022).

No contexto hospitalar, essa característica metabólica contribui para a capacidade de *P. aeruginosa* persistir em reservatórios artificiais, incluindo pias, sistemas de ventilação, nebulizadores, soluções aquosas, dialisato, cateteres e outros dispositivos médicos (DI PILATO *et al.*, 2023; JEYARAMAN *et al.*, 2023). Além disso, os bacilos não fermentadores apresentam, de forma geral, mecanismos intrínsecos de resistência antimicrobiana, fatores que favorecem sua adaptação, sobrevivência prolongada e disseminação em ambientes nosocomiais. Como resultado, as *P. aeruginosa* são oportunistas, reconhecidas por sua facilidade em adquirir resistência a antimicrobianos, devido aos seus diversos mecanismos de resistência inatos e adquiridos (VASIL, 1986; YASIR *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2022; DI PILATO *et al.*, 2023; IDRIS *et al.*, 2023; PINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023).

Desse modo, em relação as infecções nosocomiais, *P. aeruginosa* é reconhecida como um dos principais agentes etiológicos da pneumonia associada à ventilação mecânica, uma complicação comum em pacientes submetidos à ventilação invasiva em unidades de terapia intensiva. Estudos clínicos e experimentais relatam que *P. aeruginosa* compõe uma proporção importante dos isolados em pneumonia associada à ventilação mecânica e está associada a maiores taxas de persistência bacteriana, lesão pulmonar e morbidade e mortalidade nesses pacientes (ROCHA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2024).

Também, outras infecções humanas mais relevantes causadas por *P. aeruginosa* são: bacteremia em pacientes com queimaduras severas; infecções pulmonares crônicas em indivíduos com fibrose cística; e ceratite ulcerativa aguda da córnea em pessoas que utilizam lentes de contato gelatinosas de uso prolongado (LYCZAK *et al.*, 2000).

Em relação as patologias oftalmológicas causadas por microrganismos, uma revisão de série de casos realizada por Danielescu *et al.* (2020) relatou que os organismos Gram-negativos mais frequentes em endoftalmites foram *Pseudomonas* sp. Somado a isso, Urwin e colegas (2020) concluem que as espécies bacterianas mais comumente responsáveis pela ceratite bacteriana incluem *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que também são os dois patógenos mais proeminentemente associados a feridas crônicas (WOLCOTT *et al.*, 2016)

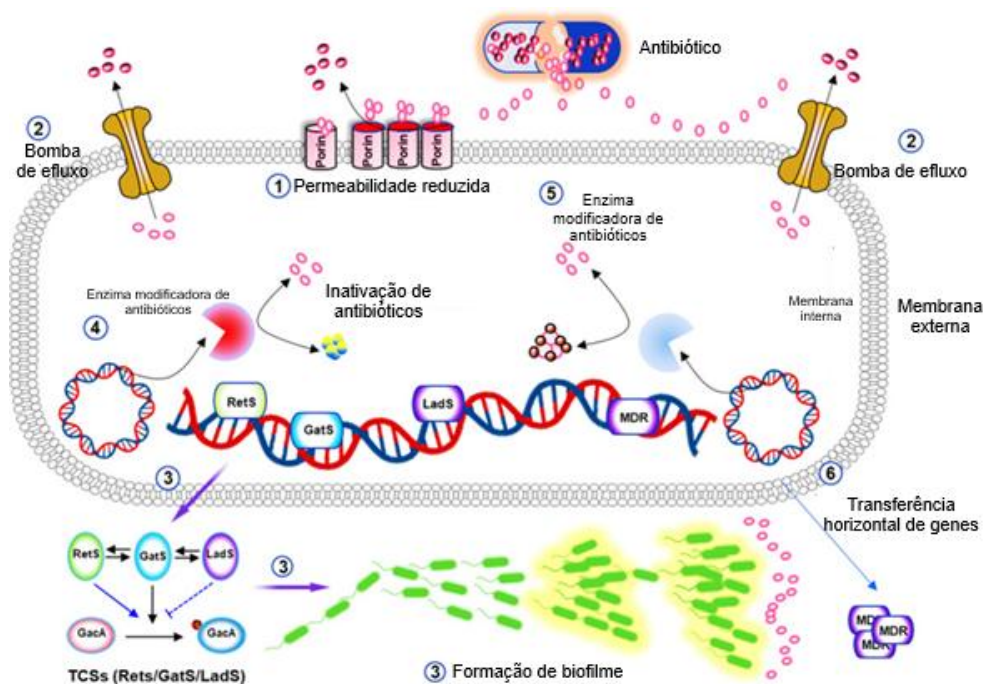
A emergência de linhagens multirresistentes representa uma ameaça significativa à saúde pública a nível global (QIN *et al.*, 2022; PINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023). *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos está entre os 10 patógenos prioritários para a saúde pública, de acordo com a lista atualizada pela OMS em 2024, que visa orientar pesquisas e estratégias para o controle e prevenção da resistência antimicrobiana (OMS, 2024).

Os mecanismos inatos de resistência comuns dessa espécie incluem bombas de efluxo, que são capazes de expelir os fármacos diretamente para fora da célula (YONEYAMA *et al.*, 1991; WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999; LLANES *et al.*, 2004; AENDEKERK *et al.*, 2005; QIN *et al.*, 2022; PINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023); baixa permeabilidade da membrana externa, levando a diminuição da penetração de fármacos (YONEYAMA *et al.*, 1991; WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999; QIN *et al.*, 2022; PINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023), e enzimas inativadoras ou modificadoras de antimicrobianos, tornando-os inativos e incapazes de se ligar ao seu alvo (WRIGHT, 2005; QIN *et al.*, 2022).

Já os mecanismos adquiridos podem surgir por meio de suas altas taxas de mutações cromossômicas, plasticidade genômica e transferência horizontal de genes, levando esse patógeno a apresentar uma alta capacidade adaptativa (WINSTANLEY *et al.*, 2016; DIORIO-TOTH *et al.*, 2022; QIN *et al.*, 2022; PINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023).

Além disso, possuem o mecanismo de comunicação por *quorum sensing*, que atua como um sistema regulatório global das bactérias para comunicação em massa célula-célula, controlando direta ou indiretamente a expressão dos genes, a produção e a secreção de fatores associados à virulência (CHAPON-HERVÉ *et al.*, 1997; DAVIES *et al.*, 1998; AENDEKERK *et al.*, 2005; DUAN & SURETTE, 2007; RUTHERFORD *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2022). As moléculas de sinalização de *quorum sensing* também contribuem para a formação de biofilmes (DAVIES *et al.*, 1998; DUAN & SURETTE, 2007; RUTHERFORD *et al.*, 2012; QIN *et al.*, 2022).

Figura 1 - Mecanismos de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*. Representando os mecanismos intrínsecos de resistência: ① permeabilidade da membrana externa, ② sistemas de efluxo e ④ enzimas modificadoras ou ⑤ enzimas inativadoras de antimicrobianos. Representando os mecanismos adaptativos de resistência: ③ resistência mediada por biofilme. Representando os mecanismos adquiridos de resistência: ⑥ resistência por mutações e aquisição de genes de resistência por meio de transferência horizontal.



Fonte: Qin *et al.*, *Signal transduction and targeted therapy*, 2022 (adaptado)

Em geral, *P. aeruginosa* possui diversos fatores de virulência, incluindo pigmentos, sideróforos (pioverdina), toxinas, proteases, endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS), sistemas de secreção, proteínas da membrana externa, urease, pili, fimbrias, flagelos e sua capacidade de formar biofilmes (VASIL, 1986; LYCZAK *et al.*, 2000; QIN *et al.*, 2022; PINA-SÁNCHEZ *et al.*, 2023), que lhe permite colonizar e infectar diversos tipos de tecidos de mamíferos (VASIL, 1986; LYCZAK *et al.*, 2000).

Devido a esses diversos mecanismos de resistência e virulência, *P. aeruginosa* faz parte do grupo de patógenos multi-droga resistentes (MDR) incluídos no acrônimo “ESKAPE”, acrônimo para: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* (QIN *et al.*, 2022; IDRIS *et al.*, 2023). Esses patógenos representam uma grande preocupação devido à sua propensão a resistência a antibióticos e outros medicamentos, além de sua capacidade de causar infecções graves, aumento da morbidade e mortalidade (IDRIS *et al.*, 2023).

O ciprofloxacino é um antimicrobiano pertencente à classe das fluoroquinolonas e é reconhecido como a fluoroquinolona mais eficaz contra *P. aeruginosa*, sendo utilizado no tratamento de diversas infecções causadas por essa bactéria, como a bacteremia, osteocondrite, infecções oculares e auriculares, otite externa maligna e outras (REHMAN *et al.*, 2019). As quinolonas atuam de forma específica ao interferirem na síntese de DNA, causando a morte das células bacterianas por fragmentação do material genético. Elas conseguem atravessar a parede celular através das porinas e inibem diretamente o processo de replicação do DNA bacteriano (ROCHA *et al.*, 2019). Seu princípio de operação envolve a inibição de ambas as topoisomerases do tipo II do DNA – a DNA girase e a topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação e o reparo do DNA bacteriano (PENG *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2019).

Contudo, conforme mencionado anteriormente, *P. aeruginosa* apresenta uma elevada tendência à resistência antimicrobiana. A resistência ao ciprofloxacino em *P. aeruginosa* é principalmente gerada por mutações na topoisomerase IV ou pela superexpressão de uma bomba de efluxo bacteriana codificada cromossomicamente, resultando no aumento da expulsão de ciprofloxacino da célula bacteriana (YASIR *et al.*, 2020). Outro estudo relatou que a resistência de alto nível à ciprofloxacina está associada à bomba de efluxo *mexCD-oprJ* e à regulação negativa do sistema de *quorum sensing* (PENG *et al.*, 2017).

Portanto, a identificação de novas abordagens terapêuticas e o avanço no desenvolvimento de tratamentos eficazes contra *P. aeruginosa*, como a fagoterapia, nanopartículas, imunoterapia, edição genética, peptídeos antimicrobianos e vacinas, são de fundamental importância (QIN *et al.*, 2022).

Uma estratégia alternativa que está sendo investigada envolve o uso de terapias combinadas, nas quais o ciprofloxacino é administrado junto com outro antimicrobiano eficaz contra *Pseudomonas*. Essas terapias combinadas oferecem uma opção promissora em relação ao uso de antimicrobianos de forma isolada, pois podem diminuir a incidência de mutantes resistentes (REHMAN *Et al.*, 2019).

1.2. A formação de biofilmes bacterianos

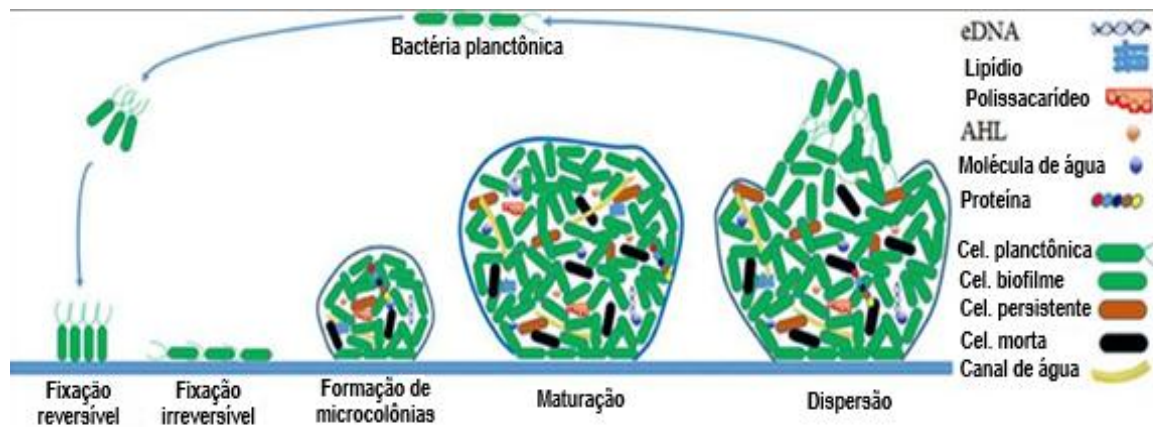
A formação de biofilmes bacterianos é um processo dinâmico que ocorre em diferentes etapas e contribui para a resistência antimicrobiana (Figura 2). Inicialmente, ocorre a adesão de células planctônicas às superfícies, em um estágio conhecido como fixação reversível. Com o tempo, essa interação se fortalece, estabelecendo uma fixação irreversível, formando microcolônias que passam a se expandir e se organizar tridimensionalmente no interior de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), sintetizada pelas próprias bactérias (GHAFOR & REHM, 2011; RATHER *et al.*, 2021; YIN *et al.*, 2022). Em sequência, o biofilme sofre um processo de maturação, adquirindo características específicas quanto à sua composição, morfologia e arquitetura.

Biofilmes maduros frequentemente assumem formas complexas, parecidas visualmente com o formato de cogumelos ou torres, nas quais os microrganismos se distribuem de acordo com seu metabolismo e grau de tolerância a e dependência de oxigênio (KLAUSEN *et al.*, 2003; HØIBY *et al.*, 2011; RATHER *et al.*, 2021; YIN *et al.*, 2022). As microcolônias se separam de outras a partir de vazios intersticiais denominados de canais de água, em que ocorre o movimento de líquido possibilitando a distribuição de nutrientes, oxigênio, moléculas de sinalização e até mesmo de agentes antimicrobianos (DONLAN, 2002; YIN *et al.*, 2022).

A última etapa do ciclo é a dispersão, essencial para a colonização de novos sítios. Essa liberação de células pode ocorrer de maneira ativa, por meio da motilidade bacteriana e da degradação da matriz EPS, ou de forma passiva, em resposta a estímulos físicos, como o fluxo de líquidos. Diversos fatores podem atuar como gatilhos para a dispersão, incluindo superpopulação, competição por nutrientes, variações nas condições ambientais e mecanismos regulatórios que ativam genes

relacionados à motilidade celular e à degradação da matriz extracelular (RATHER *et al.*, 2021; YIN *et al.*, 2022).

Figura 2 - Processo de formação de biofilme. O biofilme maduro é constituído por células planctônicas móveis (flageladas – verdes), células aderidas ou sésseis (verdes), células persistentes (marrons) e células mortas (pretas). Também estão presentes canais de água e uma variedade de moléculas responsáveis pela sinalização e estabilização do biofilme, como acil-homoserina lactonas, lipídios, polissacarídeos, proteínas e eDNA.



Fonte: Rather *et al.*, *Brazilian journal of microbiology*, 2021 (adaptado).

A capacidade de *P. aeruginosa* de produzir biofilme está atrelada a sua persistência e capacidade de gerar infecções crônicas (KAMALI *et al.*, 2020). A formação de biofilme pode reduzir significativamente a eficácia da terapia antimicrobiana, uma vez que sua estrutura dificulta a penetração dos fármacos e compromete a eliminação das bactérias ali presentes. Esse mecanismo contribui para o agravamento do quadro clínico e torna o tratamento da infecção mais complexo (LIMA *Et al.*, 2017).

A matriz de biofilme é uma mistura de proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular (eDNA) (WHITCHURCH *et al.*, 2002; MATSUKAWA & GREENBERG, 2004; MA *et al.*, 2009; GHAFOR & REHM, 2011), que dificulta a penetração de antimicrobianos devido o estabelecimento da matriz de EPS, que compõe parte significativa da biomassa do biofilme (YASIR *et al.*, 2018), atuando como um arcabouço em que os compostos do biofilme se entrelaçam (MATSUKAWA & GREENBERG, 2004; GHAFOR & REHM, 2011).

Os exopolissacarídeos alginato, Psl e Pel sintetizados por *P. aeruginosa* atuam como elemento estrutural fundamental do biofilme, promovendo a aderência à superfície e contribuindo para sua organização e estrutura ao longo do desenvolvimento. Eles

colaboram com o DNA extracelular na manutenção da integridade do biofilme, mantendo a estabilidade e persistência da bactéria em ambientes clínicos (MA *et al.*, 2009; GHAFOR & REHM, 2011). Por sua vez, o eDNA também compõe grande parte do material extracelular do biofilme e é essencial para seu estabelecimento inicial. Acredita-se que sua principal origem sejam as vesículas de membrana liberadas pelas bactérias (WHITCHURCH *et al.*, 2002) e lise celular (RATHER *et al.*, 2021). Além disso, os componentes da matriz também favorecem o crescimento lento, a baixa atividade metabólica dessas células no biofilme, trocas genéticas e mutações (YASIR *Et al.*, 2018).

Assim, biofilmes bacterianos abrigam as chamadas células persistentes. Elas são consideradas um tipo especializado de célula dormente, geradas em resposta a estresses ambientais. Possuem características fisiológicas distintas, como baixa atividade metabólica, crescimento lento e ativação de sistemas de defesa celular que conferem a capacidade de serem altamente tolerantes a antibióticos e à resposta imune. Dessa forma, enquanto os antibióticos eliminam as bactérias planctônicas e parte das células do biofilme, as persistentes permanecem viáveis e, após a descontinuação do tratamento, podem repovoar o biofilme ou se dispersar para iniciar a formação de novos biofilmes (HØIBY *et al.*, 2011; RATHER *et al.*, 2021).

Nesse contexto, as células presentes no biofilme podem demonstrar uma resistência significativamente maior aos antibióticos convencionais, chegando a ser até 1000 vezes mais resistentes do que as bactérias planctônicas (YASIR *Et al.*, 2018). Um estudo conduzido no Brasil em pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica, demonstrou que 53,3% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de biofilme eram multidroga resistentes (LIMA *et al.*, 2017).

Diante desses mecanismos, *P. aeruginosa* em estados de biofilme possuem grande resistência a estresses ambientais, podendo sobreviver em uma atmosfera hipóxica ou outros ambientes extremamente hostis (QIN *et al.*, 2022). Portanto, ocorrem em diversas superfícies, incluindo tecidos vivos, tubulações de sistemas de água potável ou industrial, em superfícies no ambiente aquático natural e dispositivos médicos (YASIR *et al.*, 2018), como lentes de contato, comumente associadas ao desenvolvimento de úlceras de córnea (MILLER & AHEARN, 1987).

Por conseguinte, a utilização de terapias combinadas, envolvendo antimicrobianos eficazes contra *P. aeruginosa* e agentes com ação antibiofilme, tem sido recomendada como uma abordagem para potencializar o tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilme (ROY *et al.*, 2018; KAMALI *et al.*, 2020).

1.3. Resistência Antimicrobiana: um alerta global e a busca por novas abordagens terapêuticas

Conforme discutido, patógenos clinicamente relevantes, como *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam múltiplos e complexos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. É bem estabelecido que, atualmente, a resistência antimicrobiana (RAM) é uma das principais ameaças e desafios da saúde pública e desenvolvimento a nível global (JADEJA & WORRICH, 2022; OMS, 2023; OMS, 2024; GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2024). Apesar da ocorrência de resistência aos antimicrobianos ser um processo natural resultante de respostas adaptativas e mutações genéticas em microrganismos, o agravamento do cenário está relacionado ao uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos em humanos, animais e sistemas agrícolas (JADEJA & WORRICH, 2022; OMS, 2023), remetendo à importância do conceito de Saúde Única (“*One Health*”) e a estudos colaborativos entre os microbiomas de humanos, animais e do meio ambiente (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS, 2021; KIM & CHA 2021; JADEJA & WORRICH, 2022).

A contaminação de ambientes de produção de alimentos por bactérias resistentes a antimicrobianos pode favorecer sua disseminação ao longo de toda a cadeia alimentar, por diferentes vias, representando uma potencial ameaça à saúde pública. Esse cenário reforça a importância de abordar a resistência antimicrobiana sob a perspectiva integrada da Saúde Única (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS, 2021). Desse modo, a presença de bactérias resistentes tem sido registrada em diversos nichos, incluindo seres humanos, animais de produção, frutas, vegetais, laticínios, frutos do mar e produtos avícolas (ROY *et al.*, 2018).

Portanto, a disseminação da resistência a múltiplos antimicrobianos tem comprometido de forma crescente a eficácia dos tratamentos disponíveis, resultando em infecções cada vez mais complexas e, em alguns casos, sem opções terapêuticas

eficazes. Nesse contexto, as polimixinas voltaram a ser utilizadas como terapia de última linha contra bactérias Gram-negativas multirresistentes. A colistina (polimixina E) exerce sua ação principalmente por meio da interação com o LPS, promovendo alterações no lipídio A, causando a desestabilização da membrana externa e, subsequentemente, da membrana interna, levando a morte bacteriana. No entanto, a resistência à colistina pode ocorrer tanto por mecanismos cromossômicos quanto por genes veiculados por plasmídeos (YIN *et al.*, 2024).

O estudo conduzido pelo GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators (2024) projetou um cenário futuro global, estimando que, em 2050, 1,91 milhões de óbitos anuais serão diretamente atribuídos à RAM, enquanto 8,22 milhões de mortes anuais estarão associadas à RAM. No período de 2025 a 2050, o cenário de referência prevê 39,1 milhões de mortes atribuíveis à RAM e 169 milhões de mortes relacionadas à RAM. Nesse sentido, é esperado um aumento de 69,6% nas mortes globais atribuíveis à RAM e um aumento de 67,0% nas mortes associadas à RAM entre 2022 e 2050 (GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2024).

Considerando esse cenário, além dos impactos na mortalidade e morbidade, a RAM acarreta efeitos econômicos significativos, com uma estimativa de aumento de US\$ 1 trilhão nos custos de saúde até 2050 (OMS, 2023).

Os antibióticos mais recentes têm sido reservados como terapias de última linha para infecções causadas por bactérias multirresistentes. Entretanto, o ritmo lento de desenvolvimento de novos antimicrobianos tem agravado a resistência bacteriana, ampliando a lacuna entre o diagnóstico de patógenos MDR e a disponibilidade de tratamentos eficazes. Nesse contexto, abordagens terapêuticas alternativas aos antibióticos convencionais vêm sendo investigadas, com destaque para terapias com bacteriófagos, estratégias antivirulência, conjugados anticorpo-fármaco, vacinas e o uso de nanopartículas (YIN *et al.*, 2024). Além disso, estudos sugerem que peptídeos antimicrobianos não induzem facilmente resistência em *P. aeruginosa* e podem ser usados em combinação com antimicrobianos como o ciprofloxacino, para tratar biofilmes (MISHRA & WANG, 2017; YASIR *et al.*, 2018; YASIR *et al.*, 2020).

Estima-se que o desenvolvimento e a distribuição eficaz de novos medicamentos e terapias para microrganismos Gram-negativos poderiam evitar aproximadamente

11,08 milhões de mortes por RAM entre 2025 e 2050. Além disso, em um cenário com melhorias no tratamento de infecções graves e maior acesso a antibióticos, especialmente em países de baixa e média renda, calcula-se que 92,02 milhões de mortes possam ser evitadas nesse período (cerca de um terço das mortes previstas no cenário de referência) (GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2024).

Portanto é fundamental desenvolver um conjunto diversificado de intervenções. É declarado que a pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas, diagnósticos e tratamentos para enfrentar esse desafio global são reconhecidos como prioridades (OMS, 2023; GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2024).

1.4. Membrana Amniótica Humana

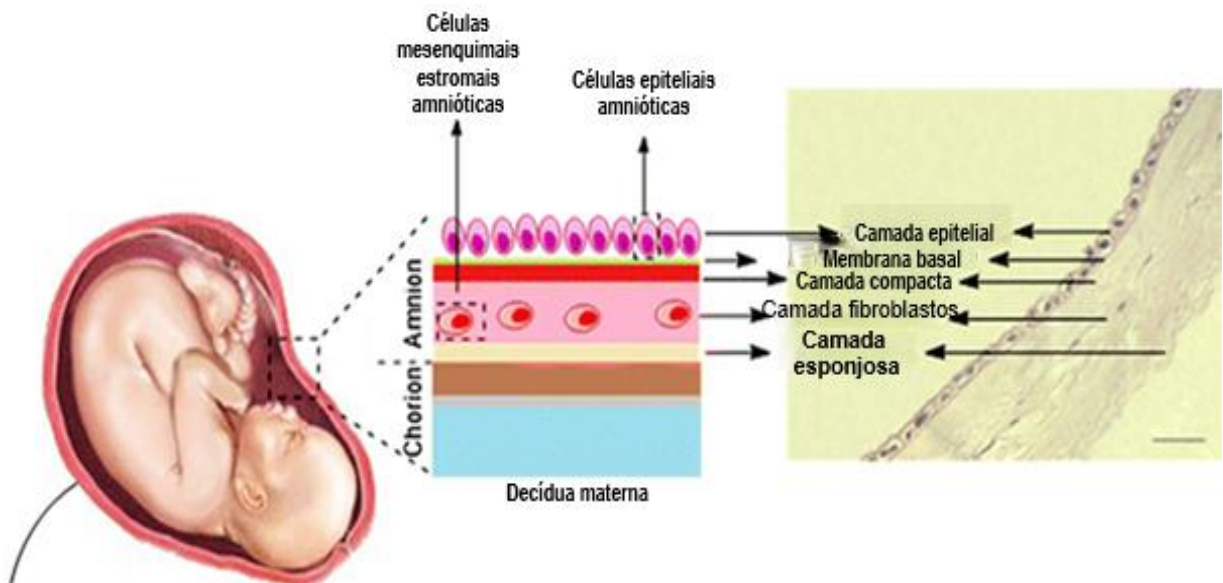
A membrana amniótica (MA) é de origem embrionária e constitui a camada mais interna da placenta, estando em contato direto com o feto e preenchida com líquido amniótico (KUBO *et al.*, 2001).

Estruturalmente, é formada por três camadas distintas: uma epitelial voltada para o feto, uma membrana basal e um estroma. Sendo que, este estroma é composto por uma camada compacta, uma camada com fibroblastos e uma porção esponjosa mais externa (APLIN *et al.*, 1985; FARHADIHOSSEINABADI *et al.*, 2018; ELKHENANY *et al.*, 2022), conforme representado na Figura 3.

As células presentes nessas camadas incluem dois tipos principais: as células epiteliais amnióticas (AECs) e as células mesenquimais estromais amnióticas (AMSCs). Essas células desempenham papéis fundamentais no suporte ao desenvolvimento embrionário, atuando na secreção de citocinas, fatores de crescimento e na síntese da matriz extracelular (MEC). Além disso, são de fácil obtenção e não envolvem questões éticas complexas, sendo consideradas uma fonte promissora de células-tronco para uso em terapias regenerativas (HAO *et al.*, 2000; GRZYWOCZ *et al.*, 2014; FARHADIHOSSEINABADI *et al.*, 2018; ELKHENANY *et al.*, 2022).

As AECs possuem características que as tornam promissoras como fonte alternativa de células-tronco pluripotentes, uma vez que expressam marcadores típicos de células-tronco embrionárias. Já as AMSCs apresentam elevado potencial de clonogenicidade e capacidade de diferenciação. Essas células demonstram habilidade de originar tecidos derivados das três camadas germinativas do embrião (FARHADIHOSSEINABADI *et al.*, 2018).

Figura 3 - Camadas da Membrana Amniótica Humana.

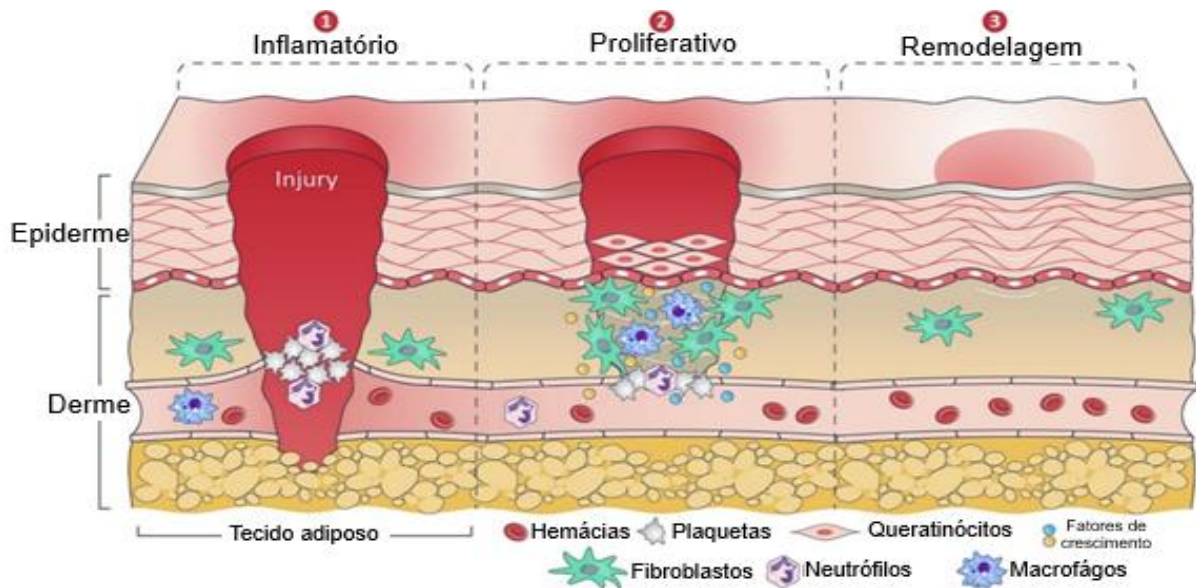


Fonte: Niknejad *et al.*, *Cell and tissue research*, 2016 (adaptado).

1.5. Propriedades biológicas da Membrana Amniótica

A membrana amniótica tem se destacado no tratamento de feridas crônicas de pele por sua capacidade de acelerar a cicatrização e promover a resolução de lesões de difícil regeneração (MOORE *et al.*, 2020). A cicatrização de feridas é um fenômeno biológico dinâmico e multifásico, que depende da atuação de diferentes tipos celulares e moléculas sinalizadoras. Esse processo pode ser dividido em três etapas principais: inflamação, proliferação e remodelação tecidual (Figura 4) (HEYDARI *et al.*, 2024).

Figura 4 - Representação esquemática das três principais fases do reparo tecidual da pele: (1) inflamatória, (2) proliferativa e (3) remodelação, cada uma envolvendo distintos tipos celulares e mediadores biológicos, como hemácias, plaquetas, queratinócitos, fatores de crescimento, fibroblastos, neutrófilos e macrófagos.



Fonte: Heydari *et al.*, *International journal of biological macromolecules*, 2024 (adaptado).

As propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e regenerativas atribuídas ao uso terapêutico da membrana amniótica (NIKNEJAD *et al.*, 2013) decorrem da expressão de uma ampla gama de fatores biologicamente ativos, produzidos pelas células epiteliais e pelo estroma subjacente, que regulam o comportamento celular no microambiente da ferida (HAO *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2020). Esses efeitos também estão associados à presença de componentes da matriz extracelular e a propriedades antimicrobianas, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais fatores biológicos da membrana amniótica

Fatores biológicos	Referências	Tipos
Fatores biologicamente ativos		
Fatores de Crescimento	Hao <i>et al.</i> , 2000; Koizumi <i>et al.</i> , 2000; Niknejad <i>et al.</i> , 2013; Pereira <i>et al.</i> , 2016; Grzywocz <i>et al.</i> , 2014;	EGF (Fator de Crescimento Epidérmico)
		TGF- α (Fator de Crescimento Transformador Alfa)e TGF- β 1,

Bischoff <i>et al.</i> , 2017; Moore <i>et al.</i> , 2020; Elkhenany <i>et al.</i> , 2022; Ingraldi <i>et al.</i> , 2023; Heydari <i>et al.</i> , 2024	2 e 3 (Fator de Crescimento Transformador Beta 1, 2 e 3)
	TNF (Fator de Necrose Tumoral)
	KGF (Fator de Crescimento de Queratinócitos)
	HGF (Fator de Crescimento de Hepatócitos)
	bFGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico) e FGF-2, 4, 6 e 7 (Fator de Crescimento de Fibroblastos 2, 4, 6 e 7)
	NGF (Fator de Crescimento Neural)
	PDGF- α (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Alfa) e PDGF- β (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Beta)
	VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e VEGF-R3 (receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular)
	PEDF (Fator Derivado Do Epitélio Pigmentar)
	IGF (Fator de Crescimento Semelhante a Insulina) e IGFBP-2, -3, -4 e -6 (Proteína Ligadora do IGF 2, 3, 4 e 6)
	NT-4 (neurotrofina-4)
M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos)	

		G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos)
Interleucinas (IL)	Hao <i>et al.</i> , 2000; Niknejad <i>et al.</i> , 2013; Pereira <i>et al.</i> , 2016; Bischoff <i>et al.</i> , 2017; Moore <i>et al.</i> , 2020; Elkhenany <i>et al.</i> , 2022; Heydari <i>et al.</i> , 2024	IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10; IL1-RA
Prostaglandinas	Pereira <i>et al.</i> , 2016; Elkhenany <i>et al.</i> , 2022	PGE-2 (Prostaglandina E2)
Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP)	Hao <i>et al.</i> , 2000; Niknejad <i>et al.</i> , 2013; Pereira <i>et al.</i> , 2016; Moore <i>et al.</i> , 2020; Elkhenany <i>et al.</i> , 2022	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4
Interferons (IFN)	Pereira <i>et al.</i> , 2016; Elkhenany <i>et al.</i> , 2022	IFN- α (Interferon Alfa)
		IFN- β (Interferon Beta)
Componentes da matriz extracelular		
Colágeno	Aplin <i>et al.</i> , 1985; Moore <i>et al.</i> , 2020; Elkhenany <i>et al.</i> , 2022; Heydari <i>et al.</i> , 2024; Rayat <i>et al.</i> , 2024	Colágeno tipo I, III, IV, V, VII
Elastina	Heydari <i>et al.</i> , 2024	-
Laminina	Aplin <i>et al.</i> , 1985; Moore <i>et al.</i> , 2020; Heydari <i>et al.</i> , 2024; Rayat <i>et al.</i> , 2024	-
Fibronectina	Aplin <i>et al.</i> , 1985; Moore <i>et al.</i> , 2020; Heydari <i>et al.</i> , 2024; Rayat <i>et al.</i> , 2024	-
Vitronectina	Heydari <i>et al.</i> , 2024; Rayat <i>et al.</i> , 2024	-
Propriedades antimicrobianas		
β -defensinas (HBD)	Buhimschi <i>et al.</i> , 2004; King <i>et al.</i> , 2007; Stock <i>et al.</i> ,	HBD1, 2, 3 e 4

	2007; Mao <i>et al.</i> , 2017; Tehrani <i>et al.</i> , 2017; Olmos-Ortiz <i>et al.</i> , 2022	
Elafina	King <i>et al.</i> , 2007; Stock <i>et al.</i> , 2007; Tehrani <i>et al.</i> , 2017	-
LL-37	Lim <i>et al.</i> , 2015; Tehrani <i>et al.</i> , 2017; Olmos-Ortiz <i>et al.</i> , 2022	-
SLPI (inibidor da protease leucocitária secretada)	Zhang <i>et al.</i> , 2001; Stock <i>et al.</i> , 2007; Mao <i>et al.</i> , 2017; Tehrani <i>et al.</i> , 2017	-
Histonas	Kim <i>et al.</i> , 2002	H2A e H2B
Lactoferrina	Niemelä <i>et al.</i> , 1989	-

Fonte: Autoria própria (2025).

Conforme demonstrado, a membrana amniótica é relatada como fonte de diversos fatores de crescimento, incluindo EGF (fator de crescimento epidérmico), KGF (fator de crescimento de queratinócitos), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico), que atuam em conjunto favorecendo a migração e a proliferação de células epiteliais, além de estimular a reepitelização e a síntese da matriz extracelular (BISCHOFF *et al.*, 2017; HEYDARI *et al.*, 2024).

A migração dos queratinócitos representa uma das fases iniciais mais importantes no processo de reparo tecidual. Nas margens da lesão, essas células passam por modificações em sua forma, influenciadas por estímulos como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e componentes da matriz extracelular. Essas mudanças levam à formação de projeções celulares e à reorganização do citoesqueleto. Além disso, IL-1 e TNF ativam fibroblastos dérmicos a sintetizar FGF, que favorece a reepitelização, e desencadeiam a resposta inflamatória (HEYDARI *et al.*, 2024).

Em contextos inflamatórios, os queratinócitos e outras células epiteliais passam a secretar IL-6, uma citocina pró-inflamatória que regula a resposta imune ao favorecer

a migração de macrófagos para o local da lesão e promover a cicatrização epitelial. A IL-8, também pró-inflamatória, contribui para o recrutamento de neutrófilos ao tecido inflamado, auxiliando no controle da inflamação local. A membrana amniótica, por sua vez, além de produzir interleucinas de perfil anti-inflamatório secretadas por células epiteliais e pelo estroma, atua na modulação de vias inflamatórias, especialmente a mediada pelo TGF- β , que é crucial para o processo de cicatrização e para a regeneração epitelial e restauração dos tecidos lesionados. Assim, a combinação de efeitos pró e anti-inflamatórios favorece o equilíbrio da resposta inflamatória, aspecto fundamental para o tratamento de feridas (BISCHOFF *et al.*, 2017; MOORE *et al.*, 2020; HEYDARI *et al.*, 2024). Já o NGF (fator de crescimento neural) contribui para a reinervação de tecidos, reduzindo a morte celular das células epiteliais e prolongando sua viabilidade (BISCHOFF *et al.*, 2017).

A capacidade imunomoduladora da membrana amniótica não se deve exclusivamente às suas células, mas também à sua matriz extracelular e à sua organização estrutural. Elementos como o colágeno e a própria matriz desempenham um papel fundamental na remodelação dos tecidos, atuando como sinais biológicos importantes na morfogênese tecidual e servindo como um arcabouço para outras células e lhes dá forma e suporte (MOORE *et al.*, 2020; HEYDARI *et al.*, 2024).

Os fibroblastos presentes na camada estromal da MA são responsáveis pela produção da MEC, tornando-a rica em proteínas como fibronectina, laminina, colágeno e vitronectina (RAYAT *et al.*, 2024). Essas proteínas atuam como ligantes que interagem com receptores específicos na superfície celular, promovendo a adesão das células ao arcabouço da matriz. Essa interação ativa vias de sinalização intracelular que favorecem a proliferação, migração e diferenciação celular (ELKHENANY *et al.*, 2022; RAYAT *et al.*, 2024).

Portanto, a baixa imunogenicidade (AKLE *et al.*, 1981), propriedades antiinflamatórias e antifibróticas tornam o âmnio um aloenxerto adequado para enxerto e aplicações clínicas (NIKNEJAD *et al.*, 2013). Soma-se a isso sua ampla disponibilidade, baixo custo e capacidade de favorecer a cicatrização, características que frequentemente a tornam superior aos enxertos de pele alogênicos (cadavéricos) ou xenogênicos (como os de origem suína) quando utilizados como curativo biológico temporário (SINGH & CHACHARKAR, 2011).

O Quadro 2 apresenta os principais fatores envolvidos nas propriedades terapêuticas da membrana amniótica, incluindo suas ações anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-cicatrizal, imunomoduladora, analgésica, angiogênica e regenerativa.

Quadro 2 - Fatores associados às propriedades terapêuticas da membrana amniótica.

Propriedades	Fatores contribuintes
Anti-inflamatória	AM suprime as citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8 e produz fatores anti-inflamatórios: IL-10, IL-4, TGF- β , HGF, PGE-2, HLA-G (Antígeno Leucocitário Humano G) e IDO (Indolamina 2,3-dioxigenase).
Antimicrobiana	AM serve como barreira física contra o ambiente externo com forte adesão à superfície da ferida e produzindo peptídeos antimicrobianos, como beta-defensinas e elafina.
Anti-cicatrizes	MA reduz MMP (Metaloproteinases da Matriz Extracelular) e outras proteases por meio da secreção de TIMPs e da regulação negativa de TGF- β .
Não imunogênico/baixa antigenicidade	Baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade. Presença de ligantes HLA-G e Fas.
Analgésica	O alívio da dor é proposto devido ao revestimento eficiente das terminações nervosas. Fatores de crescimento anti-inflamatórios, como IL-10 e IL-1RA, contribuem para o alívio da dor.
Angiogênica	Fatores pró-angiogênicos observados: VEGF-A, angiopoietina-1, HGF e FGF-2, PEDF, MMPs. Fatores anti-angiogênicos: TSP-1 (trombospondina-1), endostatina, TIMPs 1, 2, 3 e 4.
Promoção da diferenciação e adesão celular	Contém as proteínas estruturais: colágeno tipos I a VI e VII, laminina, fibronectina e vitronectina.
Epitelização	A membrana basal é um substrato para migração celular, proliferação, diferenciação e epitelização com fatores de crescimento como: KGF, b-FGF e TGF- β .

Fonte: Ingraldi *et al.*, Journal of functional biomaterials, 2023 (adaptado).

1.5.1. Propriedades antimicrobianas da membrana amniótica

Em casos de infecção durante a gestação, as membranas corioamnióticas atuam como a última linha de defesa antes que o patógeno alcance o líquido amniótico e o feto. A eficácia das respostas imunes dessas membranas, incluindo sua capacidade de conter a proliferação bacteriana, pode ser determinante para a manutenção da gestação (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022). Nesse contexto, evidências sugerem que a membrana amniótica apresenta potencial bactericida e bacteriostático contra diferentes gêneros bacterianos (ŠKET *et al.*, 2019).

O tecido amniótico é capaz de secretar moléculas antimicrobianas naturais, como proteínas ou peptídeos antimicrobianos (AMPs), principalmente β -defensinas (HBD1–4), elafina, LL-37 catelicídico, inibidor da protease leucocitária secretado (SLPI), Histonas H2A e H2B e Lactoferrina, que atuam como parte da resposta inata que protege a gravidez contra infecções bacterianas, fúngicas e virais (Quadro 1) (NIEMELÄ *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 2002; KING *et al.*, 2007; STOCK *et al.*, 2007; TEHRANI *et al.*, 2013; LIM *et al.*, 2015; MAO *et al.*, 2017; TEHRANI *et al.*, 2017; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022).

As proteínas e peptídeos antimicrobianos são reconhecidos como elementos fundamentais da resposta imune de organismos multicelulares e, conforme discutido anteriormente, têm sido explorados como potenciais agentes terapêuticos contra infecções. Possuem ampla atividade antimicrobiana, cinética simples e alta capacidade de atuar de forma sinérgica. Além disso, apresentam características farmacodinâmicas que dificultam o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos-alvo, podendo atuar de maneira combinada entre si ou em associação com antibióticos convencionais (LAZZARO *et al.*, 2020). Embora as células viáveis sejam a principal fonte de peptídeos antimicrobianos secretados, os AMPs estão presentes em níveis detectáveis na matriz extracelular do tecido mesmo após seu processamento para uso clínico (MAO *et al.*, 2017).

Como forma de resposta à infecção bacteriana, as membranas fetais intensificam a produção de diversos AMPs, de maneira variável conforme o tempo de exposição e a região afetada (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022). Assim, a ação antibacteriana das células da membrana amniótica pode ser significativamente intensificada quando expostas a

estímulos inflamatórios, como a IL-1 β ou LPS bacteriano. Esses indutores aumentam a expressão de peptídeos antimicrobianos pela membrana, reforçando seu potencial antimicrobiano (ZHANG *et al.*, 2001; BUHIMSCHI *et al.*, 2004; STOCK *et al.*, 2007; TEHRANI *et al.*, 2017; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022).

As defensinas epiteliais exercem um papel essencial na defesa do trato reprodutivo feminino, especialmente durante a gestação, sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BUHIMSCHI *et al.*, 2004). A ação antimicrobiana das HBDs presentes na membrana amniótica contra *P. aeruginosa* foi demonstrada por Mao *et al.* (2017), que confirmaram esse efeito por meio da remoção seletiva de cada HBD do meio condicionado. Além disso, a interação cooperativa entre HBDs pode levar a um maior efeito bactericida, inibindo significativamente o crescimento bacteriano em comparação com cada HBD sozinho (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022).

As histonas H2A e H2B, encontradas no epitélio da membrana amniótica, exercem funções bactericidas e neutralizantes de endotoxinas. Essas proteínas contribuem de maneira significativa para a atividade bactericida do líquido amniótico, contribuindo na manutenção do ambiente estéril mesmo em situações de infecção bacteriana durante a gestação. A capacidade dessas histonas de se ligar ou formar complexos com LPS de bactérias Gram-negativas pode inibir a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, geralmente associadas à ocorrência de choque séptico fatal. Dessa forma, H2A e H2B possivelmente têm um papel essencial na manutenção da integridade imunológica e da função de barreira da placenta, considerada uma estrutura imunologicamente privilegiada (KIM *et al.*, 2002).

A lactoferrina foi encontrada no líquido amniótico, decídua, trofoblasto, membranas fetais e cordão umbilical (NIEMELÄ *et al.*, 1989) e também atua como um importante componente da defesa primária, apresentando ampla atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. Seu efeito bacteriostático está relacionado à capacidade de sequestrar ferro, essencial para o crescimento microbiano. Além disso, essa glicoproteína também pode exercer ação bactericida direta ao se ligar LPS bacteriano, promovendo o aumento da permeabilidade da membrana e contribuindo para a destruição celular (ORSI, 2004).

O LL-37 é um AMP derivado endogenamente da catelicidina humana hCAP18 que possui propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras (LIM *et al.*, 2015). Sua ação envolve a interação com componentes da parede celular bacteriana, promovendo danos estruturais e perfuração na membrana citoplasmática, levando a lise e morte da célula bacteriana (SANCHO-VAELLO *et al.*, 2020).

A elafina e o inibidor secretor da proteinase leucocitária (SLPI) são exemplos de inibidores de elastase que atuam de forma eficaz sobre suas enzimas-alvo. Sua expressão é induzida por estímulos inflamatórios, como LPS bacteriano e citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 e o TNF. Ambos demonstram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SALLENAVE, 2000). A SLPI é sintetizada pelas células do âmnio em resposta à elevação de citocinas presentes no líquido amniótico. Essa proteína atua na proteção contra a ação de proteases e citocinas pró-inflamatórias ao longo da gestação, cuja atividade excessiva pode desencadear contrações uterinas e ruptura prematura das membranas. Também, o SLPI pode contribuir para mecanismos de defesa envolvidos na maturação pulmonar do feto (ZHANG *et al.*, 2001). A elafina é predominantemente expressa por neutrófilos presentes no endométrio e desempenha um papel importante nas defesas inatas da mucosa uterina, atuando na proteção contra infecções (KING *et al.*, 2003).

Os efeitos antimicrobianos da MA podem ser diferentes dependendo da espécie e linhagem bacteriana envolvida. Por exemplo, a elafina é capaz de inibir a serina peptidase associada à virulência de *P. aeruginosa* (TEHRANI *et al.*, 2013; TEHRANI *et al.*, 2017), mas essa atividade ocorre em uma concentração limiar que pode não ser suficiente para inibir outras espécies bacterianas (TEHRANI *et al.*, 2017).

Dessa forma, a diversidade de AMPs secretados pela MA é fundamental. A atuação combinada entre diferentes AMPs gera efeitos sinérgicos que potencializam a atividade antimicrobiana da membrana (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022). Além disso, a propriedade antibacteriana parece não se limitar aos efeitos das células amnióticas. Componentes estruturais da membrana, como a matriz extracelular, também parecem contribuir na atividade antimicrobiana (TEHRANI *et al.*, 2013).

Isso pode ser devido ao fato de que a presença de AMPs é capaz de estimular a liberação de quimiocinas por células da MA, promovendo a atração de diferentes tipos celulares do sistema imune, incluindo monócitos, neutrófilos, mastócitos, células T naíve, células T CD8, células dendríticas imaturas e células endoteliais. A ação conjunta com esses elementos imunológicos contribui para a contenção da infecção. Assim, a combinação de mecanismos estruturais, celulares e moleculares atuam de forma integrada na indução da morte bacteriana (OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022).

Estudos também avaliaram se a orientação do âmnio (com o lado epitelial ou mesenquimal voltado para cima) influenciaria a atividade antibacteriana, e não foram observadas diferenças significativas. Isso indica que tanto as células epiteliais quanto as mesenquimais presentes na membrana contribuem para esse efeito inibitório (TEHRANI *et al.*, 2017).

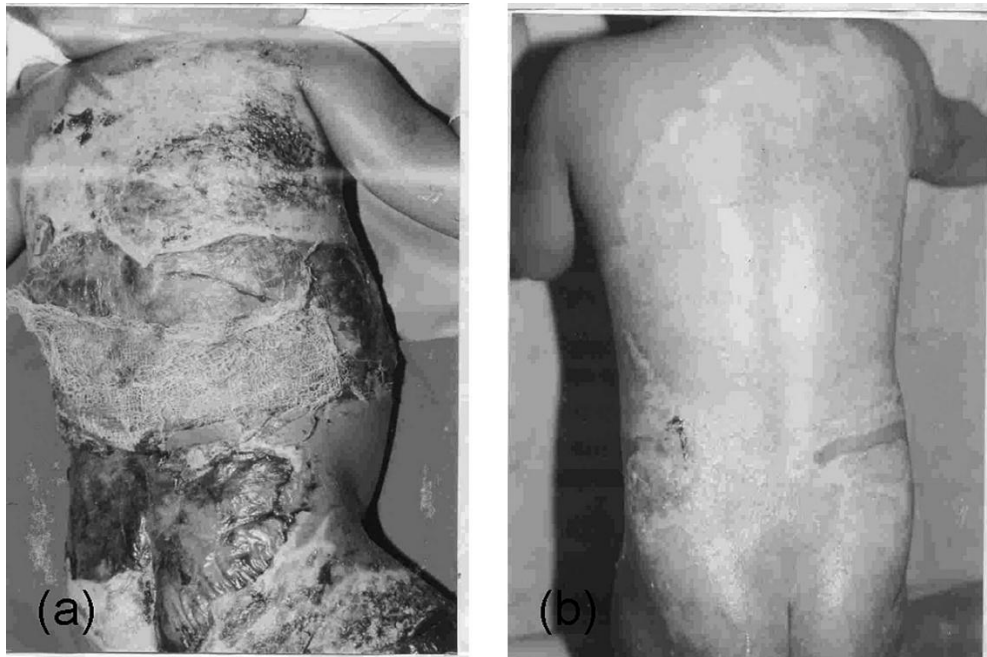
1.6. Aplicações clínicas

A aplicação clínica da membrana amniótica humana tem sido estudada e utilizada desde o início do século XX, sendo amplamente aplicada como curativo biológico para feridas há mais de um século (VO *et al.*, 2017; ELKHENANY *et al.*, 2022). Quando devidamente coletada, processada e esterilizada seguindo as Boas Práticas vigentes, a membrana amniótica é considerada segura para uso clínico, com risco minimizado de contaminação cruzada (MARANGON *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2007; BINTE *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2016).

Além de seu mecanismo de ação discutido anteriormente, a MA também atua como uma barreira física contra elementos externos, que pode impedir a infiltração de células do hospedeiro, funcionando de forma semelhante a uma membrana de proteção tecidual (KUBO *et al.*, 2001). Sua capacidade de evitar a adesão bacteriana às superfícies lesionadas pode dificultar a formação de biofilmes, contribuindo para a prevenção de infecções em feridas (HEYDARI *et al.*, 2024). Além disso, sua barreira protetora é capaz de proteger terminações nervosas expostas, reduzindo assim a dor de forma significativa, quando comparada com curativos convencionais (SINGH *et al.*, 2007; CHOUDHARY *et al.*, 2023).

A membrana amniótica tem sido aplicada principalmente em pacientes com queimaduras (SINGH *et al.*, 2007; PUYANA *et al.*, 2020), feridas crônicas ou agudas (CHOUDHARY *et al.*, 2023), incluindo úlceras persistentes ou crônicas (TROENSEGAARD-HANSEN, 1950; ZELEN *et al.*, 2013; ELHENEIDY *et al.*, 2016; DEHGhani *et al.*, 2017), mostrando resultados eficazes e promissores (Figura 5).

Figura 5 - Tratamento de paciente queimado com membrana amniótica. (A) Início da aplicação da MA sobre a área lesionada. (B) Após 10 a 14 dias, observa-se a dessecação e desprendimento natural da membrana, revelando uma superfície epitelizada.



Fonte: Singh *et al.*, *Journal of the International Society for Burn Injuries*, 2007.

Seu uso terapêutico também é amplamente difundido na oftalmologia. Ela tem sido utilizada como enxerto para reconstrução corneana e conjuntival de forma eficaz em diversas alterações da superfície ocular (KUBO *et al.*, 2001), incluindo o tratamento de úlceras de córnea (KIM *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006; SCHUERCH *et al.*, 2020), ceratite microbiana (TABATABAEI *et al.*, 2017) e defeitos corneanos resistentes ao tratamento convencional (AZUARA-BLANCO *et al.*, 1999; BISCHOFF *et al.*, 2017).

A ceratite microbiana, causada por bactérias, fungos, vírus ou parasitas, é uma infecção ocular potencialmente ameaçadora à visão (KIM *et al.*, 2001), podendo levar a formação de biofilme na superfície ocular (FULCHER *et al.*, 2001; MIHARA *et al.*, 2004; URWIN *et al.*, 2020). Devido a esses prováveis resultados drásticos, requer

tratamento médico rápido e agressivo usando antimicrobianos de amplo espectro (TABATABAEI *et al.*, 2017). Nesse contexto, Kim *et al.* (2001) avaliaram pacientes com úlcera infecciosa, submetidos ao transplante de MA criopreservada previamente embebida em coquetel antibiótico. Os pacientes também receberam tratamento antimicrobiano complementar (antibióticos, antivirais ou antifúngicos), de acordo com o agente causador, incluindo *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acanthamoeba sp.*, fungos e herpesvírus. Todos os casos apresentaram cicatrização da córnea sem recorrência de infecção, indicando que a MA favorece a reparação tecidual e reduz a inflamação ocular (KIM *et al.*, 2001). De forma semelhante, Tabatabaei *et al.* (2017) observaram melhores desfechos clínicos em pacientes com ceratite bacteriana, incluindo casos causados por *P. aeruginosa*, tratados com MA em comparação à antibioticoterapia isolada.

Assim, é bem evidenciado que o uso da MA é eficaz como estratégia adjuvante especialmente em casos com risco de perfuração ou cicatrização inadequada, devido à sua capacidade de promover epitelização e proteger a integridade da córnea (KIM *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2006; TABATABAEI *et al.*, 2017).

A membrana amniótica também tem sido investigada como uma abordagem terapêutica promissora no tratamento do câncer, devido à sua capacidade de exercer efeitos antiproliferativos sobre células tumorais, promovendo a interrupção do ciclo celular (MAGATTI *et al.*, 2012), por meio das vias de indução de apoptose, a estimulação da parada do ciclo celular e a inibição da angiogênese (NIKNEJAD *et al.*, 2016). Nesse contexto, diferentes mecanismos envolvidos nessa ação antitumoral vêm sendo explorados (JIAO *et al.*, 2012; NIKNEJAD *et al.*, 2013; NIKNEJAD *et al.*, 2014; RAMUTA *et al.*, 2020).

Além da oncologia, a membrana amniótica também vem sendo estudada para endodontia regenerativa (BAKHTIAR *et al.*, 2022), reparar o tecido cardíaco danificado (RAYAT *et al.*, 2024), e na regeneração de tecidos musculoesqueléticos, demonstrando capacidade de promover a proliferação e diferenciação de células-tronco musculares residentes, reduzir a fibrose e estimular a miogênese em músculos distróficos (SANDONÀ *et al.*, 2023). Além disso, têm mostrado efeitos terapêuticos promissores em doenças ortopédicas, como osteoartrite e tendinopatias, por meio da

modulação imunológica e estímulo à remodelação da matriz extracelular (RAGNI *et al.*, 2021). Sua aplicação clínica é vasta e está em expansão (INGRALDI *et al.*, 2023).

A membrana amniótica é preferida aos materiais sintéticos devido à sua biocompatibilidade e falta de imunogenicidade. Portanto, além de suas propriedades terapêuticas naturais, quando impregnada com fármacos, pode atuar como um sistema biológico de liberação controlada, servindo como um curativo que permite a entrega sustentada de agentes antimicrobianos, contribuindo para melhores desfechos clínicos (YELCHURI *et al.*, 2017; KLAMA-BARYŁA *et al.*, 2025).

O Quadro 3 resume as propriedades terapêuticas da membrana amniótica frente as aplicações clínicas.

Quadro 3 - Propriedades terapêuticas da membrana amniótica frente as aplicações clínicas.

Propriedade	Mecanismo de ação	Aplicações clínicas
Anti-inflamatória	Interage com receptores celulares, inibe vias de sinalização inflamatória e cria um ambiente anti-inflamatório	Cicatrização crônica de feridas, queimaduras, cirurgias ortopédicas, doenças autoimunes
Antimicrobiana	Presença de peptídeos antimicrobianos, criação de ambiente ácido, formação de barreira física	Prevenção de infecção em feridas, curativos, cirurgias
Imunomoduladora	Interage com células imunes (macrófagos, linfócitos), regula a expressão de moléculas de adesão	Transplante de órgãos, doenças autoimunes, alergias
Anticicatrizante	Regula a síntese de colágeno, inibe a atividade de miofibroblastos	Tratamento de queimaduras, feridas cirúrgicas, cirurgia estética
Regenerativa tecidual	Presença de fatores de crescimento (VEGF, FGF), matriz extracelular e células-tronco mesenquimais	Engenharia tecidual, cicatrização de feridas crônicas, tratamento de doenças isquêmicas

Fonte: Rayat *et al.*, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2024 (adaptado).

1.7. Processamento e preservação do tecido

Para viabilizar a aplicação clínica segura, a MA é submetida a um rigoroso processo de coleta e preparo. Inicialmente, é coletado o consentimento informado de doadoras previamente selecionadas, com base em criteriosa triagem clínica, que inclui histórico médico e exame físico, com o objetivo de reduzir o risco de transmissão de doenças. As doadoras devem apresentar resultados negativos para sífilis, hepatite B (HBV), hepatite C (HCV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV). Após a triagem, a membrana é dissociada do córion, passando por etapas de lavagem e, posteriormente, submetida a processos de esterilização para garantir sua segurança terapêutica (SINGH *et al.*, 2007; JIRSOVA & JONES, 2017; INGRALDI ET AL, 2023). A maioria dos países, devido à regulamentação legal, exige que a MA seja preservada por 6 meses até a confirmação do resultado negativo da triagem para HIV (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2020).

Alguns protocolos adotam, como uma precaução de segurança adicional para MA preservada, diferentes combinações de antibióticos/antimicóticos na etapa de lavagem, incluindo penicilina, estreptomicina, neomicina, anfotericina B, gentamicina, imipenem, nistatina, polimixina e vancomicina. Isso pode levar a MA absorver e liberar antibióticos após a reidratação em uma superfície úmida, como meio de ágar ou a superfície da córnea (MARSIT *et al.*, 2019). Mesmo adotando essa etapa de processamento, na maioria dos casos, a membrana amniótica é submetida a uma esterilização final por radiação gama, geralmente com uma dose de 25 kGy. Essa dosagem é escolhida por estar cerca de 40% acima do mínimo necessário para eliminar microrganismos mais resistentes (JIRSOVA & JONES, 2017).

A preservação do tecido amniótico pode ser feita por desidratação, liofilização ou criopreservação, com o objetivo de garantir estabilidade e prolongar sua validade. Em alguns casos, também é realizada a descélularização, que remove componentes celulares imunogênicos, reduzindo o risco de rejeição no uso clínico (INGRALDI *et al.*, 2023).

A criopreservação de MA em dimetilsulfóxido (DMSO) ou glicerol é um método padrão e mais comumente utilizado para preservação da MA (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2020), e parece ser o mais eficaz em preservar as propriedades biológicas ativas

da MA (RODRÍGUEZ-ARES *et al.*, 2009). Foi demonstrado que pelo menos 50% das células epiteliais amnióticas criopreservadas por 2 meses em DMSO a -80 °C ainda estavam vivas e tinham capacidade de crescimento em cultura (KUBO *et al.*, 2001). No entanto, esse método exige equipamentos de congelamento de grande porte, que operam entre -80 °C e -195 °C, os quais nem sempre estão disponíveis em ambientes clínicos convencionais (INGRALDI *et al.*, 2023).

A membrana amniótica desidratada é submetida à secagem em câmara de fluxo laminar, processo que remove aproximadamente 95% de sua umidade. Foi desenvolvida para manter estabilidade em temperatura ambiente por até cinco anos, eliminando as limitações relacionadas ao armazenamento refrigerado ou congelado exigido pelas versões fresca ou criopreservada (SINGH & CHACHARKAR, 2011). Sua aplicação em feridas por queimadura é considerada simples e eficaz, favorecendo a epitelização e contribuindo para a regeneração tecidual (SINGH *et al.*, 2007; SINGH & CHACHARKAR, 2011).

A liofilização também é uma técnica eficaz para preservar as principais características morfológicas da MA, mantendo a integridade da camada epitelial e da membrana basal, com alterações mínimas. Essa abordagem também é vantajosa em contextos onde não há infraestrutura adequada para o transporte e armazenamento de tecidos criopreservados, pois também permite que o material seja mantido em temperatura ambiente (RODRÍGUEZ-ARES *et al.*, 2009). O processo de liofilização consiste em congelar rapidamente fragmentos da membrana a temperaturas entre -50 °C e -80 °C, seguido da secagem em alto vácuo por meio de um liofilizador. Nesse estágio, a água do tecido é removida por sublimação, reduzindo seu teor para aproximadamente 5% a 10% (JIRSOVA & JONES, 2017). O baixo teor de água presente na MA após a desidratação ao ar ou liofilização previne o crescimento microbiano, portanto, há menos chance de contaminação do produto (MARSIT *et al.*, 2019).

Foi demonstrado que a propriedade antibacteriana da MA foi mantida mesmo após a criopreservação e a liofilização (TEHRANI *et al.*, 2013). No entanto, os diferentes tipos de preservação do tecido levam a variações na quantidade de fatores biologicamente ativos (RODRÍGUEZ-ARES *et al.*, 2009). Apesar das variações nos métodos de processamento, os três principais tipos de preservação discutidos demonstraram

eficácia clínica, apresentando resultados comparáveis entre si (HUANG *et al.*, 2020; SABATER-CRUZ, 2023; SELL *et al.*, 2023).

O Quadro 4 apresenta os diferentes métodos de processamento, destacando as condições de armazenamento associadas, bem como as possíveis alterações na morfologia e nas propriedades biológicas.

Quadro 4 - Métodos de processamento e efeitos na morfologia, conteúdo biológico da membrana amniótica.

Método de Produção	Armazenamento	Morfologia da Membrana	Fator de Crescimento e Teor de Proteína	Aplicação Clínica
Fresco-congelado	Transplante imediato; curto prazo refrigerado (+4 °C)	Intacta – depende da técnica de processamento e manuseio	Perfil de fatores de crescimento (GF) e proteínas preservado; pode variar conforme doador	Descongelar e aplicar ou lavar com solução salina antes da aplicação
Descelularização	Depende do método de preservação aplicado	Danifica a integridade, reduz espessura da membrana	Promove maior proliferação, diferenciação e migração celular; conteúdo de GF alterado	Varia conforme o método de preservação utilizado
Criopreservação	Armazenar e transportar a – 80 °C	Estrutura preservada; espessura variável	Perda de alguns fatores de crescimento e proteínas (maior em membranas descelularizadas)	Descongelar e aplicar; pode ser usada com solução salina estéril
Liofilização	Longo prazo à temperatura ambiente	Morfologia preservada	Redução do conteúdo proteico e dos fatores de crescimento	Pode ser aplicada seca ou reidratada com solução salina estéril

Desidratação com temperatura controlada	Longo prazo à temperatura ambiente	MEC pode ser comprometida	Mantém fatores de crescimento ativos; menor concentração proteica	Pode ser aplicada seca ou reidratada com solução salina estéril
Desidratação em temperatura ambiente	Longo prazo à temperatura ambiente	Pode afinar e aumentar a fragilidade da membrana	Mantém perfil de fatores de crescimento	Pode ser aplicada seca ou reidratada com solução salina estéril

Fonte: Ingraldi *et al.*, *Journal of functional biomaterials*, 2023 (adaptado).

1.8. Amniotek

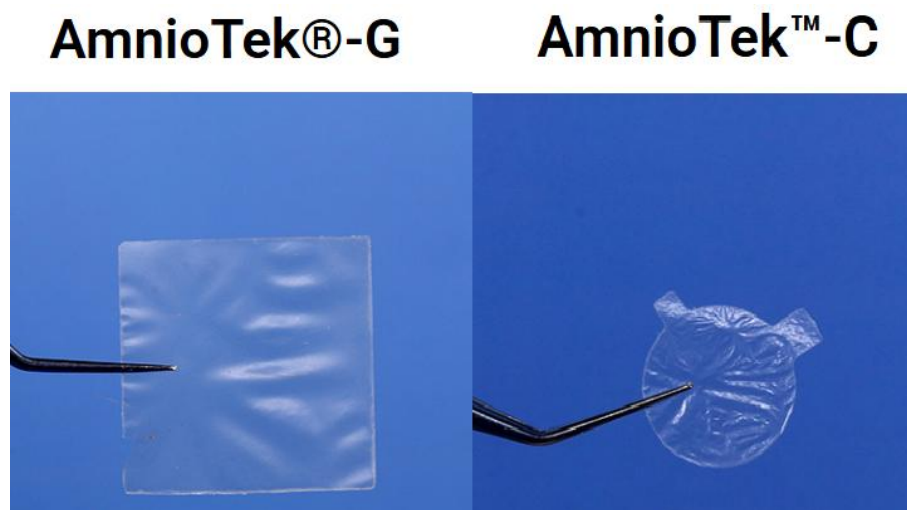
A AmnioTek™ (ISP Surgical) é uma membrana amniótica humana designada para uso oftalmológico. Em seu processamento, ela é desidratada, esterilizada em irradiação gama e armazenada em embalagem estéril de uso único (SUPOKAWATE & KO, 2018). Para o paciente, a membrana AmnioTek™ pode ser mais confortável do que uma membrana amniótica criopreservada, pois a mesma é aplicada na superfície da córnea com uma lente de contato de curativo macia (LAM & EPSTEIN, 2021).

Para preservação, o tecido amniótico AmnioTek™ é incubado em coquetel de antimicrobianos contendo ciprofloxacina, gentamicina e fluconazol por 6 horas e depois lavado com hipoclorito de sódio, solução salina e água destilada, como parte do processo de esterilização para remover microrganismos da microbiota vaginal. Após isso, o tecido amniótico é desidratado e esterilizado por irradiação gama (25 KGy). O teste de esterilidade é realizado para cada lote de produto.

Sua indicação de uso abrange: cirurgia de pterígio; liberação de simbléfaro; tratamento do olho seco; queimaduras químicas; reconstrução do fórnix; perda parcial ou total de células-tronco limbares; conjuntivite cicatricial; reconstrução do alvéolo; defeitos epiteliais persistentes; ceratopatia bolhosa; conjuntivocalase; ceratopatia em faixa; correção de entrópio; e úlceras estromais de difícil cicatrização (ISP Surgical, 2025).

A AmnioTek™ é disponibilizada nos tamanhos 1,5x1,5, 2x2, 3x3cm, 9mm ou 12mm, e espessura média de 100µm ou 150 µm (para o modelo Amniotek-G), manufaturada pela ISP Surgical CO. LTD., localizada na Sathorn Square 98 North Sathorn Road 37/F Sathorn Square, Silom, Bangkok 10500, Tailândia (E-mail: info@ispsurgical.com) (ISP Surgical, 2025) (Figura 6).

Figura 6 - AmnioTek™.



Fonte: ISPSURGICAL. Amniotek – Human Amniotic Membrane. Disponível em: <https://ispsurgical.com/amniotek/>. Acesso em: 30 jun. 2025.

A AmnioTek™ atende a rigorosos padrões de triagem e testes sorológicos de doadores, garantindo a segurança. É entregue estéril, seca e com uma vida útil a temperatura ambiente de 3 anos, podendo ser transportada e armazenada em temperatura ambiente, reduzindo assim os custos logísticos de armazenamento e envio incorridos por outras tecnologias de aloenxerto congelado (criopreservado) (ISP Surgical, 2025).

1.9. Regulamentação brasileira frente ao uso de membrana amniótica em humanos

A regulamentação brasileira para o uso terapêutico da membrana amniótica humana tem evoluído de forma gradual, com avanços significativos recentes. Há mais de uma década, médicos e demais profissionais da saúde vêm requerendo a utilização da membrana amniótica no tratamento de queimaduras e outras lesões graves no Brasil. O país ainda permanece como o único da América do Sul que não regulamentou oficialmente o uso terapêutico da membrana amniótica em humanos (SBQ, 2025).

Em 2013, a ANVISA aprovou de forma temporária emergencial o uso terapêutico da membrana amniótica humana no tratamento de vítimas gravemente queimadas no incêndio da Boate Kiss, ocorrido em Santa Maria (RS). Diante da gravidade do ocorrido e da escassez de recursos disponíveis no país à época, unidades de tecido foram doadas por bancos de tecidos da Argentina e do Uruguai (GZH, 2013), demonstrando o potencial terapêutico da membrana amniótica em situações críticas, antes de sua regulamentação formal no Brasil.

Porém, somente em 2021 o Conselho Federal de Medicina (CFM) publicou o Parecer nº 12/2021, no qual autorizou seu uso clínico como prática não experimental em condições como queimaduras, úlceras de pé diabético, aderências uterinas e doenças oftalmológicas (CFM, 2021). Esse parecer representou o primeiro reconhecimento oficial das aplicações clínicas da membrana amniótica no país.

Contudo, sua incorporação ao Sistema Único de Saúde (SUS) dependia da avaliação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec). Em março de 2024, a Conitec divulgou o Relatório para a Sociedade nº 528 – “Transplante de membrana amniótica”, e lançou a Consulta Pública nº 12, com o objetivo de coletar contribuições da população sobre o tema (CONITEC, 2025). Posteriormente, em maio de 2025, a comissão emitiu parecer favorável à incorporação da membrana amniótica como curativo biológico para o tratamento de pacientes com queimaduras no SUS, conforme oficializado pela Portaria SEC/TICS MS nº 46, de 18 de junho de 2025 (CONITEC, 2025).

Espera-se que, futuramente, as indicações de uso da membrana amniótica se ampliem no país, abrangendo outras condições já reconhecidas pelo CFM, como úlceras de pé diabético, aderências uterinas e doenças oftalmológicas (CFM, 2021).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO E RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Entre os microrganismos prioritários, *Pseudomonas aeruginosa* destaca-se como um dos principais agentes hospitalares multirresistentes, frequentemente associado a infecções severas e de difícil tratamento, levando a pesquisadores buscarem novos medicamentos capazes de interromper a infecção microbiana causada por essa

bactéria (ROCHA *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* é especialmente prevalente em casos de ceratite bacteriana (URWIN *et al.*, 2020) e infecções de feridas crônicas (WOLCOTT *et al.*, 2016), sendo comum em ambientes hospitalares e de alto risco para pacientes queimados, nos quais a infecção pode ocorrer antes mesmo do início do processo de cicatrização (LYCZAK *et al.*, 2000).

Diante da crescente emergência de resistência de linhagens dessa bactéria à maioria dos antimicrobianos, a busca por novas alternativas terapêuticas tem se intensificado. Nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos são candidatos promissores, com potencial para compor a próxima geração de agentes antimicrobianos (QIN *et al.*, 2022). Também, as abordagens terapêuticas combinadas, envolvendo antimicrobianos eficazes e agentes antibiofilme, têm sido recomendadas como estratégia para o controle de infecções persistentes associadas à formação de biofilmes (ROY *et al.*, 2018; KAMALI *et al.*, 2020).

A membrana amniótica, amplamente investigada por suas propriedades regenerativas (NIKNEJAD *et al.*, 2013; BISCHOFF *et al.*, 2017; MOORE *et al.*, 2020; ELKHENANY *et al.*, 2022), também apresenta atividade antimicrobiana intrínseca, atribuída não apenas à presença de peptídeos antimicrobianos em sua estrutura (MAO *et al.*, 2017; TEHRANI *et al.*, 2017; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022), mas também a componentes estruturais como a matriz extracelular, que parecem atuar de forma complementar no combate a microrganismos (TEHRANI *et al.*, 2013; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022). Além disso, a MA pode atuar como um curativo biológico de liberação controlada quando impregnada com fármacos antimicrobianos, promovendo a liberação sustentada do agente e potencializando os resultados clínicos (YELCHURI *et al.*, 2017; KLAMA-BARYŁA *et al.*, 2025). Estudos experimentais investigando as propriedades antimicrobianas da MA ainda são relativamente pouco estudadas e pouco padronizadas na literatura científica. Portanto o desenvolvimento e padronização de novas metodologias adequadas é de suma importância (TEHRANI *et al.*, 2017; RAMUTA *et al.*, 2021).

Diante desse contexto, o presente estudo propõe avaliar a atividade antimicrobiana da membrana amniótica desidratada AmnioTek™ e da AmnioTek™ impregnada com ciprofloxacino frente a isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo busca fornecer evidências científicas sobre o potencial uso da membrana amniótica como

uma estratégia terapêutica complementar no combate à resistência antimicrobiana, reunindo, em um único biomaterial de fácil acesso, propriedades regenerativas e atividade antimicrobiana promissora. Ressalta-se que o uso clínico da membrana amniótica foi recentemente aprovado no Brasil, ampliando as possibilidades de aplicação terapêutica desse produto no cenário nacional.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo é:

- Verificar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da membrana amniótica desidratada AmnioTek™ e da AmnioTek™ impregnada com ciprofloxacino em isolado de espécime clínico de *Pseudomonas aeruginosa*.

Os objetivos específicos constituem:

- Verificar se a impregnação da membrana amniótica desidratada AmnioTek™ com ciprofloxacino potencializa sua atividade antimicrobiana e antibiofilme, por meio de ensaio *in vitro*;
- Avaliar a duração da atividade antimicrobiana e antibiofilme da membrana amniótica desidratada AmnioTek™ e da versão impregnada com ciprofloxacino ao longo do tempo, por meio de ensaios *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da membrana amniótica desidratada AmnioTek™ e da versão impregnada com ciprofloxacino frente a isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*, por meio de ensaio *in vitro*;
- Analisar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a morfologia do tecido e a formação de biofilme após tratamento com AmnioTek™;
- Comparar os resultados obtidos entre a membrana amniótica desidratada AmnioTek™ e a AmnioTek™ impregnada com ciprofloxacino, considerando sua ação antimicrobiana e antibiofilme;

- Avaliar se fatores solúveis derivados da membrana amniótica estariam envolvidos na atividade antibacteriana e antibiofilme da membrana amniótica desidratada AminioTek™ e se a serina protease (Proteinase K) inibe tal atividade

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção da Membrana Amniótica Amniotek™

As amostras da membrana amniótica humana desidratada AmnioTek™ foram fornecidas pela empresa fabricante ISP Surgical Co. LTD. e distribuidora no Brasil Mediphacos Indústrias Médicas S.A. (Pessoa Jurídica Privada). Os biomateriais foram recebidos em sua embalagem original, estéril e lacrada, conforme especificações do fabricante, e mantidos sob condições adequadas de armazenamento até a realização dos experimentos.

4.2. Dispensa de Aprovação Ética

Este estudo não necessitou de aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa, uma vez que não envolveu a utilização de material biológico humano recém-coletado, nem qualquer intervenção direta com seres humanos ou animais. O biomaterial em estudo (AmnioTek™) é um produto comercializado e submetido a rigorosos controles de qualidade pelo fabricante, sendo adquirido e utilizado em sua forma final para fins exclusivamente laboratoriais.

O espécime de isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* empregado na pesquisa já estava previamente disponível na coleção institucional do Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro (LIMHO) com coleta do consentimento informado do paciente e encontra-se registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com autorização vigente para uso em atividades de pesquisa.

4.3. Desenho experimental

4.3.1. Preparação das amostras e grupos

Para os experimentos, foram utilizadas membranas AmnioTek™ modelo G (3 × 3 cm; espessura de 150 µm) e modelo C (9 mm de diâmetro; espessura de 100 µm). Cada amostra do modelo G foi cortada assepticamente com o auxílio de uma tesoura estéril em quatro fragmentos de aproximadamente 15 × 15 mm, enquanto o modelo C foi utilizado inteiro, sem recorte.

O crescimento bacteriano do isolado clínico de *P. aeruginosa* foi realizado em *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA), um meio seletivo derivado de modificações do meio de King, Ward e Raney (1954), contendo a presença de Irgasan, o que confere seletividade ao meio, inibindo microrganismos competidores e favorecendo o crescimento de espécies do gênero *Pseudomonas*. Sua formulação estimula a produção de piocianina, auxiliando na identificação de *Pseudomonas aeruginosa*.

As amostras utilizadas neste estudo foram organizadas em cinco grupos experimentais, conforme descrito a seguir. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada grupo amostral, com exceção da análise da formação de biofilme aderido à membrana amniótica por microscopia eletrônica de varredura, a qual foi conduzida em duplicata.

Grupo 1 – “MA” - Membrana Amniótica AmnioTek™ (sem modificação):

Membrana amniótica desidratada AmnioTek™, fabricada pela empresa ISP Surgical CO. LTD, em sua forma original, esterilizada e embalada. Nenhuma modificação foi realizada neste grupo.

Grupo 2 – “MA-C” Membrana Amniótica AmnioTek™ com impregnação de ciprofloxacino:

Para a padronização do procedimento, foram testadas diferentes concentrações do antimicrobiano (10 µg e 30 µg), aplicadas por pipetagem diretamente sobre a superfície da membrana. As manipulações foram realizadas em capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente, e as membranas foram submetidas a um tempo de secagem padronizado de 20 minutos.

As amostras impregnadas foram então submetidas ao ensaio de difusão em ágar, sendo posicionadas em placas de Petri contendo o meio *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) previamente semeadas de forma homogênea com a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ajustada à concentração aproximada de 1×10^8 UFC/mL. Após incubação por 24 horas a 37 °C, os halos de inibição formados ao redor das amostras foram medidos com régua, a fim de determinar a concentração mais eficaz do antimicrobiano.

Observou-se que a aplicação de concentrações maiores de ciprofloxacino (30 µg) não resultou em halos de inibição significativamente maiores aos obtidos com concentrações menores (10 µg). Dessa forma, a concentração de 10 µg foi estabelecida como padrão para as amostras desse grupo para fins experimentais.

Grupo 3 – “CIPRO” Controle positivo:

Composto por discos de papel filtro impregnados com 5 µg de ciprofloxacino ou 10 µg da formulação comercial Ciloxan® (colírio de ciprofloxacino), os quais foram utilizados como parâmetro de referência da inibição microbiana.

A concentração de 5 µg de ciprofloxacino foi utilizada nos ensaios de disco-difusão por meio de discos de papel-filtro, em conformidade com a padronização estabelecida pelo BrCAST-EUCAST (2024) para testes de suscetibilidade antimicrobiana em *P. aeruginosa*.

Para os ensaios realizados em meio líquido, foi empregada a concentração de 10 µg de ciprofloxacino, obtida a partir da aplicação de 3,3 µL da formulação comercial Ciloxan® (0,3%), volume calculado com base na concentração do fármaco, de modo a garantir equivalência com a quantidade de ciprofloxacino incorporada à membrana amniótica no grupo MA-C, permitindo a comparação direta entre os diferentes grupos experimentais.

Grupo 4 – “CN” Controle negativo:

Este grupo não foi submetido a qualquer tipo de intervenção, sendo utilizado para avaliar o crescimento microbiano e a formação de biofilme na ausência de tratamento.

Grupo 5 – “EXT-MA” Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica AmnioTek™

Com o objetivo de avaliar se compostos bioativos liberados pela membrana amniótica em estudo apresentam atividade antimicrobiana independente do contato direto com o biomaterial, foi estabelecido o Grupo 5 – Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica AmnioTek™ (EXT-MA). O extrato foi obtido pelo seguinte método:

Amostra da MA, em formato de disco de 9 mm de diâmetro e aproximadamente 100 µm de espessura, foi inicialmente incubada em um tubo de Eppendorf contendo 0,5 mL de solução salina estéril 0,9%, sendo mantida de forma estéril por 24h horas a 37°C. Após o período de incubação, a MA foi cuidadosamente retirada por meio de uma pinça estéril, restando apenas o extrato condicionado pela MA.

4.3.2. Linhagem de Isolado de Espécime Clínico

Os ensaios propostos foram realizados com linhagem de espécime clínico de *Pseudomonas aeruginosa* 21.0017 (SISGEN AA31084), coletada a partir de aspirado branquial de paciente, obtida a partir do repositório (biobanco) do Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro. Trata-se de um isolado não multirresistente e sensível à ciprofloxacina, solicitado especificamente ao biobanco do LIMHO para fins de análise nos experimentos descritos nesta pesquisa. A utilização de uma linhagem de espécime clínico de *Pseudomonas aeruginosa* teve como objetivo representar um cenário microbiológico do “mundo real” e clinicamente relevante para a avaliação da eficácia antimicrobiana das amostras testadas.

4.3.3. Ensaio de Disco-Difusão em ágar

Para avaliar a ação da membrana amniótica na inibição de crescimento bacteriano, foi realizado o ensaio de disco-difusão em meio sólido. Para isso, foi inicialmente descongelada a linhagem de espécime clínico 21.0017 de *Pseudomonas aeruginosa* previamente armazenada a temperatura de -80 °C. A amostra foi semeada em uma placa de Petri contendo meio *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA), por esgotamento, e incubada a 37 °C por 24 horas para o crescimento bacteriano.

Após o período de incubação, uma colônia isolada foi selecionada utilizando alça de inoculação estéril e transferida para um tubo contendo solução salina 0,9% estéril para preparo da suspensão bacteriana.

A densidade da suspensão foi ajustada por leitura espectrofotométrica (BioTek® UQuant™, BioTek Instruments Inc., EUA), utilizando comprimento de onda em $\lambda = 600$ nanômetros (nm), até atingir uma densidade óptica (DO) de 0,1, correspondente a uma concentração estimada de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL.

O inóculo preparado foi semeado uniformemente sobre placas de Petri contendo o meio PIA com auxílio de um swab estéril. Em seguida, as amostras dos Grupos 1 a 3 foram posicionadas assepticamente sobre a superfície do meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Decorrido esse período, as zonas de inibição de crescimento (halos de inibição) em torno de cada uma das amostras foram medidas ao milímetro mais próximo, considerando os halos de inibição a partir do ponto onde não foi observado o crescimento bacteriano a olho nu, utilizando-se uma régua. O diâmetro da zona foi relacionado com a suscetibilidade e com a taxa de difusão do antimicrobiano pelo meio.

Após a medição, as mesmas amostras foram cuidadosamente transferidas para novas placas de Petri contendo o meio PIA recém-semeadas com inóculo fresco preparado da mesma forma descrita anteriormente. As novas placas foram incubadas novamente a 37 °C por mais 24 horas sob as mesmas condições, para avaliar por quanto tempo a membrana amniótica é capaz de liberar o antimicrobiano no meio de forma eficaz quanto a inibição da atividade microbiana. Assim, após o total de 48 horas, as zonas de inibição de crescimento em torno de cada uma das amostras foram medidas novamente.

Todas as etapas do experimento foram conduzidas em capela de fluxo laminar, a fim de garantir condições assépticas e preservar a esterilidade dos procedimentos. O ensaio foi conduzido em triplicata.

4.3.4. Análise da formação de biofilme aderido à MA por Microscopia Eletrônica de Varredura

O inóculo bacteriano foi preparado conforme descrito anteriormente. A formação e inibição de biofilme na presença da membrana amniótica foram avaliadas por meio de três protocolos distintos de tempo e intervenção, descritos a seguir. Em todos os protocolos, lamínulas de vidro redondas e estéreis foram posicionadas no fundo de cada poço, servindo como local para o crescimento e fixação do biofilme. Em seguida, as amostras de MA foram inseridas assepticamente sobre as lamínulas, utilizando pinça estéril. Os ensaios foram realizados em duplicatas. Devido à movimentação natural do meio líquido, as amostras não permaneceram totalmente fixas sobre as lamínulas durante o período de incubação. As placas foram tampadas, vedadas e incubadas em condições estáticas a 37 °C, conforme os protocolos de tempo descritos abaixo:

- Protocolo 1: Inserção simultânea da MA e do inóculo bacteriano, com incubação por 24 horas, seguida da coleta para análise.
- Protocolo 2: Inserção simultânea da MA e do inóculo bacteriano, com incubação contínua por 48 horas antes da coleta.
- Protocolo 3: Inserção da MA e das lamínulas após 24 horas de incubação inicial, permitindo a formação prévia de biofilme, permanecendo por mais 24 horas (totalizando 48 horas de incubação) antes da coleta.

Ao término de cada período experimental, as lamínulas e as amostras de membrana amniótica foram removidas com auxílio de pinça estéril, transferidas para uma nova placa de cultivo de fundo chato, e lavadas cuidadosamente com solução PBS para remoção de células não aderidas. Em seguida, foram processadas para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme protocolo descrito a seguir.

Inicialmente, as amostras foram fixadas com solução de Karnovsky modificada (contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) por 4 horas a 4 °C. Em seguida, foram lavadas com tampão cacodilato 0,1 M e submetidas à pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% peso por volume (p/v). Posteriormente, procedeu-se à desidratação em série graduada de etanol. Após a desidratação, as amostras foram transferidas para a câmara de secagem ao ponto crítico com CO₂ e, em seguida,

montadas em *stubs*, sendo submetidas à metalização com ouro/paládio em camada de 5 nm de espessura.

As análises foram realizadas no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 FEG (FEI Company, EUA), com o objetivo de visualizar a morfologia do biofilme nos diferentes tempos e condições experimentais.

4.3.5. Ensaio de Inibição de Biofilme

Para avaliar a ação da membrana amniótica na inibição de crescimento bacteriano e formação de biofilme, foi realizado o ensaio de inibição de biofilme e posterior análise por microscopia eletrônica de varredura.

Para isso, assim como no experimento anterior, foi inicialmente descongelada a linhagem clínica 21.0017 de *Pseudomonas aeruginosa* previamente armazenada a temperatura de -80 °C. A amostra foi semeada em uma placa de Petri contendo meio *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA), por esgotamento, e incubada a 37 °C por 24 horas para o crescimento bacteriano.

Após o período de incubação, uma colônia isolada foi selecionada, utilizando-se de alça de inoculação estéril e transferida para um tubo Falcon contendo o meio Caldo Luria-Bertani (LB). O tubo foi então posicionado em uma incubadora com agitador (TE-420 - Tecnal®, Brasil), para impedir a formação de biofilme nesse período, durante a noite (*overnight*) a 37 °C.

Então, a cultura bacteriana foi retirada e submetida à centrifugação a 3.000 rotações por minuto (RPM) por 10 minutos utilizando a centrífuga BR4i (Jouan Inc., França). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, preservando o sedimento de células bacterianas após a centrifugação formado no fundo do tubo.

O sedimento foi ressuspenso em um novo Caldo LB estéril e a densidade óptica da suspensão bacteriana foi determinada por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda em $\lambda = 600$ nm. A amostra foi então diluída em Caldo LB estéril até atingir uma DO de 0,1, correspondente a uma concentração aproximada de 1×10^8 UFC/mL.

A suspensão bacteriana ajustada foi distribuída em placas de cultivo de fundo chato. Todas as etapas do experimento foram conduzidas em capela de fluxo laminar, a fim de garantir condições assépticas e preservar a esterilidade dos procedimentos.

Então, o ensaio foi dividido nos seguintes experimentos:

4.3.5.1. Inibição de Biofilme em 24 Horas

Após a preparação do inóculo conforme descrito acima, foram inseridas assepticamente com o auxílio de uma pinça estéril, no fundo de cada poço, as amostras correspondentes aos Grupos 1 a 3. Poços adicionais foram mantidos sem qualquer intervenção, compondo o Grupo 4 (controle negativo). Cada grupo foi testado em triplicata. As placas foram tampadas, vedadas adequadamente e incubadas em condições estáticas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação de 24 horas, as amostras de cada poço foram cuidadosamente removidas. Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi separada para leitura da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, com o objetivo de quantificar a concentração de células planctônicas presentes no meio de cultivo. Cada poço foi então lavado cuidadosamente com solução salina tamponada com fosfato (PBS), adicionada em gotas na parede lateral dos poços, repetindo-se o procedimento duas vezes para remoção das células planctônicas.

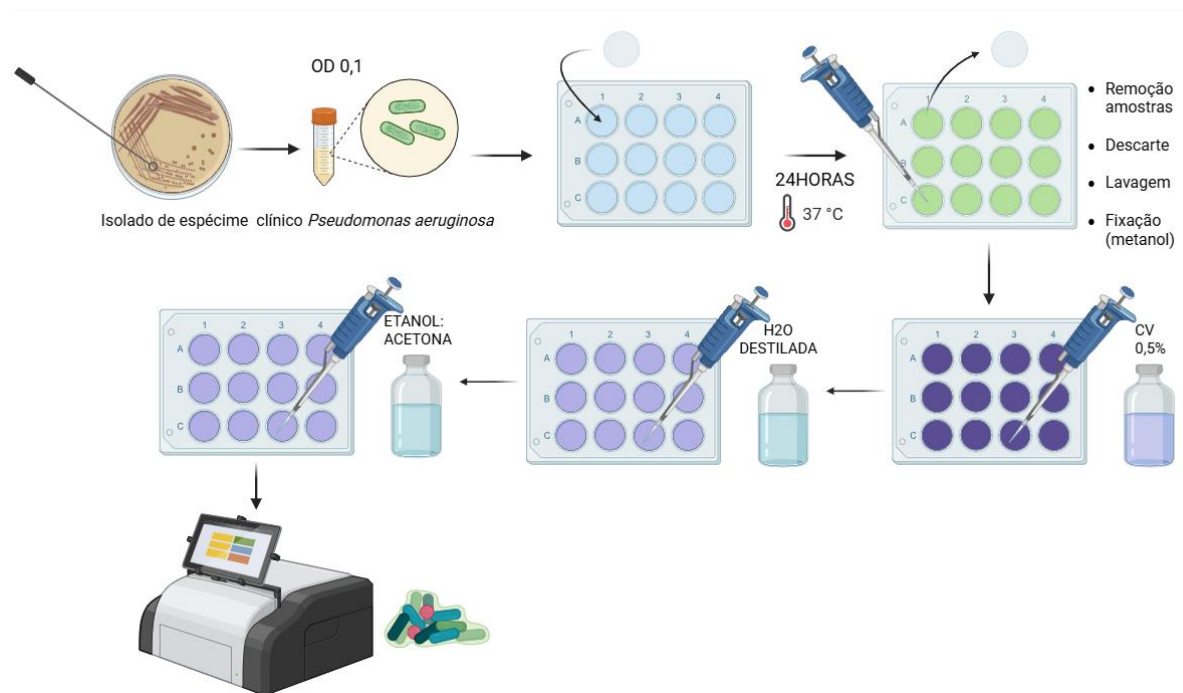
Em seguida, o PBS foi completamente removido, e os poços receberam álcool metílico (metanol) para fixação do biofilme, permanecendo em contato por 10 minutos. Após esse tempo, o metanol foi removido. Na etapa seguinte, foi adicionado corante cristal violeta 0,5% (massa por volume - m/v) em cada poço, com tempo de exposição de 10 minutos para coloração do biofilme aderido no poço. O excesso de corante foi então cuidadosamente removido, e os poços foram lavados com água destilada duas vezes, para eliminar resíduos do corante não aderido.

Posteriormente, foi adicionada uma solução de etanol:acetona (80:20 – volume por volume - v/v) a cada poço, permanecendo em contato por 10 minutos, com leves agitações intermitentes da placa para favorecer a completa solubilização do cristal violeta ligado ao biofilme. Por fim, 150 µL da solução resultante de cada poço foi

transferido para uma nova placa de leitura, e a densidade óptica foi mensurada a $\lambda = 620$ nm, com o objetivo de quantificar a massa de biofilme formado.

A Figura 7 resume o processo descrito.

Figura 7 - Processo esquemático do ensaio de inibição de biofilme



Fonte: Criado com <https://BioRender.com> (2025)

4.3.5.2. Inibição de Biofilme em 48 Horas

A avaliação da inibição de crescimento bacteriano e formação de biofilme após 48 horas foi conduzida a partir de dois protocolos experimentais distintos, conforme descrito a seguir:

Protocolo 1 - Adição das amostras após 24 horas de crescimento bacteriano:

A placa de cultivo foi inicialmente inoculada com *P. aeruginosa*, conforme descrito anteriormente, vedada e incubada em condições estáticas a 37 °C por 24 horas, sem a presença de amostras. Após esse período inicial, as amostras correspondentes aos Grupos 1 a 3 foram inseridas assepticamente no fundo de cada poço. Os poços referentes ao Grupo 4 (controle negativo) permaneceram sem intervenção. Cada

grupo foi testado em triplicata. As placas foram novamente vedadas e incubadas sob as mesmas condições por mais 24 horas, totalizando 48 horas de crescimento bacteriano. Encerrado o período de incubação, o sobrenadante e as amostras foram removidos cuidadosamente, e a densidade óptica do sobrenadante foi medida em $\lambda = 600$ nm para quantificação das células planctônicas. As etapas subsequentes de lavagem, fixação com metanol, coloração com cristal violeta, solubilização com etanol:acetona e leitura da densidade óptica a $\lambda = 620$ nm foram realizadas conforme descrito no protocolo aplicado para o experimento de 24 horas.

Protocolo 2 - Amostras incubadas por 48 horas continuamente:

A placa de cultivo foi inoculada juntamente com as amostras dos grupos MA e CIPRO. Todos os grupos foram realizados em triplicata. O grupo MA-C foi excluído desta etapa, uma vez que, nos ensaios anteriores, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos MA e MA-C. Após a montagem, as placas foram incubadas em condições estáticas a 37 °C por 48 horas, e as etapas subsequentes de lavagem, fixação, coloração e leitura da densidade óptica seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente.

4.3.5.3. Inibição de Biofilme com Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica

Neste ensaio, foram utilizadas amostras preparadas conforme descrito para o Grupo 5 – “EXT-MA: Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica AmnioTek™”. O objetivo deste experimento foi investigar a possível natureza das moléculas responsáveis pela atividade antimicrobiana observada no extrato, avaliando a influência de agentes que atuam sobre proteínas e pontes dissulfeto. Para isso, foram utilizadas duas soluções:

- Proteinase K (0,5 mg/mL), uma serina protease utilizada para degradação de proteínas e peptídeos (TONG *et al.*, 2022);
- Ditioneitol (DTT) (50 milimolar), um agente redutor de ligações dissulfeto (ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH *et al.*, 2017).

Cada solução foi previamente adicionada ao extrato condicionado na proporção 1:1 e incubada por 30 minutos antes da inoculação bacteriana. Em seguida, foi adicionado o inóculo de *P. aeruginosa*, também na proporção 1:1, para o início do ensaio. Além do controle negativo convencional (CN), foram incluídos controles negativos contendo Proteinase K (CN-PK) e DTT (CN-DTT), com o propósito de verificar se esses reagentes, isoladamente, poderiam interferir no crescimento bacteriano, e evitar interpretações enviesadas sobre o efeito do extrato. Cada grupo foi testado em triplicata. As placas de cultivo foram tampadas, vedadas e incubadas em condições estáticas a 37 °C por 24 horas. As etapas subsequentes de lavagem, fixação, coloração com cristal violeta, solubilização e leitura da densidade óptica, seguiram o mesmo protocolo adotado nos ensaios anteriores de quantificação da massa de biofilme.

4.3.6. Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas/peptídeos presentes no extrato condicionado pela membrana amniótica foi realizada a partir da amostra obtida conforme descrito no Grupo 5 (“Extração condicionada em solução salina”). Após a preparação, 2 µL da amostra foi aplicado em espectrofotômetro de microvolume NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando o protocolo específico para proteínas em solução aquosa (A280 Protein) com leitura no comprimento de onda de $\lambda = 280$ nm.

Como a composição proteica do extrato é desconhecida, não foi utilizado coeficiente de extinção específico para nenhuma proteína; assim, adotou-se o cálculo padrão do equipamento para amostras com teor proteico desconhecido. A solução salina estéril 0,9% utilizada na preparação do extrato foi aplicada como branco (“*blank*”) para zeramento. As medições foram realizadas em triplicata.

4.4. Análise Estatística

Inicialmente, os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade, os quais indicaram que os parâmetros medidos seguem uma distribuição normal. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para experimentos envolvendo comparações entre múltiplos

grupos, foi aplicada a Análise de Variância de uma via (One-way ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, quando identificado valor de $p < 0,05$. Em experimentos que envolveram comparações entre dois grupos independentes, as análises foram realizadas por meio do teste T paramétrico não pareado com correção de Welch. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$ (95% de confiança). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e são indicadas pelos símbolos “*” e “#” nas figuras. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

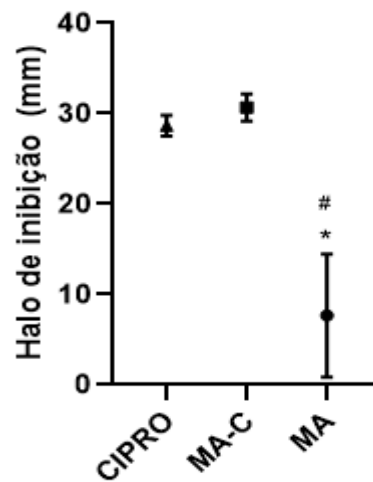
5.1. Disco-difusão em ágar

5.1.1. Disco-difusão em ágar por 24 Horas

A média dos halos de inibição bacteriana (considerando a medição do comprimento total do halo) observados após 24 horas de incubação foi de $7,67 \pm 6,81$ mm para o grupo Membrana Amniótica (MA), $30,7 \pm 1,53$ mm para o grupo Membrana Amniótica impregnada com $10\mu\text{g}$ de Ciprofloxacino (MA-C) e $28,7 \pm 1,15$ mm para o grupo contendo $5\mu\text{g}$ Ciprofloxacino em disco de papel filtro (CIPRO). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo MA e os grupos MA-C ($p = 0,0011$) e CIPRO ($p = 0,0018$), conforme demonstrado na Figura 8. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos MA-C e CIPRO ($p = 0,8253$), sugerindo que a membrana impregnada com ciprofloxacino apresentou efeito comparável ao do antimicrobiano livre, enquanto a membrana não impregnada apresentou atividade mínima ou ausente em meio ágar sólido, conforme demonstrado no registro fotográfico na Figura 9.

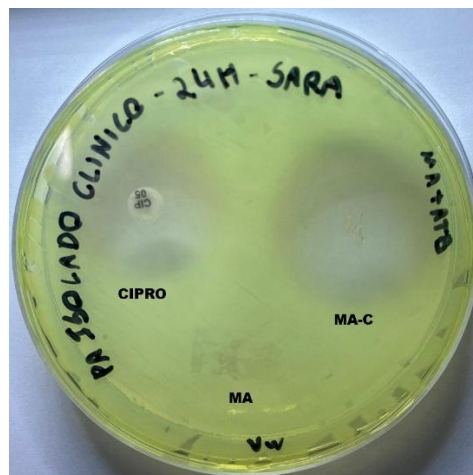
Figura 8 - Halos de inibição (mm) obtidos no ensaio de disco-difusão em ágar após 24 horas de incubação. Gráfico representando os diâmetros médios dos halos de inibição formados ao redor das amostras dos grupos MA (membrana amniótica), MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino) e CIPRO (ciprofloxacino). Os grupos MA-C e CIPRO apresentaram halos significativamente maiores em comparação ao grupo MA (#MA vs. MA-C: $p = 0,0011$; *MA vs. CIPRO: $p = 0,0018$), enquanto não houve diferença significativa entre MA-C e CIPRO ($p = 0,8253$), indicando eficácia antimicrobiana semelhante entre a ciprofloxacino livre e a incorporada à membrana. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CIPRO e # $p < 0,05$ em comparação ao grupo MA-C. Análise estatística: teste de comparações múltiplas de Tukey; dados expressos como média \pm desvio padrão; $n = 3$ para todos os grupos.

Difusão em disco 24 horas



Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 9 - Placa de Petri representativa do ensaio de difusão em ágar após 24 horas de incubação. Imagem demonstrando os halos de inibição formados ao redor das amostras: CIPRO (ciprofloxacino), MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino) e MA (membrana amniótica). Observa-se halos bem definidos com diâmetros similares ao redor da CIPRO e MA-C, indicando atividade antimicrobiana semelhante contra *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto a MA não apresentou zona de inibição visível.



Fonte: Autoria própria (2025).

5.1.2. Disco-difusão em ágar durante reexposição a amostras

Após transferência das amostras para uma nova placa de Petri recém inoculada e incubação por mais 24 horas, não foram observadas zonas de inibição em nenhum dos grupos avaliados. O diâmetro dos halos foi de 0 mm para todos os grupos, indicando ausência de atividade antimicrobiana residual após esse período. Esses resultados sugerem que, nas condições testadas e com o volume de ciprofloxacino utilizado, a membrana amniótica não foi capaz de promover uma liberação lenta e sustentada do antimicrobiano. Evidentemente, o composto foi liberado de forma rápida e esgotado nas primeiras 24 horas, não sendo suficiente para manter a inibição do crescimento bacteriano no ensaio avaliando a reexposição da membrana.

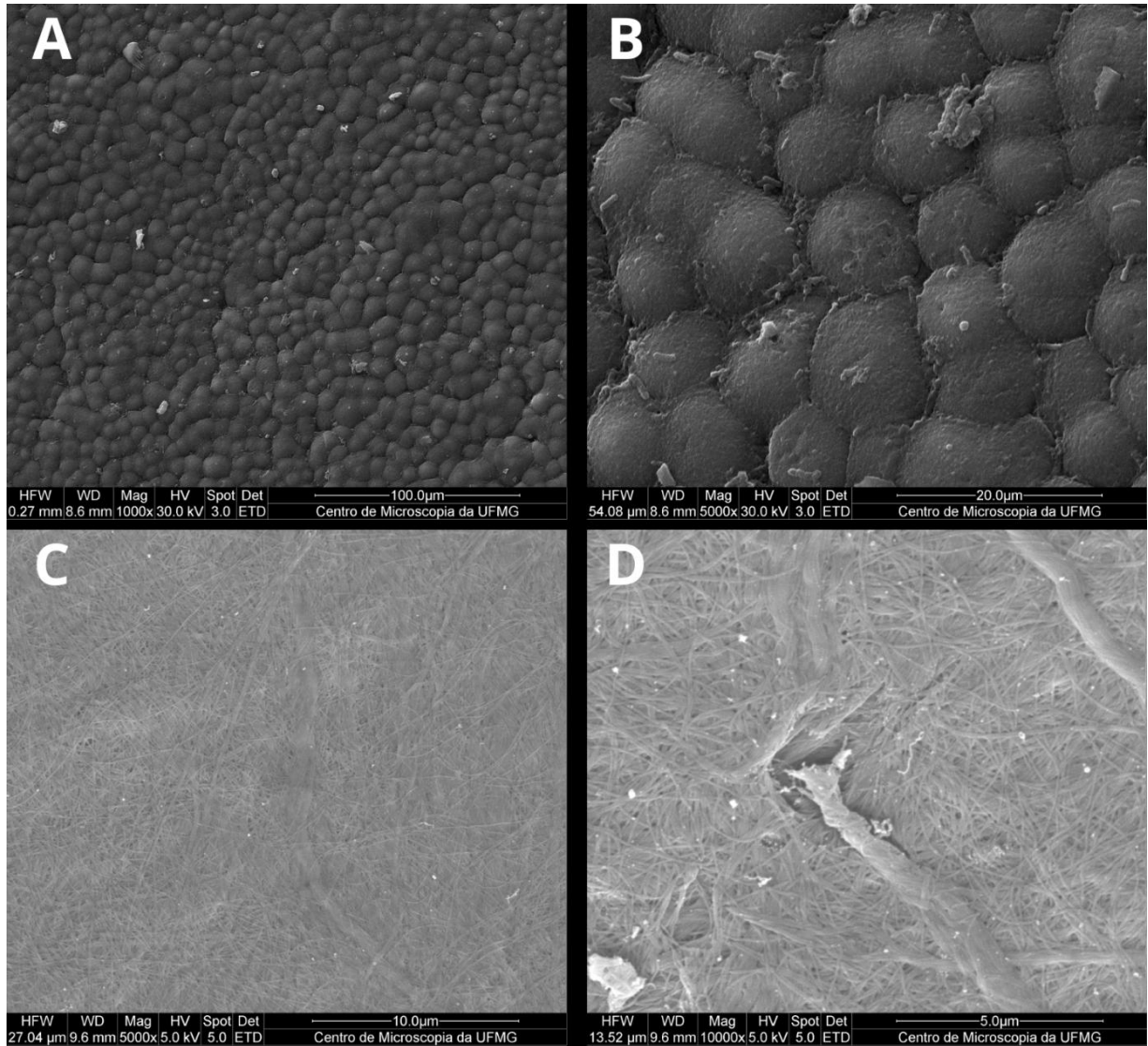
5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5.2.1. Análise morfológica da membrana amniótica

Nas amostras contendo o tecido da membrana amniótica, observou-se que, mesmo após a inoculação bacteriana no meio de cultura, a integridade estrutural do tecido foi mantida. A análise revelou a preservação da camada epitelial, composta por células justapostas com morfologia poliédrica característica (Figura 10 – A e B).

Além disso, foi possível identificar a camada estromal, contendo fibras de colágeno entrelaçadas, conferindo aspecto de rede densa ao tecido (Figura 10 – C e D).

Figura 10 - Morfologia da membrana amniótica. (A–B) Estrutura epitelial preservada, composta por células justapostas com morfologia poliédrica característica. (C–D) Camada estromal evidenciando fibras de colágeno entrelaçadas. Escalas: (A) 100 μm ; (B) 20 μm ; (C) 10 μm ; (D) 5 μm . Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura – Microscópio FEI Quanta 200 FEG, Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).



Fonte: Autoria própria (2025).

5.2.2. Análise de formação de biofilme na superfície da membrana amniótica

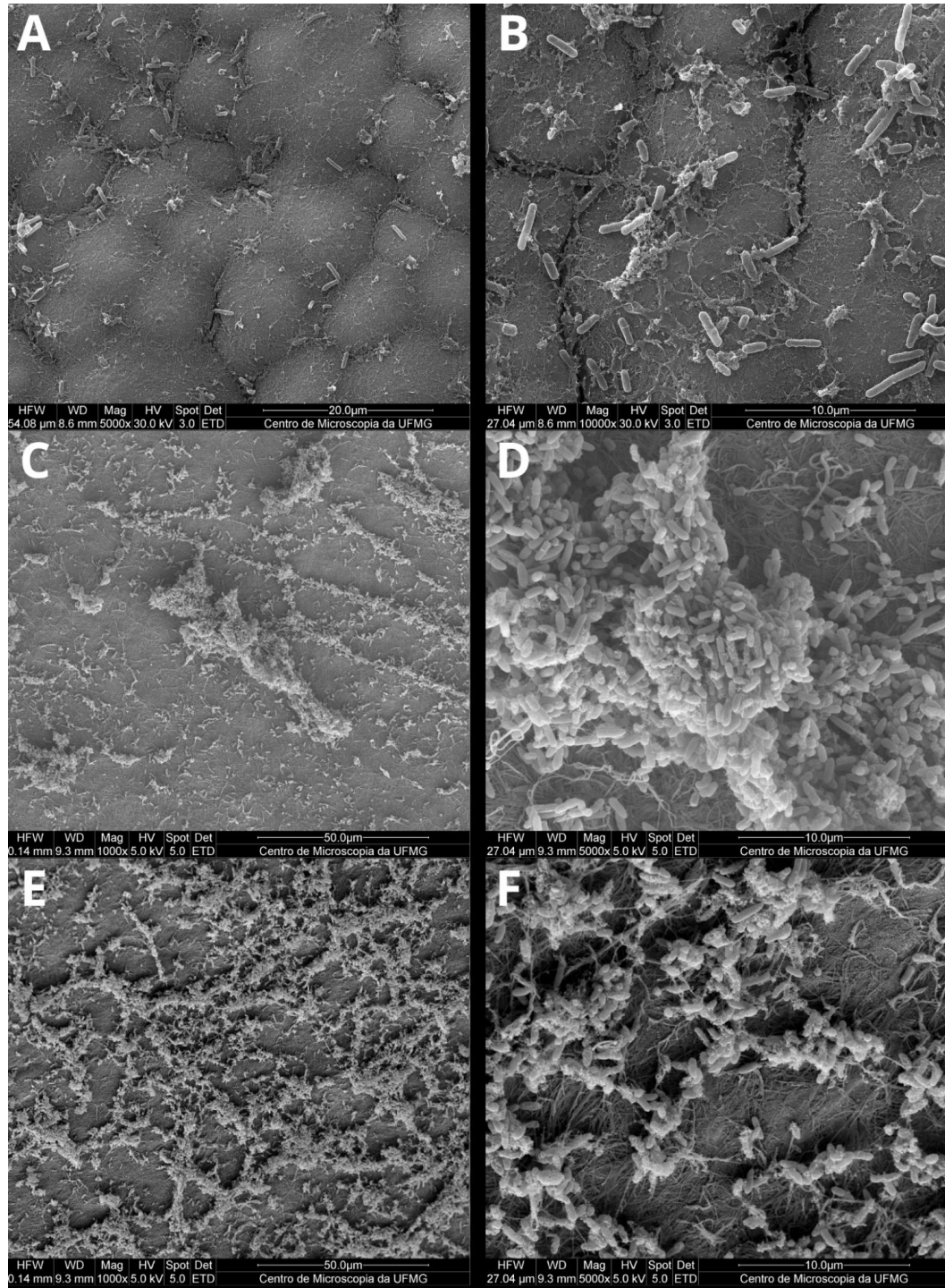
As análises por microscopia eletrônica de varredura realizadas para avaliar o crescimento bacteriano e a formação de biofilme por até 48 horas demonstraram que *P. aeruginosa* é capaz de formar biofilmes sobre a estrutura da membrana amniótica.

Observou-se que, quando a MA é inserida juntamente com o inóculo bacteriano, há

presença expressivamente menor de matriz extracelular e bactérias aderidas ao tecido no período de 24 horas (Figura 11 – A e B), quando comparado com os demais períodos avaliados. Após 48 horas de incubação, tanto nas amostras mantidas continuamente em contato com a bactéria por 48 horas (Figura 11 – C e D) quanto naquelas em que a MA foi inserida após 24 horas de cultivo prévio da linhagem bacteriana (Figura 11 – E e F), foi possível observar uma maior quantidade de matriz extracelular e células aderidas à superfície da membrana. A densidade e a organização dessas estruturas não parecem diferir de forma significativa entre as duas condições experimentais (48 horas contínuas ou inserção após 24 horas).

Além disso, a formação de biofilme observada nas lamínulas de vidro posicionadas no fundo dos poços seguiu o mesmo padrão identificado na superfície da membrana, sendo mais expressiva após 48 horas de incubação contínua do que quando incubadas por 24 horas (dados não demonstrados).

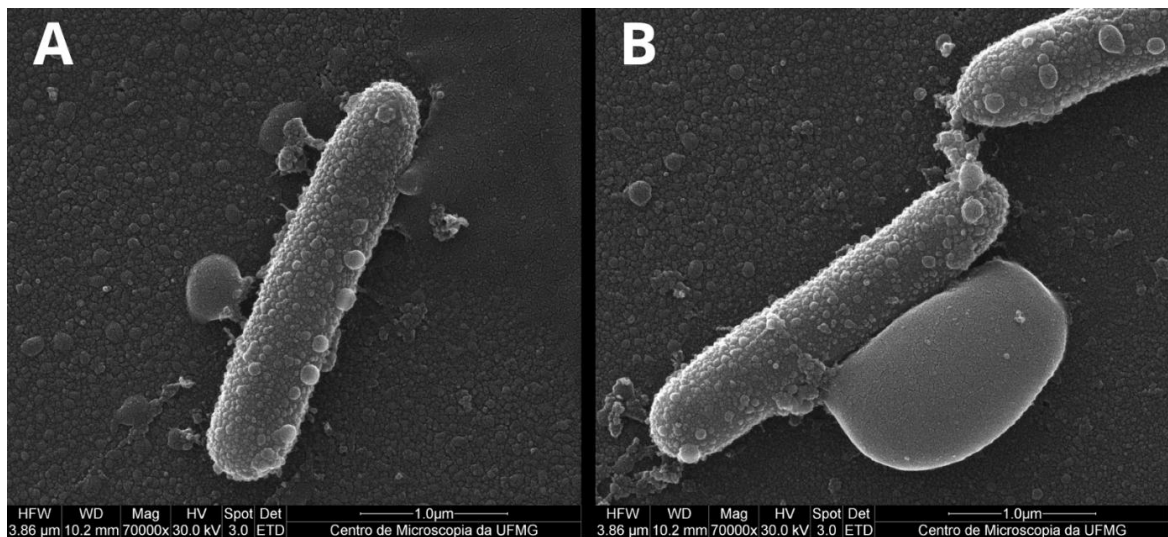
Figura 11 - Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e a formação de biofilme sobre a superfície da membrana amniótica (MA) em diferentes condições experimentais. (A e B) MA inserida juntamente com o inóculo bacteriano e incubada por 24 horas, evidenciando menor quantidade de matriz extracelular e de células aderidas. (C e D) MA mantida continuamente em contato com a cultura bacteriana por 48 horas. (E e F) MA inserida após 24 horas de cultivo prévio do inóculo bacteriano e incubada por mais 24 horas. Observa-se aumento da densidade de matriz extracelular e de células aderidas após 48 horas, sem diferenças morfológicas marcantes entre as duas condições experimentais de 48 horas. Escalas: (A) 20 μm ; (B, D, F) 10 μm ; (C, E) 50 μm . Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura – Microscópio FEI Quanta 200 FEG, Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).



Fonte: Autoria própria (2025).

Também foi possível observar a presença de restos celulares, muitos apresentando características morfológicas compatíveis com células em processo de lise ou morte. Destaca-se ainda a formação de múltiplas vesículas de pequenas dimensões na superfície das células bacterianas (Figura 12 – A e B). Além disso, foram observados indícios de rompimento da parede e da membrana celular, com sugestivo extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 12 – B).

Figura 12 - Células bacterianas de *P. aeruginosa* com alterações morfológicas compatíveis com lise. Observa-se a presença de múltiplas vesículas de pequenas dimensões na superfície das células bacterianas (A e B), e possível rompimento da membrana celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático (B). Escala: 1 μ m. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura – Microscópio FEI Quanta 200 FEG, Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).



Fonte: Autoria própria (2025).

5.3. Ensaio de Inibição Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme após 24 Horas com Membrana Amniótica

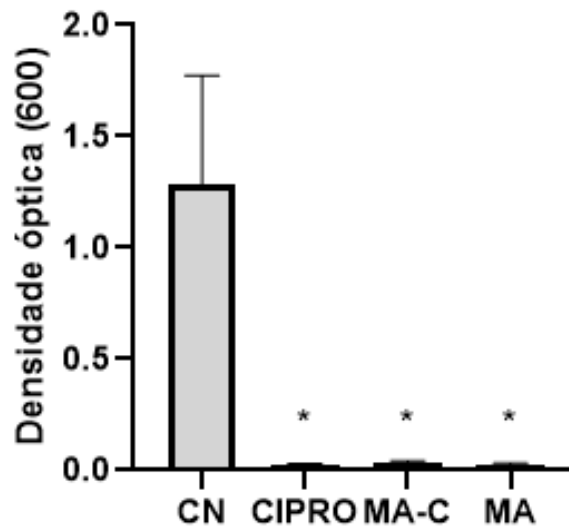
5.3.1. Quantificação de Células Planctônicas (24 Horas)

A quantificação das células planctônicas foi realizada 24 horas após o cultivo de *P. aeruginosa* com os grupos experimentais. Uma simples análise visual revelou que os poços com todos os grupos tratados MA, MA-C ou CIPRO, apresentavam baixa turbidez, enquanto o poço referente ao CN exibia alta turbidez e coloração esverdeada característica dos pigmentos produzidos por esta bactéria, com o meio visivelmente opaco. A imagem fotográfica da placa foi registrada para documentar visualmente

essa diferença entre os grupos experimentais (Figura 14). Essa diferença visual está de acordo com os resultados obtidos na leitura da densidade óptica do sobrenadante. Quando comparados ao grupo de controle negativo (CN) (n=3), que não recebeu nenhuma intervenção, todos os grupos tratados apresentaram redução estatisticamente significativa da densidade óptica do sobrenadante, conforme demonstrado na Figura 13. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,9999$) entre os grupos MA (n=3), MA-C (10 μ g) (n=3) e CIPRO (10 μ g) (n=3), indicando que esses três grupos apresentaram quantidades semelhantes de células planctônicas no sobrenadante.

Figura 13 - Quantificação de células planctônicas em 24 horas. Gráfico representando os valores médios de densidade óptica (600 nm) do sobrenadante dos poços da placa de cultivo após incubação com *Pseudomonas aeruginosa* por 24 horas. Os grupos analisados foram: MA (membrana amniótica, n = 3), MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino, n = 3), CIPRO (ciprofloxacino, n = 3) e CN (controle negativo, sem intervenção, n = 3). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados (MA vs. MA-C, MA vs. CIPRO, MA-C vs. CIPRO; $p > 0,9999$). Em comparação ao controle negativo, todos os grupos tratados apresentaram redução estatisticamente significativa da densidade óptica: *MA vs. CN: $p = 0,0011$; *MA-C vs. CN: $p = 0,0012$; *CIPRO vs. CN: $p = 0,0011$. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CN. Análise estatística: teste de comparações múltiplas de Tukey; dados expressos como média \pm desvio padrão.

Quantificação de Células Planctônicas 24 horas

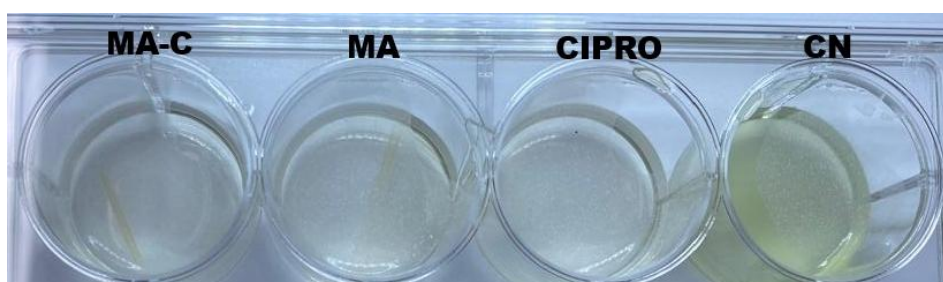


Fonte: Autoria própria (2025).

Esses achados indicam que tanto a membrana amniótica isolada, quanto a membrana impregnada com ciprofloxacino e o ciprofloxacino livre, foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de bactérias planctônicas no meio, quando

comparadas ao grupo controle. A ausência de diferença significativa entre os grupos tratados sugere que todos os tratamentos testados apresentaram eficácia semelhante na inibição do crescimento planctônico de *Pseudomonas aeruginosa* durante as 24 horas de incubação.

Figura 14 - Aspecto visual dos poços após 24 horas de incubação. Imagem representativa da placa de cultivo utilizada no ensaio de inibição de biofilme de 24 horas. Observa-se menor turbidez nos poços tratados com MA, MA-C e CIPRO, em comparação ao poço controle (CN), que apresenta alta turbidez e coloração esverdeada, indicando maior concentração de células planctônicas no meio.



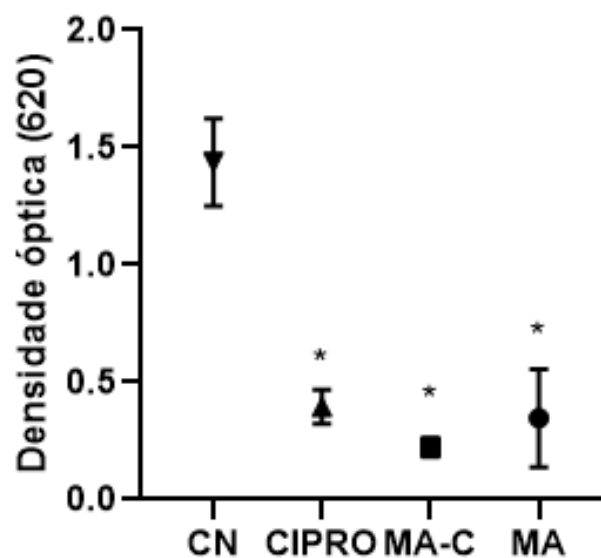
Fonte: Autoria própria (2025).

5.3.2. Quantificação da Massa de Biofilme (24 Horas)

A quantificação da massa de biofilme formada foi realizada 24 horas após o cultivo de *P. aeruginosa* com os grupos experimentais. Os grupos tratados com MA (n=3), MA-C (n=3) e CIPRO (n=3) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si na quantidade de biofilme aderido ($p > 0,5$ para todas as comparações). Ao comparar esses grupos com o controle negativo (CN) (n=3), observou-se redução significativa da massa de biofilme em todos os grupos experimentais. As comparações apresentaram os seguintes resultados, conforme demonstrado na Figura 15.

Figura 15 - Quantificação da massa de biofilme após 24 horas de incubação. Gráfico representando os valores médios de densidade óptica (620 nm) obtidos após coloração com cristal violeta 0,5% dos poços contendo os diferentes grupos experimentais: MA (membrana amniótica), MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino), CIPRO (ciprofloxacino) e CN (controle negativo, sem intervenção). Os grupos MA, MA-C e CIPRO não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,5$ - MA vs. MA-C: $p = 0,7326$; MA vs. CIPRO: $p = 0,9741$; MA-C vs. CIPRO: $p = 0,5031$), enquanto todos diferiram significativamente do grupo CN ($*p \leq 0,001$), indicando redução da formação de biofilme em todas as condições tratadas. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CN; dados expressos como média \pm desvio padrão; $n = 3$ por grupo; análise estatística: teste de comparações múltiplas de Tukey.

Quantificação da massa de biofilme em 24 horas



Fonte: Autoria própria (2025).

Esses achados demonstram que todos os tratamentos testados foram eficazes na redução do crescimento bacteriano e formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em 24 horas, quando comparados à condição sem intervenção, com efeitos semelhantes entre si. A ausência de diferença significativa entre os tratamentos com e sem ciprofloxacino sugere que a própria membrana amniótica pode exercer algum efeito inibitório na formação do biofilme, o que está de acordo com o observado na quantificação de células planctônicas do sobrenadante.

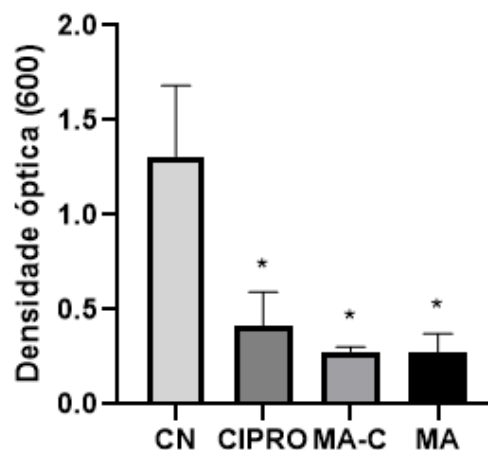
5.4. Inibição de Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme em 48 Horas (membrana amniótica adicionada após 24h de crescimento bacteriano)

5.4.1. Quantificação de Células Planctônicas (48 horas - membrana amniótica adicionada após 24h de crescimento bacteriano)

A quantificação de células planctônicas foi realizada 48 horas após o cultivo de *P. aeruginosa*, sendo que, os grupos de intervenção (MA; MA-C e CIPRO) foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados MA (n=3), MA-C (n=3) e CIPRO (n=3), com valores de p superiores a 0,84 em todas as comparações entre si. Por outro lado, todos os grupos tratados apresentaram redução estatisticamente significativa da densidade óptica do sobrenadante em comparação ao grupo controle (CN) (n=3), que não recebeu qualquer intervenção, conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16 - Quantificação de células planctônicas após 48 horas de incubação (os grupos de intervenção foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano). Gráfico representando os valores médios de densidade óptica (600 nm) do sobrenadante dos poços após 48 horas de cultivo com *Pseudomonas aeruginosa*. Os grupos experimentais foram: MA (membrana amniótica), MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino), CIPRO (ciprofloxacino) e CN (controle negativo, sem intervenção), com $n = 3$ para todos os grupos. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados (MA vs. MA-C: $p > 0,9999$; MA vs. CIPRO: $p = 0,8453$; MA-C vs. CIPRO: $p = 0,8522$). Em contrapartida, todos os grupos tratados apresentaram redução significativa da densidade óptica em comparação ao controle: *MA vs. CN: $p = 0,0015$; *MA-C vs. CN: $p = 0,0015$; *CIPRO vs. CN: $p = 0,0038$. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CN. Análise estatística: teste de comparações múltiplas de Tukey; dados expressos como média \pm desvio padrão.

Quantificação de Células Planctônicas 48 horas



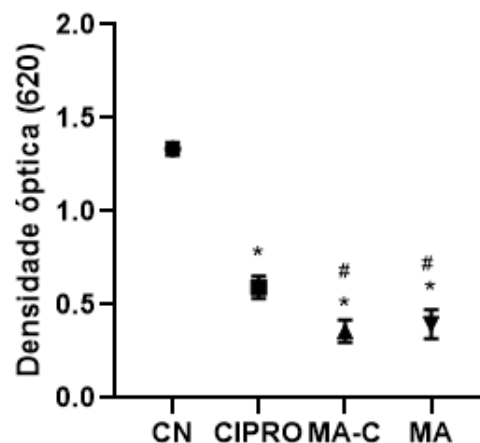
Fonte: Autoria própria (2025).

5.4.2. Quantificação da Massa de Biofilme (48 horas - membrana amniótica adicionada após 24h de crescimento bacteriano)

A quantificação da massa de biofilme formada foi realizada 48 horas após o cultivo de *P. aeruginosa*, sendo que, os grupos de intervenção (MA; MA-C e CIPRO) foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano, permitindo avaliar a eficácia dos tratamentos sobre biofilmes previamente estabelecidos. Todos os grupos tratados (MA, MA-C e CIPRO, $n = 3$) apresentaram redução significativa da massa de biofilme em comparação ao controle negativo (CN, $n = 3$) ($p < 0,0001$), demonstrando capacidade antibiofilme mesmo após formação inicial da comunidade bacteriana séssil. Entre os grupos tratados, observou-se que MA e MA-C foram significativamente mais eficazes que CIPRO na redução do biofilme já formado (MA vs. CIPRO: $p = 0,0159$; MA-C vs. CIPRO: $p = 0,0058$), enquanto não houve diferença significativa entre MA e MA-C ($p = 0,8592$), sugerindo que a impregnação adicional de ciprofloxacino na MA não aumentou significativamente sua eficácia (Figura 17).

Figura 17 - Quantificação da massa de biofilme formada após 48 horas de incubação (os grupos de intervenção foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano). Gráfico representando os valores médios de densidade óptica (620 nm) após coloração com cristal violeta, referente à massa de biofilme formada nos grupos MA (membrana amniótica), MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino), CIPRO (ciprofloxacino) e CN (controle negativo, sem intervenção). Todos os grupos tratados apresentaram redução significativa da biomassa de biofilme em comparação ao controle ($*p < 0,0001$; $n = 3$ para todos os grupos). Entre os grupos tratados, MA e MA-C foram significativamente mais eficazes que CIPRO na redução do biofilme ($\#MA$ vs. CIPRO: $p = 0,0159$; $\#MA-C$ vs. CIPRO: $p = 0,0058$), enquanto não houve diferença significativa entre MA e MA-C ($p = 0,8592$). $* p < 0,05$ em comparação ao grupo CN; $\# p < 0,05$ em comparação ao grupo CIPRO. Análise estatística: teste de comparações múltiplas de Tukey; dados expressos como média \pm desvio padrão.

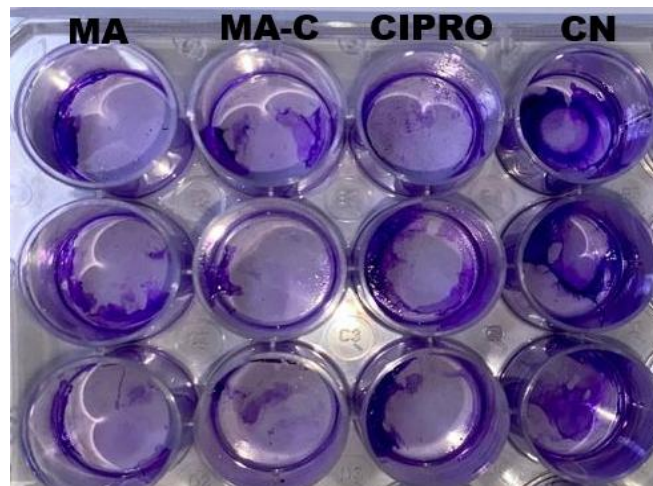
Quantificação da massa de biofilme em 48 horas



Fonte: Autoria própria (2025).

Conforme demonstrado na Figura 18, a análise visual, de forma qualitativa, demonstra a maior intensidade de corante cristal violeta nos poços referentes ao grupo CN, seguidos pelos poços contendo CIPRO, enquanto os grupos tratados com MA e MA-C apresentaram coloração visivelmente mais tênue e similar. Esse padrão visual corrobora os resultados quantitativos obtidos por densidade óptica, indicando menor crescimento bacteriano e formação de biofilme nas condições tratadas com a membrana, com ou sem a presença do antimicrobiano adicional.

Figura 18 - Registro fotográfico da coloração com cristal violeta nos poços da placa de cultivo após 48 horas de incubação (os grupos de intervenção foram adicionados após 24h de crescimento bacteriano). Após fixação e coloração com cristal violeta, nota-se maior intensidade de corante aderido no grupo controle negativo (CN) indicando maior formação de biofilme, seguido pelos poços contendo ciprofloxacino (CIPRO). Os poços correspondentes aos grupos MA (membrana amniótica) e MA-C (membrana amniótica impregnada com ciprofloxacino) apresentam coloração mais suave, sugerindo menor biomassa de biofilme.



Fonte: Autoria própria (2025).

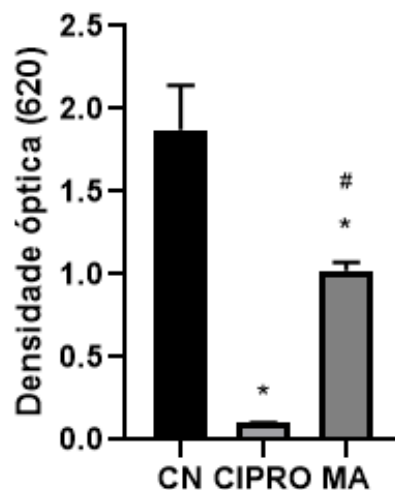
5.5. Inibição de Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme Após 48 Horas de Incubação Contínua com Membrana Amniótica

A quantificação da massa de biofilme foi realizada após 48 horas de cultivo de *P. aeruginosa*, durante as quais os grupos experimentais permaneceram em incubação contínua ao longo de todo o período. Tanto o grupo MA quanto o CIPRO ($n = 3$ cada) apresentaram redução significativa da biomassa de biofilme em comparação ao controle negativo (MA: $p = 0,0015$; CIPRO: $p < 0,0001$). Além disso, observou-se que o grupo CIPRO foi significativamente mais eficaz que a membrana amniótica na inibição do biofilme ($p = 0,0010$), evidenciando que, apesar de manter efeito significativo após 48 horas, a MA apresentou redução de eficácia quando comparada

ao CIPRO sob exposição contínua (Figura 19). Esses dados sugerem que a atividade antimicrobiana e antibiofilme da MA pode ser mais pronunciada nas primeiras 24 horas de aplicação, diminuindo sua atividade gradualmente com o tempo, possivelmente associada a um pico inicial de liberação de moléculas bioativas.

Figura 19 - Quantificação da massa de biofilme formada após 48 horas de incubação contínua dos grupos experimentais. Gráfico representando os valores médios de densidade óptica (620 nm) após coloração com cristal violeta, referente à massa de biofilme formada nos grupos MA (membrana amniótica), CIPRO (ciprofloxacino) e CN (controle negativo, sem intervenção). Os grupos tratados apresentaram redução significativa da biomassa de biofilme em comparação ao controle (*MA: $p = 0,0015$; *CIPRO: $p < 0,0001$; $n = 3$ para todos os grupos). Entre os grupos tratados, CIPRO foi significativamente mais eficaz que MA na redução do biofilme (#CIPRO vs. MA: $p = 0,001$). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo CN; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo CIPRO. Análise estatística: teste de comparações múltiplas de Tukey; dados expressos como média \pm desvio padrão.

Quantificação da massa de biofilme em 48 horas de intervenção contínua



Fonte: Autoria própria (2025).

5.6. Quantificação de Proteínas/Peptídeos Presentes no Extrato Condicionado de Membrana Amniótica

A quantificação das proteínas totais presentes no extrato condicionado pela membrana amniótica (disco de 9 mm de diâmetro e 100 μm de espessura, incubado em 500 μL de solução salina) revelou uma concentração aproximada de $50,3 \pm 5,13$ $\mu\text{g/mL}$ (variação de 46 a 56 $\mu\text{g/mL}$). Esse achado demonstra que a membrana amniótica libera para o meio proteínas e/ou peptídeos solúveis provenientes de sua matriz, indicando a presença de componentes potencialmente bioativos capazes de contribuir para as atividades observadas nos ensaios antimicrobianos.

5.6.1. Inibição de Crescimento Bacteriano e Formação de Biofilme em 24 Horas com Extrato Condicionado pela Membrana Amniótica

Após a quantificação de proteínas totais, para avaliar se a atividade antimicrobiana do extrato de membrana amniótica está relacionada a essas proteínas ou peptídeos bioativos, o extrato coletado foi tratado com Proteinase K (EXT-MA-PK) e com agente redutor DTT (EXT-MA-DTT). Além disso, foi incluído grupos de controle negativo contendo Proteinase K (CN-PK) e DTT (CN-DTT), para verificar se esses reagentes, isoladamente, poderiam interferir no crescimento bacteriano e evitar interpretações enviesadas dos resultados. A quantidade total de proteínas/peptídeos adicionada em cada poço foi de aproximadamente 1,68 µg. Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3 por grupo).

A quantificação da massa de biofilme foi realizada após 24 horas de cultivo de *P. aeruginosa* com os grupos experimentais. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Teste T paramétrico não pareado com correção de Welch, comparando-se cada grupo experimental ao seu respectivo controle (EXT-MA vs. CN e EXT-MA-PK vs. CN-PK). Adicionalmente, foram realizadas comparações entre os controles negativos (CN vs. CN-PK e CN vs. CN-DTT).

Os grupos contendo o agente redutor DTT foram desconsiderados, uma vez que o DTT, por si só, inibiu a formação de biofilme (grupo CN-DTT), impossibilitando a obtenção de conclusões sobre o papel do DTT na quebra de ligações dissulfeto em proteínas presentes no extrato de membrana amniótica (dados não demonstrados).

Em relação ao grupo controle de Proteinase K, a análise estatística dos dados demonstrou que não houve diferença significativa entre o controle negativo (CN) e o controle tratado com Proteinase K (CN-PK) ($p = 0,173$), indicando que a exposição a essa enzima, por si só, não alterou o crescimento bacteriano.

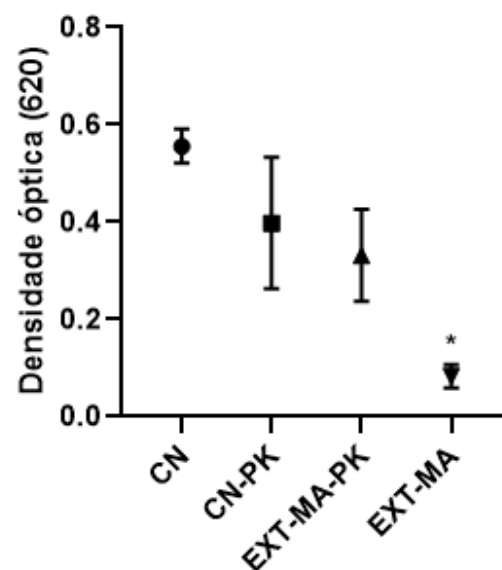
Todavia, a análise entre o grupo EXT-MA e seu respectivo controle CN, demonstrou que o extrato condicionado pela membrana amniótica demonstrou atividade antimicrobiana e antibiofilme significativa ($p = <0,0001$). Por outro lado, o grupo CN-PK não diferiu de EXT-MA-PK ($p = 0,530$), reforçando que a proteólise reduziu substancialmente a atividade biológica associada à membrana.

Esses achados indicam uma redução expressiva da carga bacteriana no meio, sugerindo que o extrato de MA manteve efeito bacteriostático ou bactericida similar ao da membrana íntegra. Esse efeito possivelmente decorre de substâncias liberadas pela membrana amniótica durante as primeiras 24 horas de incubação com a solução salina. A perda de atividade observada após o tratamento com Proteinase K 0,5mg/ml reforça que o extrato contém componentes antibióticos sensíveis à digestão proteolítica, sugerindo a presença de peptídeos e/ou proteínas com ação antimicrobiana e antibiofilme.

Em conjunto, esses resultados indicam que a atividade antimicrobiana da membrana amniótica está ligada, ao menos parcialmente, a moléculas proteicas ou peptídicas (Figura 20).

Figura 20 - Quantificação da massa de biofilme formada após 24 horas de incubação dos grupos experimentais. Gráfico representando os valores médios de densidade óptica (620 nm) após coloração com cristal violeta, referente à biomassa de biofilme formada nos grupos CN (controle negativo), CN-PK (controle negativo tratado com Proteinase K), EXT-MA-PK (extrato de membrana amniótica tratado com Proteinase K) e EXT-MA (extrato de membrana amniótica). O tratamento com Proteinase K, por si só, não alterou o crescimento bacteriano (CN vs. CN-PK: $p = 0,173$). O grupo EXT-MA apresentou redução significativa da biomassa de biofilme em comparação ao seu respectivo controle CN ($*p < 0,0001$), enquanto EXT-MA-PK não apresentou diferença significativa entre seu controle CN-PK ($p = 0,530$). $*p < 0,05$ em comparação ao grupo CN. Análise estatística: Teste T paramétrico não pareado com correção de Welch; dados expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$ para todos os grupos).

Quantificação da massa de biofilme em 24 horas com extrato de MA



Fonte: Autoria própria (2025).

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a membrana amniótica humana desidratada AmnioTek™ possui potencial antimicrobiano intrínseco, sendo capaz de inibir o crescimento bacteriano e a formação de biofilme bacteriano, bem como de atuar sobre biofilmes já estabelecidos. Essa atividade foi observada nos ensaios realizados em meios líquidos, tanto na fase de prevenção de crescimento bacteriano e formação de biofilme quanto no tratamento de um biofilme já previamente formado, sugerindo que a membrana libera substâncias bioativas com ação antibacteriana no meio de cultivo.

A impregnação prévia da MA com ciprofloxacino não demonstrou aumento significativo da atividade antimicrobiana quando comparada à MA sem adição do fármaco. Esse achado sugere que a ação observada é atribuída, predominantemente, a componentes bioativos intrínsecos à própria matriz amniótica.

De modo geral, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com MA (com ou sem ciprofloxacino) e o grupo tratado apenas com ciprofloxacino livre, na maioria dos ensaios realizados. No entanto, duas exceções foram observadas nos experimentos de 48 horas. No protocolo em que as amostras foram adicionadas após 24 horas de crescimento bacteriano (portanto, sobre um biofilme previamente formado), os grupos MA e MA-C apresentaram eficácia significativamente superior à do grupo CIPRO na redução da biomassa. Por outro lado, no protocolo de incubação contínua por 48 horas, em que os grupos experimentais permaneceram em contato com o inóculo durante todo o período, observou-se que, embora a MA tenha mantido efeito antimicrobiano e antibiofilme significativo, sua atividade foi inferior ao do ciprofloxacino.

Esses achados sugerem que a atividade biológica da MA está associada a um pico inicial de liberação de moléculas bioativas livres na membrana, possivelmente proteínas ou peptídeos antimicrobianos, cuja concentração efetiva tende a diminuir com o decorrer do tempo de exposição. Esses achados reforçam a hipótese de que a membrana amniótica exerce efeito antimicrobiano comparável ao do antibiótico ciprofloxacino, mesmo sem impregnação adicional. No entanto, é importante destacar que essa comparação se refere a ensaios *in vitro*, conduzidos com baixas

concentrações de ciprofloxacino, o que limita a interpretação direta dos resultados para condições clínicas.

A única exceção observada foi no ensaio de difusão em ágar, no qual foi identificada apenas uma zona de inibição discreta para o grupo MA, indicando a presença de efeito antimicrobiano, porém menos pronunciado e estatisticamente inferior quando comparado aos grupos MA-C e CIPRO. Essa atividade limitada da membrana no meio sólido pode estar relacionada às propriedades físico-químicas dos compostos liberados pela mesma, como peso molecular, solubilidade e taxa de difusão, fatores que influenciam diretamente a capacidade de se dispersar no ágar (HOSSAIN, 2024). Assim, é provável que haja a presença de compostos bioativos de maior peso molecular na membrana, apresentando difusão restrita no meio sólido, diferentemente das quinolonas, pequenas moléculas com difusão mais ampla no sistema utilizado.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com os achados de Dallal *et al.* (2021), que avaliaram o uso de MA humana criopreservada, isoladamente e impregnada com ciprofloxacino, na cicatrização dos estágios iniciais da ceratite por *P. aeruginosa* em coelhos. Os autores relataram que os grupos tratados com MA, MA impregnada com ciprofloxacino ou ciprofloxacino livre apresentaram 0% de perfuração corneana, enquanto o grupo controle apresentou 85,6% de perfuração. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com ciprofloxacino, MA impregnada com ciprofloxacino e MA isoladamente, indicando que a membrana, por si só, já exerce efeito antimicrobiano significativo.

No mesmo sentido, Mohammadpour & Sabet (2016), relataram que pacientes humanos com úlceras corneanas associadas à ceratite por *P. aeruginosa*, decorrente de infecção induzida pelo uso de lentes de contato, apresentaram resposta insatisfatória ao tratamento com antimicrobianos, desenvolvendo afinamento severo da córnea ou descemetocelose (úlceras de córnea profunda que expõem a membrana de Descemet). Diante desse quadro clínico, os pacientes foram submetidos à intervenção com MA (tipo de processamento do tecido não relatado) juntamente com a aplicação tópica de antimicrobianos. Como resultado, não houve ocorrência de perfuração corneana nem necessidade de transplante emergencial de córnea em nenhum dos olhos tratados. Os pacientes obtiveram bons resultados visuais pós-operatórios, melhora na espessura da córnea, documentada por tomografia de coerência óptica e

paquimetria, e ausência de complicações decorrentes da intervenção com MA.

Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo em meio sólido, Talmi *et al.* (1991), também aplicaram o teste de suscetibilidade de difusão em ágar em MA frescas obtidas de forma asséptica a partir de cesarianas, em linhagens de *Staphylococcus coagulase-positivo*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. Não foram observados a formação de halos de inibição ao redor da MA, no entanto, a inibição completa do crescimento de todos os organismos foi observada imediatamente abaixo dos discos da MA. Os autores acreditam que o efeito antimicrobiano da MA se deve à sua estreita aderência à superfície da ferida.

Similarmente, Tehrani *et al.* (2013), avaliaram as propriedades antibacterianas da MA frente a diferentes tipos de preservação. A propriedade antibacteriana da MA fresca foi comparada com a MA criopreservada e liofilizada pelo método de difusão em ágar usando linhagens de *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e diferentes tipos de linhagens de *E. coli*. As amostras formaram discretos halos de inibição - máximo de 5mm (*P. aeruginosa* – MA fresca) e mínimo de 0,7mm (*E. coli* – MA liofilizada)-, exceto para *S. aureus* e uma das linhagens de *E. coli*, o que indicou variância no efeito antibacteriano da MA dependendo do tipo e da linhagem bacteriana. As amostras criopreservadas e liofilizadas apresentaram efeitos inibitórios semelhantes, porém inferiores aos da MA fresca.

Segundo os autores, essa diferença pode estar relacionada à redução da atividade da elafina, um peptídeo antimicrobiano naturalmente presente na MA, durante os processos de preservação. A elafina atua inibindo serina peptidases, fatores de virulência relevantes em *P. aeruginosa*, o que explica a maior inibição bacteriana observada nas amostras frescas. Em corroboração a isso, foi realizado o teste de concentração de elafina, que evidenciou que os procedimentos de criopreservação e liofilização diminuíram significativamente a elafina em comparação com a MA fresco (TEHRANI *et al.*, 2013).

Essas observações corroboram a hipótese de que o processamento industrial da MA pode reduzir a viabilidade celular, mas não elimina suas propriedades antimicrobianas, sugerindo que o efeito antibacteriano está associado não apenas ao

conteúdo celular, mas também aos componentes da matriz extracelular. Dessa forma, resíduos de peptídeos antimicrobianos, como a elafina, além de moléculas presentes na membrana basal e na matriz extracelular podem ser responsáveis pelos efeitos antibacterianos da MA (TEHRANI *et al.*, 2013).

Conforme discutido acima, no trabalho de Talmi *et al.* (1991), a utilização de membrana amniótica fresca também não resultou na formação de halos de inibição no ágar, o que é semelhante ao observado no presente estudo com a AmnioTek™. E Tehrani *et al.* (2013) evidencia que o processamento industrial da MA pode resultar em inviabilização de partes ou maioria das células do tecido epitelial, no entanto, as propriedades antimicrobianas são mantidas. Já em condições de meio líquido, onde a difusão dos compostos bioativos é favorecida, a AmnioTek™ demonstrou atividade antimicrobiana significativa, comportamento semelhante ao relatado por Dallal *et al.* (2021) para membranas criopreservadas. Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o processamento da membrana amniótica AmnioTek™, por desidratação e esterilização por radiação gama, não comprometeu de forma significativa a atividade antimicrobiana intrínseca do tecido.

A análise por MEV demonstrou a preservação estrutural do tecido, uma vez que foi possível visualizar células epiteliais justapostas com morfologia poliédrica preservada, conforme também mostrado por Zhang *et al.* (2016). Também foi possível identificar a camada estromal, composta por fibras colágenas entrelaçadas formando uma rede fibrosa densa, de forma semelhante observada em outros estudos (ZHANG *et al.*, 2016; VO *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2021). As evidências observadas sugerem que a matriz amniótica manteve parte de suas propriedades estruturais originais, mesmo após o processamento industrial e após a inoculação bacteriana no meio de cultura.

Também, observou-se biofilmes de *P. aeruginosa* aderidos a superfície da membrana amniótica. Isso pode ser explicado devido a MA ser uma matriz biológica rica em proteínas estruturais e glicoproteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno, elastina, laminina, fibronectina e vitronectina que atuam como substratos de adesão (APLIN *et al.*, 1985; MOORE *et al.*, 2020; ELKHENANY *et al.*, 2022; HEYDARI *et al.*, 2024; RAYAT *et al.*, 2024). Assim, para microrganismos oportunistas, como *P. aeruginosa*, em que os biofilmes ocorrem em diversas superfícies, incluindo tecidos vivos, tubulações de sistemas de água potável ou industrial, em superfícies no

ambiente aquático natural e dispositivos médicos essas condições podem favorecer a colonização inicial da superfície biológica (MILLER & AHEARN, 1987; YASIR *et al.*, 2018; QIN *et al.*, 2022; DI PILATO *et al.*, 2023; JEYARAMAN *et al.*, 2023).

Além disso, observou-se em MEV algumas células de *P. aeruginosa* contendo a presença de vesículas superficiais, lesões na parede e sinais de extravasamento do conteúdo citoplasmático, alterações compatíveis com a ação de peptídeos/proteínas antimicrobianas sobre o envelope bacteriano (BRODGEN, 2005; HARTMANN *et al.*, 2010; BENFIELD & HENRIQUES, 2020). Essas moléculas podem induzir múltiplos tipos de estresse na membrana de bactérias Gram-negativas, mesmo em baixas concentrações (HARTMANN *et al.*, 2010; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022).

Dentre os peptídeos antimicrobianos previamente identificados na matriz amniótica, além da elafina discutida acima, destaca-se o LL-37 (LIM *et al.*, 2015; TEHRANI *et al.*, 2017; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022), que exerce sua ação antimicrobiana por meio da interação com componentes da parede celular bacteriana, promovendo desorganização estrutural e perfuração da membrana citoplasmática, o que resulta em lise e morte da célula bacteriana (SANCHO-VAELLO *et al.*, 2020). As β -defensinas (HBD1–4) (BUHIMSCHI *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2007; STOCK *et al.*, 2007; MAO *et al.*, 2017; TEHRANI *et al.*, 2017; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022) também estão presentes na MA e constituem peptídeos catiônicos (carregados positivamente) que se ligam inicialmente à superfície bacteriana por interações eletrostáticas. Essa ligação desencadeia desestabilização e permeabilização da membrana, comprometendo a integridade celular (MATHEW & NAGARAJ, 2017).

No grupo das proteínas com atividade antimicrobiana já descritas na membrana amniótica, encontram-se a SLPI (ZHANG *et al.*, 2001; STOCK *et al.*, 2007; MAO *et al.*, 2017; TEHRANI *et al.*, 2017), as histonas H2A e H2B (KIM *et al.*, 2002) e a lactoferrina (NIEMELÄ *et al.*, 1989).

A SLPI pode inibir as respostas ao LPS bacteriano, em parte devido à sua atividade antiprotease (JIN *et al.*, 1997). Além disso, a SLPI se liga ao LPS e interfere em sua captação por macrófagos, modulando a ativação inflamatória desencadeada por bactérias Gram-negativas (DING *et al.*, 1999). As histonas H2A e H2B também se ligam ao LPS bacteriano, neutralizando as endotoxinas (KIM *et al.*, 2002). A histona

H2B, possui intensa atividade lítica, sendo capaz de atravessar a membrana bacteriana e interagir diretamente com o DNA (HOEKSEMA *et al.*, 2016). Além disso, Doolin *et al.* (2020) demonstraram que a H2A consegue adentrar em *E. coli* e *S. aureus* por meio de poros previamente gerados pelos peptídeos antimicrobianos LL-37 e magainina-2. Uma vez no interior da célula, a H2A amplia os danos causados pelos AMPs, intensificando a permeabilização e a despolarização da membrana, além de comprometer sua capacidade de recuperação. No citoplasma bacteriano, a H2A promove reorganização do DNA cromossômico e suprime a transcrição global (DOOLIN *et al.*, 2020). Já a lactoferrina apresenta ação bacteriostática ao sequestrar íons ferro, que é essencial para o crescimento microbiano. Além disso, ela também pode atuar de forma bactericida, se ligando ao LPS bacteriano, aumentando a permeabilidade da membrana externa e favorecendo a ruptura celular (ORSI, 2004).

Conforme discutido acima, a atuação combinada entre diferentes proteínas e peptídeos gera efeitos sinérgicos que potencializam a atividade antimicrobiana da membrana (DOOLIN *et al.*, 2020; OLMOS-ORTIZ *et al.*, 2022).

No presente estudo, foi encontrado uma concentração aproximada de $50,3 \pm 5,13$ µg/mL de proteínas e/ou peptídeos presentes no extrato condicionado pela membrana amniótica. Para investigar se a atividade antimicrobiana e antibiofilme da MA estava relacionada a esses componentes, o extrato foi submetido ao tratamento com Proteinase K. A perda significativa da atividade antimicrobiana e antibiofilme após a digestão enzimática demonstra que os componentes responsáveis pelo efeito são sensíveis à proteólise, evidenciando que proteínas e/ou peptídeos bioativos atuam como os principais agentes antimicrobianos e antibiofilme presentes na MA. A Proteinase K, uma serina-protease de amplo espectro, é amplamente empregada para digestão proteica em estudos biomoleculares (YAZAWA *et al.*, 2016). Desse modo, o uso de Proteinase K é uma estratégia comumente empregada em estudos de fatores antimicrobianos proteicos justamente para confirmar essa origem, uma vez que a perda de atividade após o tratamento reforça que o efeito depende da presença dessas moléculas proteicas (HAYES *et al.*, 2006; DUSANE *et al.*, 2013; DE GIANI *et al.*, 2019).

Esses dados reforçam a hipótese levantada no presente trabalho de que a baixa difusão das substâncias antimicrobianas da MA no meio sólido é um fator

determinante para a discreta inibição observada nos ensaios de difusão em ágar ($7,67 \pm 6,81$ mm), quando comparado com a inibição significativa em meio líquido. Dessa forma, evidencia-se que o teste de difusão em ágar apresenta limitações para avaliar a atividade antimicrobiana da membrana amniótica, uma vez que a difusão restrita de moléculas bioativas, possivelmente de alto peso molecular, impede a geração do gradiente de concentração adequado para o efeito antimicrobiano (HOSSAIN, 2024), enquanto em meio líquido há maior liberação e dispersão das substâncias bioativas.

De forma semelhante, Tehrani *et al.* (2017) observaram que o método de difusão em ágar não proporciona condições adequadas para que a MA expresse suas propriedades antibacterianas. Segundo os autores, a difusão em ágar é o método mais comum para avaliar a propriedade antibacteriana da MA, portanto é necessário o desenvolvimento de métodos alternativos que possibilitem uma avaliação mais precisa e reprodutível da atividade antimicrobiana da membrana.

Vale ressaltar que este estudo apresenta algumas limitações, entre elas a quantidade reduzida de amostras disponíveis para os ensaios, o que impossibilitou a realização de experimentos adicionais de confirmação, bem como a ampliação dos testes para outras espécies e linhagens bacterianas. Além disso, não foram incluídas amostras de membrana amniótica fresca, liofilizada ou criopreservada, o que impediu a comparação direta da eficácia entre diferentes formas de processamento do tecido.

Para perspectivas futuras, recomenda-se a realização de análises do potencial de membrana bacteriana e espectrometria de massas ou outro ensaio analítico que permita identificar os componentes proteicos presentes no extrato da membrana, como ELISA, a fim de investigar com maior detalhe os mecanismos de ação envolvidos e identificar as moléculas bioativas presentes, respectivamente. Além disso, ensaios de microdiluição em caldo permitirão determinar a concentração inibitória mínima para o extrato da membrana amniótica.

Nesse contexto, o isolamento e a caracterização dos peptídeos antimicrobianos derivados da membrana amniótica abrem a perspectiva de seu desenvolvimento e escalonamento como candidatos a novos agentes antimicrobianos, com potencial aplicação terapêutica frente a bactérias patogênicas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a membrana amniótica humana desidratada AmnioTek™ apresenta atividade antimicrobiana intrínseca, capaz de inibir tanto o crescimento bacteriano quanto a formação e a manutenção de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Essa ação foi particularmente evidente em meio líquido, no qual a difusão dos compostos bioativos é favorecida, resultando em inibição significativa mesmo sem a adição de antimicrobianos externos.

A ausência de aumento expressivo da atividade antibacteriana após a impregnação da membrana com ciprofloxacino indica que o efeito observado decorre de componentes bioativos naturalmente presentes na matriz amniótica. A análise estrutural por MEV confirmou que a arquitetura tecidual permaneceu preservada após o processamento industrial, sustentando a capacidade da membrana de liberar moléculas bioativas, incluindo proteínas e peptídeos antimicrobianos, já caracterizados em estudos anteriores.

O tratamento do extrato condicionado pela membrana amniótica com Proteinase K resultou em perda significativa da atividade antimicrobiana, evidenciando que o efeito é dependente de componentes proteicos sensíveis à proteólise. Esse achado confirma a presença de peptídeos e proteínas bioativos no tecido, possivelmente incluindo moléculas já descritas na literatura, como LL-37, β -defensinas, elafina, SLPI, histonas e lactoferrina, cujos mecanismos de ação desestabilizam e permeabilizam a membrana bacteriana, em um processo potencializado pela ação sinérgica entre essas moléculas e provavelmente associado a uma liberação inicial de compostos bioativos, cuja efetividade tende a diminuir gradualmente com o tempo de exposição.

Em conjunto, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, aliados às evidências descritas na literatura baseada em relatos e séries de casos clínicos, indicam que a membrana amniótica desidratada apresenta atividade antimicrobiana intrínseca e potencial para uso como terapia adjuvante a antimicrobianos convencionais no manejo e prevenção de infecções.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH, Meghdad *et al.* Evaluation of factors influencing antibody reduction for development of antibody drug conjugates. **Iranian biomedical journal**, v. 21, n. 4, p. 270–274, 2017.

AENDEKERK, Séverine *et al.* The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. **Microbiology (Reading, England)**, v. 151, n. Pt 4, p. 1113–1125, 2005.

AKLE, C. A. *et al.* Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. **Lancet**, v. 2, n. 8254, p. 1003–1005, 1981.

APLIN, J. D.; CAMPBELL, S.; ALLEN, T. D. The extracellular matrix of human amniotic epithelium: ultrastructure, composition and deposition. **Journal of cell science**, v. 79, n. 1, p. 119–136, 1985.

AZUARA-BLANCO, A.; PILLAI, C. T.; DUA, H. S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **The British journal of ophthalmology**, v. 83, n. 4, p. 399–402, 1999.

BAKHTIAR, Hengameh *et al.* Human amniotic membrane extracellular matrix scaffold for dental pulp regeneration in vitro and in vivo. **International endodontic journal**, v. 55, n. 4, p. 374–390, 2022.

BENFIELD, Aurélie H.; HENRIQUES, Sónia Troeira. Mode-of-action of antimicrobial peptides: Membrane disruption vs. Intracellular mechanisms. **Frontiers in medical technology**, v. 2, p. 610997, 2020.

BINTE ATIQUE, Fahmida *et al.* Effects of gamma irradiation on bacterial microflora associated with human amniotic membrane. **BioMed research international**, v. 2013, p. 586561, 2013.

BISCHOFF, Mona *et al.* Growth factor and interleukin concentrations in amniotic membrane-conditioned medium. **Current eye research**, v. 42, n. 2, p. 174–180, 2017.

BOMFIM PEREIRA, Mário Genilhu *et al.* Cytokine dosage in fresh and preserved human amniotic membrane. **Cornea**, v. 35, n. 1, p. 89–94, 2016.

BRASIL. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). *Tabela de pontos de corte clínicos BrCAST–EUCAST para interpretação de testes de suscetibilidade antimicrobiana*. Versão 2024. São Paulo: BrCAST, 2024. Disponível em: <https://brcast.org.br>. Acesso em: 10 jan. 2026.

BRASIL. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). *Tabelas de controle de qualidade e conteúdo de discos (CQ) para testes de suscetibilidade antimicrobiana por disco-difusão – BrCAST–EUCAST*. Versão 15 mar. 2023. São Paulo: BrCAST, 2023. Disponível em: <https://brcast.org.br>. Acesso em: 10 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – Conitec. Relatório para a sociedade nº 528: Transplante de membrana amniótica. Brasília, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2025/sociedade/relatorio-para-sociedade-no-528-transplante-de-membrana-amniotica/view>. Acesso em: 21 jun. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SEC/TICS-MS nº 46, de 18 de junho de 2025. Diário Oficial da União: Seção 1, Brasília, DF, 18 jun. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/portaria/2025/portaria-sectics-ms-no-46-de-18-de-junho-de-2025>. Acesso em: 21 jun. 2025.

BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BUHIMSCHI, Irina A. *et al.* The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 191, n. 5, p. 1678–1687, 2004.

CHAPON-HERVÉ, V. *et al.* Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular microbiology**, v. 24, n. 6, p. 1169–1178, 1997.

CHEN, Hung-Chi *et al.* Amniotic membrane transplantation for persistent corneal ulcers and perforations in acute fungal keratitis. *Cornea*, v. 25, n. 5, p. 564-572, 2006.

CHOUDHARY, Narendra *et al.* Revisiting the role of amniotic membrane dressing in acute large traumatic wounds: A randomized feasibility study at a level 1 trauma centre. *Journal of emergencies, trauma, and shock*, v. 16, n. 3, p. 95–101, 2023.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (Brasil). Parecer CFM nº 12/2021, de 21 de outubro de 2021. Disponível em: <https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/pareceres/BR/2021/12>. Acesso em: 21 jun. 2025.

DALLAL, Mohammad Mehdi Soltan *et al.* Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects and ulceration due to *Pseudomonas* keratitis in a rabbit model. **Journal of ophthalmic & vision research**, v. 16, n. 4, p. 552–557, 2021.

DANIELESCU, Ciprian *et al.* Endogenous endophthalmitis: a review of case series published between 2011 and 2020. **Journal of Ophthalmology**, v. 2020, n. 1, p. 8869590, 2020.

DAVIES, D. G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5361, p. 295–298, 1998.

DE GIANI, Alessandra *et al.* Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. **AMB express**, v. 9, n. 1, p. 88, 2019.

DEHGHANI, Mehdi *et al.* Grafting with cryopreserved amniotic membrane versus conservative wound care in treatment of pressure ulcers: A randomized clinical trial. **Bulletin of emergency and trauma**, v. 5, n. 4, p. 249–258, 2017.

DI PILATO, Vincenzo; WILLISON, Edward; MARCHESI, Anna. The microbiology and pathogenesis of nonfermenting Gram-negative infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 537-544, 2023.

DING, A. *et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor interferes with uptake of lipopolysaccharide by macrophages. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4485–4489, 1999.

DIORIO-TOTH, Luke *et al.* Genomic surveillance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates reveals an additive effect of carbapenemase production on carbapenem resistance. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 3, p. e0076622, 2022.

DONLAN, Rodney M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DOOLIN, Tory *et al.* Mammalian histones facilitate antimicrobial synergy by disrupting the bacterial proton gradient and chromosome organization. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 3888, 2020.

DUAN, Kangmin; SURETTE, Michael G. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and rhl quorum-sensing systems. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4827–4836, 2007.

DUSANE, Devendra H. *et al.* Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e64501, 2013.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ) *et al.* Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. **EFSA journal**, v. 19, n. 6, p. e06651, 2021.

ELHENEIDY, Hossam *et al.* Amniotic membrane can be a valid source for wound healing. **International journal of women's health**, v. 8, p. 225–231, 2016.

ELKHENANY, Hoda *et al.* Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. **Stem cell research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 8, 2022.

FARHADIHOSSEINABADI, Behrouz *et al.* Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. sup2, p. 431–440, 2018.

FULCHER, T. P. *et al.* Demonstration of biofilm in infectious crystalline keratopathy using ruthenium red and electron microscopy. **Ophthalmology**, v. 108, n. 6, p. 1088–1092, 2001.

GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **Lancet**, v. 404, n. 10459, p. 1199–1226, 2024.

GHAFOOR, Aamir; HAY, Iain D.; REHM, Bernd H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5238–5246, 2011.

GHOLOPOURMALEKABADI, Mazaher *et al.* How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 46, n. 6, p. 1254–1271, 2020.

GRAPH PAD SOFTWARE. *GraphPad Prism* versão 8.0. San Diego: GraphPad Software, 2019. Disponível em: <https://www.graphpad.com>. Acesso em: 07 maio 2025.

GRZYWOCZ, Zofia *et al.* Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells in vitro. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 52, n. 3, p. 163–170, 2014.

GZH. Argentina e Uruguai doam pele para vítimas internadas após incêndio. Porto Alegre: GZH, 2013. Disponível em: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/geral/noticia/2013/01/argentina-e-uruguai-doam-pele-para-vitimas-internadas-apos-incendio-4028030.html>. Acesso em: 21 jun. 2025.

HAO, Y. *et al.* Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. **Cornea**, v. 19, n. 3, p. 348–352, 2000.

HARTMANN, Mareike *et al.* Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3132–3142, 2010.

HAYES, M. *et al.* Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 2260–2264, 2006.

HEYDARI, Parisa *et al.* Advances and impact of human amniotic membrane and human amniotic-based materials in wound healing application. **International journal of biological macromolecules**, v. 281, n. Pt 4, p. 136596, 2024.

HOEKSEMA, Marloes *et al.* Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. **Future microbiology**, v. 11, n. 3, p. 441–453, 2016.

HØIBY, Niels *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **International journal of oral science**, v. 3, n. 2, p. 55–65, 2011.

HOSSAIN, Tanim Jabid. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. **European journal of microbiology & immunology**, v. 14, n. 2, p. 97–115, 2024.

HUANG, Yu-Hsuan *et al.* Comparison between cryopreserved and dehydrated human amniotic membrane graft in treating challenging cases with macular hole and macular hole retinal detachment. **Journal of ophthalmology**, v. 2020, p. 9157518, 2020.

IDRIS, Farhana Nazira; NADZIR, Masrina Mohd. Multi-drug resistant ESKAPE pathogens and the uses of plants as their antimicrobial agents. **Archives of microbiology**, v. 205, n. 4, p. 115, 2023.

INGRALDI, Alison L.; AUDET, Robert G.; TABOR, Aaron J. The preparation and clinical efficacy of amnion-derived membranes: A review. **Journal of functional biomaterials**, v. 14, n. 10, p. 531, 2023.

ISPSurgical. Amniotek. Disponível em: <https://ispsurgical.com/amniotek/>. Acesso em: 21 jun. 2025

JADEJA, Niti B.; WORRICH, Anja. From gut to mud: dissemination of antimicrobial resistance between animal and agricultural niches. **Environmental microbiology**, v. 24, n. 8, p. 3290–3306, 2022.

JEYARAMAN, Umamakeshwari Dhanalakshmi *et al.* Characterization and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Non-fermenting Gram-negative Bacilli and Molecular Analysis of *Pseudomonas* Species from Respiratory Samples of Intensive Care Unit Patients in A Tertiary Care Hospital. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 2179-2188, 2023.

JIAO, Hongliang *et al.* Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis in vivo through the Bcl-2/caspase pathways. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 1, p. 467–473, 2012.

JIN, F. Y. *et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 417–426, 1997.

JIRSOVA, Katerina; JONES, Gary L. A. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. **Cell and tissue banking**, v. 18, n. 2, p. 193–204, 2017.

KAMALI, Esmat *et al.* Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC research notes**, v. 13, n. 1, p. 27, 2020.

KIM, Dae-Wi; CHA, Chang-Jun. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. **Experimental & molecular medicine**, v. 53, n. 3, p. 301–309, 2021.

KIM, Hun Sik *et al.* Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. **The journal of immunology**, v. 168, n. 5, p. 2356–2364, 2002.

KIM, Hun Sik *et al.* Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. **The journal of immunology**, v. 168, n. 5, p. 2356–2364, 2002.

KIM, Jae-Soon *et al.* Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. **Cornea**, v. 20, n. 7, p. 720-726, 2001.

KING, A. E. *et al.* Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. **Placenta**, v. 28, n. 2–3, p. 161–169, 2007.

KING, Anne E. *et al.* Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 9, p. 4426–4431, 2003.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301–306, 1954.

KLAMA-BARYŁA, Agnieszka *et al.* Use of human and animal amniotic membranes in local antibiotic therapy. **Journal of wound care**, v. 34, n. 6, p. 444–454, 2025.

KLAUSEN, Mikkel *et al.* Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Biofilm mushrooms with a twitch. **Molecular microbiology**, v. 50, n. 1, p. 61–68, 2003.

KOIZUMI, Noriko *et al.* Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current eye research*, v. 20, n. 3, p. 173-177, 2000.

KUBO, Masato *et al.* Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 42, n. 7, p. 1539-1546, 2001.

LAM, M.; EPSTEIN, A. Amniotic membranes and ocular surface repair – the new frontier. **Mvision**, n. 166, abr. 2021.

LAZZARO, Brian P.; ZASLOFF, Michael; ROLFF, Jens. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6490, p. eaau5480, 2020.

LI, Yixuan *et al.* The global epidemiology of ventilator-associated pneumonia caused by multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 139, p. 78-85, 2024.

LIM, Ratana; BARKER, Gillian; LAPPAS, Martha. Human cathelicidin antimicrobial protein 18 (hCAP18/LL-37) is increased in foetal membranes and myometrium after spontaneous labour and delivery. **Journal of reproductive immunology**, v. 107, p. 31–42, 2015.

LIMA, Jailton Lobo da Costa *et al.* Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 29, p. 310-316, 2017.

LLANES, Catherine *et al.* Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1797–1802, 2004.

- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.
- MA, Luyan *et al.* Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 3, p. e1000354, 2009.
- MAGATTI, Marta *et al.* Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 9, p. 2208–2218, 2012.
- MAO, Yong *et al.* Antimicrobial peptides secreted from human cryopreserved viable amniotic membrane contribute to its antibacterial activity. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 13722, 2017.
- MARANGON, Fabiana Bogossian *et al.* Incidence of microbial infection after amniotic membrane transplantation. **Cornea**, v. 23, n. 3, p. 264–269, 2004.
- MARSIT, Nagi M. *et al.* Validation and assessment of an antibiotic-based, aseptic decontamination manufacturing protocol for therapeutic, vacuum-dried human amniotic membrane. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 12854, 2019.
- MATHEW, Basil; NAGARAJ, Ramakrishnan. Variations in the interaction of human defensins with *Escherichia coli*: Possible implications in bacterial killing. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175858, 2017.
- MATSUKAWA, Masanori; GREENBERG, E. P. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4449–4456, 2004.
- MIHARA, Etsuko *et al.* Case of a large, movable bacterial concretion with biofilm formation on the ocular surface. **Cornea**, v. 23, n. 5, p. 513–515, 2004.
- MILLER, M. J.; AHEARN, D. G. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrophilic contact lenses and other substrata. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 8, p. 1392–1397, 1987.
- MISHRA, Biswajit; WANG, Guangshun. Individual and combined effects of engineered peptides and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 3, p. 58, 2017.
- MOHAMMADPOUR, Mehrdad; SABET, Fatemeh Alsadat. Long-term outcomes of amniotic membrane transplantation in contact lens-induced *Pseudomonas* keratitis with impending corneal perforation. **Journal of ophthalmic & vision research**, v. 11, n. 1, p. 37–41, 2016.
- MOORE, Marc C. *et al.* Biological characterization of dehydrated amniotic membrane allograft: Mechanisms of action and implications for wound care. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 108, n. 8, p. 3076–3083, 2020.

NIEMELÄ, A. *et al.* Lactoferrin in human amniotic fluid. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 4, n. 1, p. 99–101, 1989.

NIKNEJAD, H. *et al.* Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. **Placenta**, v. 34, n. 4, p. 340–345, 2013a.

NIKNEJAD, Hassan *et al.* Inhibition of HSP90 could be possible mechanism for anti-cancer property of amniotic membrane. **Medical hypotheses**, v. 81, n. 5, p. 862–865, 2013b.

NIKNEJAD, Hassan; YAZDANPANA, Ghasem. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. **Medical hypotheses**, v. 82, n. 4, p. 488–489, 2014.

NIKNEJAD, Hassan; YAZDANPANA, Ghasem; AHMADIANI, Abolhassan. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 3, p. 599–608, 2016.

OLMOS-ORTIZ, Andrea *et al.* Compartmentalized innate immune response of human fetal membranes against *Escherichia coli* choriodecidual infection. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 6, p. 2994, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Antimicrobial resistance. Genebra: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 13 maio 2025.

ORSI, Nicola. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 17, n. 3, p. 189–196, 2004.

PENG, Jianhe *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* develops Ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes. **Journal of proteomics**, v. 152, p. 75–87, 2017.

PINA-SÁNCHEZ, M.; RUA, M.; DEL POZO, J. L. Present and future of resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for treatment. **Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia**, v. 36 Suppl 1, p. 54–58, 2023.

PUYANA, Salomon *et al.* Using dehydrated amniotic membrane skin substitute in facial burns: Is there a outcome difference between adult and pediatric patients? **The journal of craniofacial surgery**, v. 31, n. 2, p. e145–e147, 2020.

QIN, Shugang *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 199, 2022.

RAGNI, Enrico *et al.* Amniotic membrane-mesenchymal stromal cells secreted factors and extracellular vesicle-miRNAs: Anti-inflammatory and regenerative features for musculoskeletal tissues. **Stem cells translational medicine**, v. 10, n. 7, p. 1044–1062, 2021.

RAMUTA, Taja Železnik *et al.* Antimicrobial activity of human fetal membranes: From biological function to clinical use. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 691522, 2021.

RAMUTA, Taja Železnik *et al.* The cells and extracellular matrix of human amniotic membrane hinder the growth and invasive potential of bladder urothelial cancer cells. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 554530, 2020.

RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep; MANDAL, Manabendra. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian journal of microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1701–1718, 2021.

RAYAT PISHEH, Hossein; DARVISHI, Ahmad; MASOOMKHAH, Seyed Saeid. Amniotic membrane, a novel bioscaffold in cardiac diseases: from mechanism to applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 12, p. 1521462, 2024.

REHMAN, Attika; PATRICK, Wayne M.; LAMONT, Iain L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 1, p. 1–10, 2019.

ROCHA, Antônio José *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, p. e19180503, 2019.

ROCHA, L. DE A. DA . *et al.*. Ventilator-associated pneumonia in an adult clinical-surgical intensive care unit of a Brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 80–85, fev. 2008.

RODRÍGUEZ-ARES, M. Teresa *et al.* Effects of lyophilization on human amniotic membrane. **Acta ophthalmologica**, v. 87, n. 4, p. 396–403, 2009.

ROY, Ranita *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018.

RS, Kellar; RB, Diller; AT, Vo A. T. Characterization and clinical applications of amniotic membranes. **Journal of pharmacology & clinical research**, v. 4, n. 4, 2017.

RUTHERFORD, Steven T.; BASSLER, Bonnie L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, p. a012427–a012427, 2012.

SABATER-CRUZ, N. *et al.* Pterygium surgery with lyophilized versus cryopreserved amniotic membrane graft. **Journal français d'ophtalmologie**, v. 46, n. 3, p. 258–265, 2023.

SALLENAVE, J. M. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. **Respiratory research**, v. 1, n. 2, p. 87–92, 2000.

SANCHO-VAELLO, Enea *et al.* The structure of the antimicrobial human cathelicidin LL-37 shows oligomerization and channel formation in the presence of membrane mimics. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 17356, 2020.

SANDONÀ, Martina *et al.* Amniotic membrane-derived stromal cells release extracellular vesicles that favor regeneration of dystrophic skeletal muscles. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 15, p. 12457, 2023.

SCHUERCH, Kaspar *et al.* Efficacy of amniotic membrane transplantation for the treatment of corneal ulcers. **Cornea**, v. 39, n. 4, p. 479–483, 2020.

SELL, Shawn *et al.* Comparison of persistent epithelial defect treatment with sutureless cryopreserved and dehydrated amniotic membrane. **American journal of ophthalmology**, v. 251, p. 32–42, 2023.

SINGH, Rita *et al.* Microbiological safety and clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 33, n. 4, p. 505–510, 2007.

SINGH, Rita; CHACHARKAR, M. P. Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. **Journal of tissue viability**, v. 20, n. 2, p. 49–54, 2011.

SINGH, Rita; SINGH, Durgeshwer; SINGH, Antaryami. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World journal of radiology**, v. 8, n. 4, p. 355–369, 2016.

ŠKET, Tina *et al.* Different Effects Of Amniotic Membrane Homogenate On The Growth Of Uropathogenic Escherichia coli, Staphylococcus aureus And Serratia marcescens. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 3365–3375, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS. SBQ e Fundação Ecarta se unem em busca da aprovação do uso de membrana amniótica em queimados. Disponível em: <https://www.sbqueimaduras.org.br/noticia/sbq-e-fundacao-ecarta-se-unem-em-busca-da-aprovacao-do-uso-de-membrana-amniotica-em-queimados>. Acesso em: 21 jun. 2025.

STOCK, Sarah J. *et al.* Natural antimicrobial production by the amnion. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 196, n. 3, p. 255.e1–6, 2007.

SUPOKAWATE, J.; KO, W. Comparison of cryopreserved amniotic membrane grafts versus dry amniotic membrane grafts combined with intraoperative mitomycin C for primary pterygium excision using fibrin glue technique. **EyeSEA**, v. 13, n. 2, p. 14-19, 2018.

TABATABAEI, Seyed Ali *et al.* A randomized clinical trial to evaluate the usefulness of amniotic membrane transplantation in bacterial keratitis healing. **The Ocular Surface**, v. 15, n. 2, p. 218-226, 2017.

TALMI, Y. P. *et al.* Antibacterial properties of human amniotic membranes. **Placenta**, v. 12, n. 3, p. 285–288, 1991.

TEHRANI, Fatemeh A. *et al.* Induction of antimicrobial peptides secretion by IL-1 β enhances human amniotic membrane for regenerative medicine. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 17022, 2017.

TEHRANI, Fatemeh A.; AHMADIANI, Abolhassan; NIKNEJAD, Hassan. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 293–298, 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC (Remel). Pseudomonas Isolation Agar: technical information and principles. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific, 2025. Disponível em: <https://www.thermofisher.com>. Acesso em: 10 jan. 2026.

TONG, Xingqi *et al.* RW-BP100-4D, a promising antimicrobial candidate with broad-spectrum bactericidal activity. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 815980, 2021.

TROENSEGAARD-HANSEN, E. Amniotic grafts in chronic skin ulceration. **Lancet**, v. 1, n. 6610, p. 859–860, 1950.

URWIN, Lucy *et al.* Corneal infection models: tools to investigate the role of biofilms in bacterial keratitis. **Cells**, v. 9, n. 11, p. 2450, 2020.

VASIL, M. L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **The journal of pediatrics**, v. 108, n. 5 Pt 2, p. 800–805, 1986.

WESTBROCK-WADMAN, S. *et al.* Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2975–2983, 1999.

WHITCHURCH, Cynthia B. *et al.* Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5559, p. 1487, 2002.

WINSTANLEY, Craig; O'BRIEN, Siobhan; BROCKHURST, Michael A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 5, p. 327–337, 2016.

WOLCOTT, Randall D. *et al.* Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. **Wound repair and regeneration**, v. 24, n. 1, p. 163-174, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization, 2024.

XIAO, Shune *et al.* Human acellular amniotic membrane incorporating exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells promotes diabetic wound healing. **Stem cell research & therapy**, v. 12, n. 1, p. 255, 2021.

YASIR, Muhammad; DUTTA, Debarun; WILLCOX, Mark D. P. Activity of Antimicrobial Peptides and Ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 17, p. 3843, 2020.

YASIR, Muhammad; WILLCOX, Mark Duncan Perry; DUTTA, Debarun. Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. **Materials**, v. 11, n. 12, p. 2468, 2018.

YAZAWA, Kenjiro *et al.* Derivatization of proteinase K with heavy atoms enhances its thermal stability. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 5, p. 3036-3046, 2016.

YIN, Changhong *et al.* Advances in development of novel therapeutic strategies against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 13, n. 2, p. 119, 2024.

YIN, Rui *et al.* Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 955286, 2022.

YONEYAMA, H.; SATO, K.; NAKAE, T. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to outer membrane stabilization. **Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 239–245, 1991.

ZELEN, Charles M. *et al.* A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers: Treatment of diabetic foot ulcers with dehydrated amniotic membrane allografts. **International wound journal**, v. 10, n. 5, p. 502–507, 2013.

ZHANG, Liying *et al.* An ultra-thin amniotic membrane as carrier in corneal epithelium tissue-engineering. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 21021, 2016.

ZHANG, Q. *et al.* Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid. **Molecular human reproduction**, v. 7, n. 6, p. 573–579, 2001.