

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TÉCNICA DE SECAGEM DA MEMBRANA AMNIÓTICA PARA A ANÁLISE POR FTIR-ATR

Maria Laura Ramos Mancilha, Mariana da Costa Magalhães Gonçalves, Gabriela Antonia Tie Calheiro, Felipe Santos de Almeida, Luciana Barros Sant'Anna.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, marialrmancilha@gmail.com, lucianabsa@gmail.com.

Resumo

A membrana amniótica (MA) é a camada mais interna das membranas fetais sendo composta por glicoproteínas, colágenos e fatores de crescimento que medeiam suas propriedades necessárias para aplicação na regeneração dos tecidos. Um método usado para a análise da composição química da MA é a espectroscopia vibracional do infravermelho (FTIR). Neste contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica de secagem da MA criopreservada, para a análise por FTIR-ATR da integridade estrutural nas suas diferentes faces, epitelial e mesenquimal. Para isto, membranas criopreservadas foram divididas nos grupos MA-Ar (secas a ar) e MA-Lio (liofilizadas). Em seguida foram posicionadas no espectrofotômetro para a obtenção e posterior análise dos espectros. Os resultados apresentaram bandas características dos componentes da MA, entretanto, observou-se também contaminação por glicerol no grupo MA-Lio, associado ao meio de preservação utilizado. Concluiu-se que a técnica de secagem a ar apresentou maior eficácia, preservando os componentes químicos da MA em ambos os lados.

Palavras-chave: Membrana Amniótica. Espectroscopia FTIR-ATR. Composição Biomolecular.

Área do Conhecimento: Biomedicina

Introdução

A membrana amniótica (MA) é a camada mais interna da placenta dividida em lado epitelial e mesenquimal e constitui-se de componentes estruturais e regenerativos únicos em conjunto em um só biomaterial, como fatores de crescimento, colágeno, glicoproteínas e moléculas bioativas (Leal-Marín *et al.*, 2021). Estes constituintes medeiam propriedades bioquímicas e biológicas incluindo efeitos anti-inflamatórios, antifibróticos, antimicrobianos, antimutagênicos e baixa imunogenicidade (Arrizabalaga; Nollert, 2018). Assim, tornando essencial a preservação da sua integridade para manutenção dos efeitos terapêuticos nas aplicações clínicas. Considerando a complexidade estrutural e bioquímica da MA a sua preservação vem sendo estudada para seu uso posterior em diferentes métodos, como a liofilização e criopreservação a -80°C , pois é possível que cada método afete de diferentes formas as propriedades, composição e potenciais da membrana amniótica (Fénelon *et al.*, 2021; Leal-Marín *et al.*, 2021).

A espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula através da radiação infravermelha, determinando parte da energia dos fótons que possuem frequências iguais às suas, nas quais as moléculas da amostra absorvem uma certa quantidade desta radiação. Assim, é possível a caracterização das vibrações por meio da análise do espectro formado, com o intuito de analisar a composição e estrutura química do tecido. Um dos métodos para a obtenção dos espectros é a FTIR com o acessório ATR (Attenuated Total Reflection), uma aplicação útil para líquidos, filmes poliméricos e semissólidos. O feixe infravermelho incide em um cristal de alto índice de refração e sofre um fenômeno denominado de reflexão interna total. Em cada reflexão parte da energia da luz escapa do cristal, na forma de uma onda evanescente a qual penetra superficialmente na amostra que está na superfície do cristal. Neste momento a intensidade da luz refletida é atenuada, ou seja, ocorre a refletância total atenuada. Assim, a absorção de luz pela amostra é traduzida no espectro infravermelho da amostra (Byrne *et al.*, 2020; van Haaren *et al.*, 2023).

Desse modo, este trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia da técnica de secagem da MA criopreservada, para a análise qualitativa em FTIR-ATR da sua composição e estrutura química, nas diferentes faces, epitelial e mesenquimal.

Metodologia

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo nº 5.172.755). Duas placentas humanas foram coletadas no Hospital Santa Casa de São José dos Campos/SP, com idade gestacional ≥ 39 semanas, advindos de cesárias eletivas e gestação normal, somente após aceite da gestante (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado) e os exames negativos para-HIV-1/2, hepatite B e C e sífilis. Em seguida, foi armazenada em saco plástico estéril e mantido sob refrigeração em torno de 10 a 15 °C até a retirada e transporte pelo pesquisador ao laboratório.

A MA foi destacada manualmente do cório materno sob condições estéreis, lavada extensivamente em solução fisiológica contendo 100 U/ml de penicilina, 100 Ug/ml de estreptomicina e anfotericina B. Em seguida, foram separadas duas amostras de cada placenta, ambas com de 3x9 cm², em dois grupos experimentais marcados de forma a possibilitar a identificação de seus lados, epitelial e mesenquimal: MA-Ar, referente a secagem a ar antecedendo a obtenção dos espectros, e MA-Lio, as quais foram liofilizadas e colocadas em contato direto com a superfície ATR. As amostras de ambos os grupos foram criopreservadas em meio DMEM/glicerol a -80°C.

As amostras do grupo MA-Ar foram descongeladas, lavadas em PBS 1X, sendo 5 lavagens de 5 min cada, para a retirada dos meios de preservação. Em seguida foram cortadas em fragmentos circulares de 1,5 x 1,5 cm² antecedendo a secagem por jato de ar à temperatura ambiente sobre o cristal de diamante para a obtenção dos espectros. Já as amostras do grupo MA-Lio foram liofilizadas por um período de aproximadamente 16h, após o descongelamento e lavagem das amostras em PBS 1X, sendo 3 lavagens de 10 min cada, para a remoção dos meios de preservação. O fragmento liofilizado de 3x9 cm² foi então cortado em 4 fragmentos de 1x1 cm² os quais foram sobrepostos um sobre o outro em cima do cristal de diamante pressionado sobre ele com uma força de 96% para a obtenção dos espectros de FTIR-ATR. Os espectros foram obtidos de 17 amostras de cada lado da membrana amniótica em cada grupo experimental, com o auxílio do equipamento Spectrum Two acoplado a um acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) de diamante/ZnSe (Perkin Elmer®). Os espectros foram coletados na região de 4000-500 cm⁻¹ em resolução de 4 cm⁻¹. O background foi realizado no módulo automático do equipamento. Os espectros foram avaliados com uso do software Origin. A suavização de ruído instrumental dos espectros obtidos foi realizada utilizando-se do filtro de Savitzky-Golay. Os polinômios de ordem 2 e janelas com 5 pontos se mostraram eficazes para remoção de ruídos sem alteração dos vales associados aos modos vibracionais.

Resultados

A análise dos espectros das amostras MA-Ar M demonstraram a presença de picos de Amida, sendo expressos pelos picos 3284 cm⁻¹ (Amida A), 3068 cm⁻¹ (Amida B), 1647 cm⁻¹ (Amida I) e 1539 cm⁻¹ (Amida II). No estudo do espectro da amostra MA-Ar E foi observado a presença de picos de Amida, sendo representados por 3301 cm⁻¹ (Amida A), 3082 cm⁻¹ (Amida B), 1633 cm⁻¹ (Amida I) e 1546 cm⁻¹ (Amida II) (Aksoy, 2018; Bryne, 2020). Em ambos os lados MA-Ar M e MA-Ar E foi encontrado modos vibracionais nos picos, sendo a amida A estiramento N-H e O-H, amida B estiramento N-H, amida I estiramento C=O e amida II apresentando deformação angular em N-H e C-N (Askoy, 2018; Bryne, 2020).

As bandas na região de 3000 cm⁻¹ são dominadas pelas bandas de água que apresentam estiramento O-H, comum em amostras biológicas (Phelan *et al.*, 2020). Já a região de fingerprint, que é a área diferencial da amostra, demonstrando picos únicos apresentada pelo espectro da amostra MA-Ar M sendo 1454 cm⁻¹, 1399 cm⁻¹, 13311 cm⁻¹, 1237 cm⁻¹, 1159 cm⁻¹ e 1075 cm⁻¹. Na análise da mesma região do espectro, porém da amostra MA-Ar E foram observados os picos 1454 cm⁻¹, 1402 cm⁻¹, 1338 cm⁻¹, 1238 cm⁻¹, 1204 cm⁻¹, 1160 cm⁻¹, 1079 cm⁻¹ e 1033 cm⁻¹. A região 1454, 2853, 2923 e 2957 cm⁻¹ encontram-se contendo estiramento entre C-H, sendo o pico 1454 cm⁻¹ relacionado à deformação angular de CH₂, a 2853 cm⁻¹ ao estiramento simétrico de CH₂, enquanto a banda 2923 cm⁻¹ está correlacionada a um estiramento assimétrico CH₂ e a banda 2957 cm⁻¹ relacionada ao estiramento assimétrico CH₃. (Askoy, 2018). As bandas 1237 cm⁻¹ e 1075 cm⁻¹ representam

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

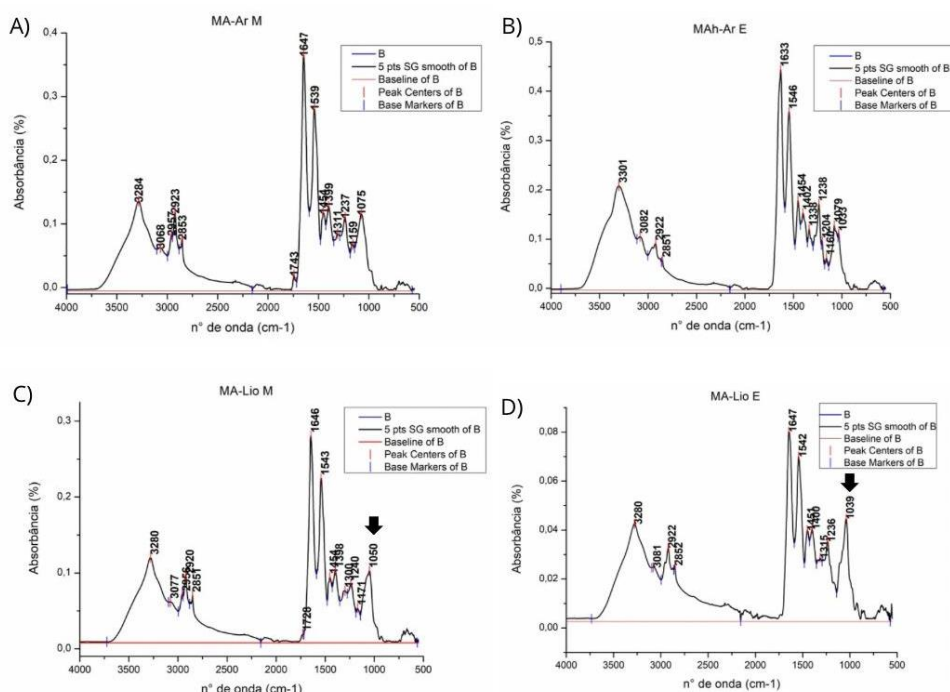
estiramento na ligação do composto PO-2, sendo o pico 1237 cm^{-1} um estiramento assimétrico desse composto, enquanto o pico 1075 cm^{-1} é derivado de um estiramento simétrico (Askoy, 2018; Nishida, et al, 2000). A banda 1159 cm^{-1} apresenta estiramento C-O e estiramento assimétrico CO-O-C. Já a banda 1399 cm^{-1} é correlacionada a ligação C-O derivado de um estiramento simétrico COO (Aksoy, 2018).

No espectro MA-Ar E o pico 1402 cm^{-1} apresenta estiramento simétrico de COO-, assim como na banda 1399 cm^{-1} (MA-Ar M), e no pico 1160 cm^{-1} (MA-Ar E) estiramentos assimétrico CO-O-C, da mesma forma que a banda 1159 cm^{-1} (MA-Ar M). O pico 1338 cm^{-1} (MA-Ar E) apresenta estiramento C-N e N-H da amida III, assim como o pico 1311 cm^{-1} (MA-Ar M) (Belbachir, 2009).

No espectro MA-Ar M encontra-se um pico único que não está localizado no lado epitelial, expresso em 1743 cm^{-1} que apresenta estiramento C=O (Askoy, 2018). Assim como no espectro MA-Ar E apresentou dois picos divergentes, sendo eles, 1204 cm^{-1} atribuído à Amida III, que resulta do estiramento C-N e da deformação angular N-H. (Grdadolnik, 2002), e o 1033 cm^{-1} que apresenta estiramento C-O-C (Chonanant, Chirapond et al. 2011).

Analisando os espectros das amostra MA-Lio E e MA-Lio M também foi possível observar os picos de Amida, sendo no grupo MA-Lio M expressos por 3280 cm^{-1} (Amida A), 3077 cm^{-1} (Amida B), 1646 cm^{-1} (Amida I) e 1543 cm^{-1} (Amida II), e no grupo MA-Lio E 3280 cm^{-1} (Amida A), 3081 cm^{-1} (Amida B), 1647 cm^{-1} (Amida I) e 1542 cm^{-1} (Amida II), apresentando os mesmos estiramentos expressos nos grupos MA-Ar M e E.

Figura 1- Resultado dos espectros dos grupos MA-Ar e MA-Lio



Fonte: Autores, 2025

Na amostra do grupo MA-Lio E (Figura 1- D) também foram identificadas bandas que se correlacionam com as amostras do grupo MA-Ar E em picos parecidos, sendo eles, 2922 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1315 cm^{-1} , 1236 cm^{-1} , com exceção do pico 1039 cm^{-1} (Figura 1-D), que representa a contaminação por glicerol advindo do meio de criopreservação. Na amostra do grupo MA-Lio M os picos também se relacionam com as amostras do grupo MA-Ar M, sendo expressas em 2956 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} , 1454 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} , 1171 cm^{-1} , com exceção da contaminação do glicerol marcada pelo pico 1050 cm^{-1} (Figura 1- B).

Discussão

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Para avaliar a composição química e estrutural da MA utilizando a técnica de FTIR-ATR, o presente estudo analisou as variações espectrais que podem ser causadas por diferentes métodos de secagem da MA antecedendo o momento da obtenção dos espectros, analisando sua composição por uma análise qualitativa e, a fim de analisar os grupos espectrais e replicabilidade metodológica.

Independentemente do tipo de amostra, a análise espectroscópica no infravermelho de materiais biológicos apresenta desafios comuns. Como a água é um componente essencial dessas amostras e apresenta forte absorção na região do infravermelho médio, é indispensável removê-la completamente antes do início das análises (Al-Kelani; Buthelezi, 2024). Para isso, as amostras secas ao ar ou sob fluxo de N_2 devem estar totalmente desidratadas antes da aquisição dos espectros. No entanto, nem sempre é simples determinar se a amostra está efetivamente seca. Assim, a inspeção dos espectros durante a secagem, como no presente estudo, sobretudo quando se utiliza ATR com a amostra posicionada sobre o cristal, pode auxiliar na verificação da presença residual de água ou da completa secagem do material (Al-Kelani; Buthelezi, 2024).

Em amostras biológicas, os compostos que apresentam mais interação com a radiação infravermelha, são as proteínas, gerando bandas vibracionais de amidas (Byrne *et al.*, 2020). No presente estudo, as proteínas representadas pela amida I, amida II, amida A e amida B são encontradas em ambos os lados, epitelial e mesenquimal da MA-Ar, assim como na MA-Lio. Essas bandas podem estar associadas a presença de colágeno e múltiplos fatores de crescimento contidos na composição da MA que desempenham papéis fundamentais em processos biológicos como cicatrização de feridas, apoptose, angiogênese, atividade antifibrótica e regeneração de tecidos (Arki *et al.*, 2023).

Ao comparar os espectros dos grupos MA-Ar E e MA-Ar M é possível observar que as bandas das proteínas aparentam ter maior intensidade no lado epitelial se comparado ao mesenquimal. O estudo realizado por Fathi; Miki, (2021) demonstrou que o lado epitelial apresenta atividade secretora de proteínas. O lado epitelial contém as células epiteliais amnióticas que possuem muitas microvilosidades em sua superfície apical, as quais estão associadas a função secretora ativa e funções de transporte intra e transcelular (Mamede *et al.*, 2012). Já o lado mesenquimal possui uma estrutura composta predominantemente por fibras colágenas tipo III, fibras reticulares, glicoproteínas hidratadas e glicoproteínas (Arki *et al.*, 2023).

O colágeno é um dos compostos encontrados em abundância na composição da MA, sendo subdividido nos tipos I, III, IV e V (Niknejad *et al.*, 2008). Segundo Belbachir *et al.* (2009), os colágenos do tipo I, III, IV, e V apresentam espectros no FTIR idênticos, tendo a presença das bandas de amida I e amida II, da banda 1454 cm^{-1} expressa na MA-Ar E e M e na amostra MA-Lio M, 1240 cm^{-1} na MA-Lio M e o pico 1079 cm^{-1} aparecendo na amostra MA-Ar E. A membrana basal que mantém a integridade da MA, ao mesmo tempo que fornece uma barreira permeável para macromoléculas contém em sua composição colágeno tipo III, IV e V e proteoglicanos como actina, α -actinina e espectrina.

Os Peptídeos são biomoléculas formadas por cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, que são mais curtas que as proteínas. Já os polipeptídeos possuem a mesma composição que os peptídeos, sendo os blocos de construção das proteínas. A membrana amniótica possui em sua composição principal uma cadeia polipeptídica de colágeno, laminina, fibronectina e elastina entrelaçada com cadeias polissacarídicas de glicosaminoglicano (Milyudin *et al.*, 2023).

As glicoproteínas são proteínas conjugadas que possuem uma ou mais cadeias laterais curtas e irregulares de heterossacarídeos ligadas covalentemente à cadeia polipeptídica. O conteúdo de carboidratos é geralmente menor do que em proteoglicanos (Cole *et al.*, 1988). São componentes de membranas celulares, matrizes intercelulares e fluidos extracelulares, como o plasma (Bhagavan; Ha, 2011). As glicoproteínas não colágenas contidas na MA são a laminina, fibronectina e nidogênio (Arrizabalaga; Nollert, 2018). A laminina representa a principal glicoproteína das membranas basais e uma fina matriz extracelular que promove crescimento e proliferação celular (Milyudin *et al.*, 2023).

Os glicolípídeos são biomoléculas formadas pela união de um carboidrato, (ex. glicose), e a galactose e um lipídio, (ex. ácidos graxos e ceramidas), sendo predominantes na monocamada externa da membrana plasmática das células. Suas principais funções incluem a proteção estrutural, estabilização celular e participação no reconhecimento e adesão celular. Os Ácidos graxos são componentes essenciais dos lipídeos com longas cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas. Eles funcionam como reserva de energia e são cruciais para a formação das membranas celulares, ajudando no transporte de vitaminas lipossolúveis e desempenhando papel na resposta imunológica.

Sendo assim, tanto os glicolipídios, quantos os ácidos graxos obtidos no espectro da MA podem ser associados as células epiteliais e mesenquimais presentes em seu arcabouço (Arki *et al.*, 2023).

Um estudo avaliando a MA in natura (Skopinska-Wisniewska *et al.*, 2023) por FTIR demonstrou bandas referentes as amidas I (1631 cm^{-1}) amida, II (1548 cm^{-1}), A (3298 cm^{-1}), B (3092 cm^{-1}), e colágeno, expresso em 1631 cm^{-1} , região que coincide com a amida I, dados esses, que corroboram com o presente estudo. Leal-Marín *et al.*, (2021), aponta que a MA possui moléculas bioativas. Em nosso estudo estas podem ser encontradas nas bandas 1238 cm^{-1} e 1079 cm^{-1} , que representam estiramentos relacionados ao composto PO_2 (Aksoy *et al.*, 2018). Dessa forma, segundo os espectros de ambos os lados da membrana é possível dizer que os picos 1237 cm^{-1} (MA-Ar M), 1238 cm^{-1} (MA-Ar E), 1075 cm^{-1} (MA-Ar M) e 1079 cm^{-1} (MA-Ar E) estão relacionados ao PO_2 , com contribuição de fosfolipídios e ácidos nucleicos (Askoy, 2018).

Biopolímeros derivados da membrana amniótica apresentam vantagens em relação aos materiais sintéticos, pois juntamente com uma estrutura bidimensional específica, possuem propriedades biologicamente ativas. A MA é considerada um biopolímero de escolha na medicina regenerativa, podendo ser conservada e desidratada pela técnica de liofilização (Milyudin *et al.*, 2023). Estudos mostram, que apesar da criopreservação a -80°C no meio DMEM glicerol apresentar ser um método válido para a preservação da MA (Rodríguez-Ares *et al.*, 2009). Milyudin *et al.* (2023) mostraram que a presença do composto glicerol em amostra liofilizada pode causar danos significativos às estruturas celulares e destruição da camada epitelial e da membrana basal. Em nosso estudo o espectro das amostras dos grupos MA-Lio E e MA-Lio M apresentou um pico único, 1039 cm^{-1} no lado epitelial e 1050 cm^{-1} no lado mesenquimal, achado que corresponde a contaminação por glicerol, encontrado no meio de criopreservação, e referente a banda 1028 cm^{-1} (Custódio *et al.*, 2022). A contaminação pelo glicerol pode ter tido contribuição para encobrir o espectro real da MA. A dificuldade para retirada do glicerol das amostras MA-Lio pode estar relacionada a lavagem realizada em cada grupo, a maior troca de PBS 1X com menor tempo de lavagem realizado em MA-Ar foi mais eficaz que as 3 lavagens de 10 min cada realizado no grupo MA-Lio.

Segundo Moraes *et al.*, (2021) o método de preservação da MA através da técnica de criopreservação a -80°C é eficaz, e garante que as fibras de colágeno I e III permaneçam integras. O estudo de Rodríguez-Ares *et al.* (2009) avalia os efeitos que a criopreservação e liofilização podem gerar na MA, considerando os fatores de crescimento que a compõem, relatam que apesar da liofilização manter as características morfológicas da MA com mínimas alterações, a dosagem total de proteínas e fatores de crescimento apresentam níveis menores quando comparadas com as MA criopreservada a -80° . Na análise visual dos espectros desse estudo, a MA-Lio M e MA-Lio E apresentaram intensidade de leitura inferior quando comparado à MA-Ar M e MA-Ar E.

Conclusão

A técnica de secagem a ar para a análise da MA criopreservada por FTIR-ATR apresentou maior eficácia do que a secagem por liofilização, uma vez que a liofilização impediu a remoção de todo o glicerol do meio de preservação e influenciou negativamente a integridade estrutural dos componentes da membrana amniótica. De acordo com as análises qualitativas dos grupos espectrais, para a conclusão da preservação dos componentes químicos da membrana e a quantidade deles é necessário realizar uma análise quantitativa.

Referências

AKSOY, Ceren; SEVERCAN, Feride. Infrared Spectroscopy and Imaging in Stem Cells and Aging Research. In: **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: Humana Press Inc., 2019. v. 2045 p. 201–215.

AL-KELANI, Madeha; BUTHELEZI, Ntandoyenkosi. Advancements in medical research: Exploring Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy for tissue, cell, and hair sample analysis. **Skin Research and Technology**, v. 30, n. 6, 17 jun. 2024.

ARKI, Mandana Kazem *et al.* **Amniotic Membrane and Its Derivatives: Novel Therapeutic Modalities in Liver Disorders**. **Cells** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2023.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

ARRIZABALAGA, Julien H.; NOLLERT, Matthias U. **Human Amniotic Membrane: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering**. *ACS Biomaterials Science and Engineering* American Chemical Society, , 9 jul. 2018.

BELBACHIR, Karima *et al.* Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 3, p. 829–837, 2009.

BHAGAVAN, N. V. ...; HA, Chung-Eun. **Essentials of medical biochemistry : with clinical cases**. [S.l.]: Elsevier/Academic Press, 2011.

BYRNE, Bernadette *et al.* ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging of proteins. In: **Vibrational Spectroscopy in Protein Research: from Purified Proteins to Aggregates and Assemblies**. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 1–22.

COLE, A. S.; EASTOE, J. E. **Biochemistry and Oral Biology - BIE**. [S.l.]: Butterworth Heinemann, 1988.

CHONANANT, Chirapond *et al.* Characterisation of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using synchrotron FTIR microspectroscopy. **The Analyst**, v. 136, n. 12, p. 2542–2551, 2011.

CUSTÓDIO, Andreza Cristiane *et al.* **Purificação Simplificada do Rejeito de Glicerina Bruta da Produção de Biodiesel da Biorrefinaria Berso-UFPE: Uma Prática Sustentável** Simple Purification Process of Waste Glycerol from Berso-Ufpe Biorefinary Biodiesel Production: A Sustainable Practice *Revista Brasileira de Geografia Física* *Revista Brasileira de Geografia Física* v. [S.l.: S.n.].

FATHI, Ibrahim; MIKI, Toshio. Human Amniotic Epithelial Cells Secretome: Components, Bioactivity, and Challenges. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 763141, 2021.

FÉNELON, Mathilde *et al.* **Applications of human amniotic membrane for tissue engineering**. *Membranes* MDPI AG, , 1 jun. 2021.

LEAL-MARIN, Sara *et al.* **Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage**. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* John Wiley and Sons Inc, , 1 ago. 2021.

MAMEDE, A. C. *et al.* Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 447–458, 18 ago. 2012.

MILYUDIN, Evgeny *et al.* Amniotic Membrane Biopolymer for Regenerative Medicine. **Polymers**, v. 15, n. 5, 1 mar. 2023.

NIKNEJAD, Hassan *et al.* **Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering**. *European Cells and Materials* AO Research Institute Davos, 2008.

RODRÍGUEZ-ARES, M. Teresa *et al.* **Efeitos da liofilização na membrana amniótica humana**. *Acta oftalmológica*, v. 87, n. 4, pág. 396–403, 2009.

SKOPINSKA-WISNIEWSKA, Joanna *et al.* Modification of the Human Amniotic Membrane Using Different Cross-Linking Agents as a Promising Tool for Regenerative Medicine. **Materials**, v. 16, n. 20, 1 out. 2023.

PHELAN, J., Altharawi, A., & Chan, K. L. A. (2020). **Tracking glycosylation in live cells using FTIR spectroscopy**. *Talanta*, 211(120737).

NISHIDA, Y. *et al.* FTIR spectroscopic analyses of human placental membranes. **Biopolymers**, v. 62, n. 1, p. 22–28, 2001.

VAN HAAREN, C.; De Bock, M.; Kazarian, S.G. Advances in ATR-FTIR Spectroscopic Imaging for the Analysis of Tablet Dissolution and Drug Release. **Molecules** 2023, 28, 4705.