ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS DIFERENTES REGIÕES DA MEMBRANA AMNIÓTICA UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA FTIR

Maria Laura Ramos Mancilha, Gabriela Antonia Tie Calheiro, Leandro Raniero, 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, gabriela.atie@hotmail.com, ljraniero@gmail.com, lucianabsa@gmail.com.

Resumo

A membrana amniótica (MA) é um tecido biologicamente ativo cujas faces epitelial e mesenquimal apresentam composições estruturais e de matriz extracelular distintas. Este trabalho teve como objetivo comparar a composição bioquímica de ambas as faces de quatro MA humanas frescas utilizando espectroscopia FTIR-ATR. A análise qualitativa dos perfis espectrais identificou bandas associadas a proteínas em ambas as faces, além de diferenças na região de *fingerprint*, relacionadas a componentes da matriz extracelular, carboidratos e constituintes lipídicos. A Análise das Componentes Principais (PCA) mostrou que 96,4% da variância espectral foi explicada pelas quatro primeiras componentes, evidenciando separação entre os grupos. Adicionalmente, a análise discriminante com validação cruzada apresentou taxa global de acerto de 97,9%, reforçando a diferenciação espectral entre as faces epitelial e mesenquimal da membrana amniótica. Dessa forma, os resultados demonstram a aplicabilidade da espectroscopia FTIR-ATR na caracterização do perfil molecular e na diferenciação bioquímica entre as faces da MA.

Palavras-chave: Membrana amniótica. Composição Bioquímica. Espectroscopia FTIR-ATR.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A membrana amniótica (MA) é a camada mais interna das membranas fetais, dividida em faces epitelial e mesenquimal com composições distintas (Leal-Marin *et al*., 2021). Sua composição estrutural e bioquímica é rica em uma diversidade de biomoléculas, como proteínas estruturais, colágenos e glicoproteínas (Niknejad *et al*., 2008). A membrana também apresenta lipídios associados às membranas celulares, carboidratos presentes em glicoproteínas e proteoglicanos, ácidos nucleicos derivados das células epiteliais e mesenquimais, bem como fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas bioativas que contribuem para processos de reparo tecidual, modulação inflamatória e regeneração celular (Mamede *et al*., 2012; Leal-Marin *et al*., 2021; Ruiz-Cañada *et al*., 2017).

Considerando a complexidade estrutural e a assimetria molecular da membrana amniótica, a caracterização de seus constituintes é fundamental para mapear sua organização bioquímica (Mamede *et al*., 2012; Niknejad *et al*., 2008). Enquanto a face epitelial se organiza como uma camada de células epiteliais sobre uma membrana basal especializada no crescimento celular e rica em glicoproteínas e colágeno Tipo IV (Hopkinson et al., 2006), na face mesenquimal a membrana extracelular (MEC) assume caráter estromal fibroso, abundante em colágenos do tipo I e III, além de compostos glicídicos, conferindo integridade mecânica e maleabilidade ao tecido (Okhovat *et al*., 2011; Vidal, 2010).

Assim, com o intuito de analisar a composição química e estrutural da MA, pode-se utilizar a espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A técnica baseia-se na absorção da radiação infravermelha por modos vibracionais moleculares, permitindo obter informações sobre grupos funcionais e sobre a composição química dos tecidos. A aquisição dos espectros pode ser realizada por meio da Refletância Total Atenuada (ATR) acoplada ao FTIR, que é a técnica mais adequada para a análise de tecidos biológicos. Nesse arranjo ótico, a reflexão interna total no cristal de ATR gera uma onda evanescente que penetra superficialmente na amostra e interage com seus constituintes moleculares. A absorção de radiação em frequências características reduz a

intensidade do feixe refletido, originando o espectro de absorção (Byrne *et al*., 2020; Stuart, 2004). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é comparar a composição química das faces da membrana amniótica.

Metodologia

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o protocolo n° 7.891.676. Quatro placentas humanas foram coletadas no Hospital Santa Casa de São José dos Campos/SP, com idade gestacional igual ou superior a 39 semanas, advindas de cesárias eletivas e gestação normal. A colheita da placenta e de suas membranas fetais, incluindo a MA, foi realizada somente após o consentimento prévio da parturiente (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado) e após a confirmação de exames negativos para HIV-1/2, hepatite B e C e sífilis. Em seguida, a placenta foi armazenada em saco plástico estéril pela enfermeira e mantida sob refrigeração a aproximadamente 10 °C até o transporte ao laboratório, realizado pelo pesquisador (mantendo-se entre 10 e 15°C).

A membrana amniótica foi obtida por separação manual do córion materno, sob condições estéreis, lavada extensivamente com solução fisiológica contendo 100 µg /ml de penicilina, 100 µg /ml de estreptomicina e anfotericina B. Em seguida, foram separados de três a quatro fragmentos de 3x9 cm², marcados de forma a possibilitar a distinção entre as faces epitelial e mesenquimal. As amostras foram armazenadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) na geladeira por 24h. Ao final do período de incubação, os fragmentos do grupo fresca foram lavados em PBS 1X, sendo três lavagens de cinco minutos cada. Em seguida, foram obtidos 12 fragmentos de 1,5 cm² de diâmetro cada, a partir da face epitelial e 12 fragmentos da face mesenquimal, provenientes dos fragmentos de 3 × 9 cm², totalizando 24 fragmentos por placenta. Considerando as quatro placentas analisadas, foram obtidos 96 fragmentos no total, sendo 48 da face epitelial e 48 da face mesenquimal. Cada fragmento foi submetido à análise individual por FTIR-ATR por secagem a jato de ar à temperatura ambiente sobre o cristal de diamante, resultando em um espectro por fragmento.

Os espectros foram obtidos utilizando o equipamento Spectrum Two acoplado a um acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) de diamante (PerkinElmer®). As medidas foram realizadas na região de 4000–500 cm^{-1}, com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 16 varreduras. O espectro do background foi obtido com o cristal de ATR limpo e exposto ao ar. Os espectros foram analisados no software OriginPro 8.5. A análise estatística multivariada incluiu a Análise de Componentes Principais (PCA) e a análise discriminante com validação cruzada, realizadas no software Minitab, em versão de avaliação.

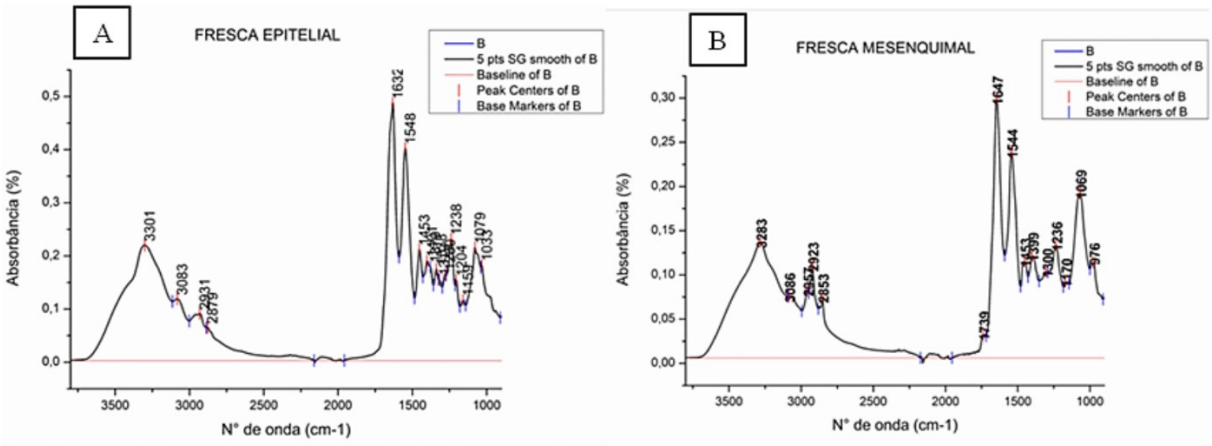
Resultados

A análise qualitativa dos espectros das amostras frescas em suas faces epitelial e mesenquimal demonstrou picos de Amida A, Amida B, Amida I e Amida II representados pelos picos 3300 cm^{-1} (Amida A); 3065 cm^{-1} (Amida B); 1639 cm^{-1} (Amida I) e 1545 cm^{-1} (Amida II), na qual em ambos os lados foram encontrados modos vibracionais nos picos, sendo a amida A correspondente aos estiramentos N-H e O-H, a amida B ao estiramento N-H, a amida I ao estiramento C=O e a amida II à deformação angular N–H e ao estiramento C–N (Aksoy, 2018; Byrne *et al*., 2020). Já na região de *fingerprint* da membrana amniótica, que é a área diferencial da amostra, estão agrupadas as bandas de colágeno I, III, IV, V e VI, amida III, ácidos nucleicos, grupo fosfodiéster, glico e fosfolipídios entre os picos 1453 a 1033 cm^{-1} da face epitelial e os picos 1453 a 976 cm^{-1} da face mesenquimal. Nesse intervalo, observam-se sutis deslocamentos de bandas entre as camadas, o que reflete variações conformacionais e assimetrias no microambiente molecular de cada face do tecido (Figura 1).

Além disso, foram observados picos exclusivos em cada face do tecido. Na face epitelial, identificaram-se os picos em 1204 cm^{-1} e 1280 cm^{-1}, ambos atribuídos à Amida III resultante do estiramento C-N e da deformação angular N-H. Enquanto o pico 1204 cm^{-1} se associa também às vibrações de grupos fosfatos e carboidratos, o pico 1280 cm^{-1} reflete predominantemente a estrutura da tripla hélice do colágeno, cujo pico sofreu um deslocamento de frequência na face mesenquimal (Movasaghi *et al*., 2008). Adicionalmente, identificou-se na face epitelial o pico em 1338 cm^{-1}, associado às deformações de CH_2 das cadeias de prolina presentes na estrutura do colágeno (Belbachir *et al*., 2009) e o pico 1033 cm^{-1}, exclusivo da face epitelial, apresenta estiramentos C-O e C-O-C associados a carboidratos e glicogênio e cadeias de glicosaminoglicanos (Aksoy, 2018). Por outro lado, a face

mesenquimal exibiu picos únicos, tais como o pico 976 cm^{-1}, atribuído ao estiramento simétrico de fosfato PO_4^{3-}, podendo apresentar contribuição de componentes da matriz extracelular (Movasaghi *et al*., 2008) e o pico 1739 cm^{-1}, que não é da região de *fingerprint*, mas é exclusivo da face mesenquimal e representa estiramentos C=O de ésteres de triglicerídeos e colesterol (Aksoy, 2018).

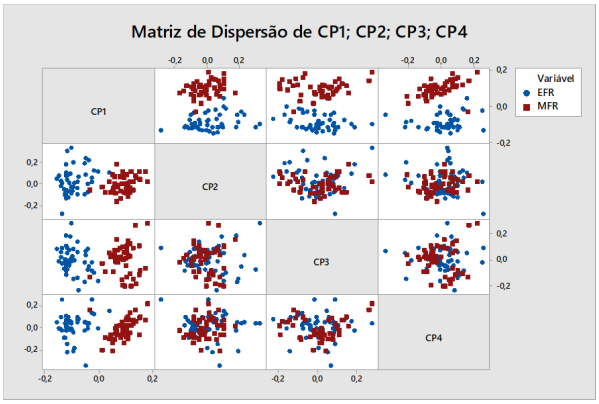
Figura 1 – Espectro FTIR-ATR das faces epitelial fresca (A) e face mesenquimal fresca (B)



Fonte: Autor, 2026

A análise estatística multivariada dos espectros de FTIR das membranas amnióticas frescas demonstrou diferenças significativas entre as faces avaliadas. A Análise das Componentes Principais (PCA) aplicada aos espectros de FTIR das membranas amnióticas frescas evidenciou que aproximadamente 96,4% da variância espectral foi concentrada e explicada nas quatro primeiras componentes. O gráfico de dispersão de CP1 versus CP2 (Figura 2) evidencia uma separação clara entre as faces Epitelial (EFR) e Mesenquimal (MFR), com separação principalmente na CP1.

Figura 2- Matriz de dispersão das 4 CPs considerando EFR e MFR do grupo MA fresca



Fonte: Autor, 2026

Corroborando esses achados, a análise discriminante com validação cruzada evidenciou uma elevada capacidade de diferenciação espectral entre as faces. Na matriz de confusão, 47 das 48 amostras de cada face foram corretamente classificadas, correspondendo a uma taxa global de acerto de 97,9% e reforçando a diferenciação entre os perfis espectrais das faces epitelial (EFR) e mesenquimal (MFR) das membranas frescas, conforme apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Matriz de confusão da análise discriminante dos espectros FTIR das faces EFR e MFR da membrana amniótica fresca

Alocado no Grupo	Grupo Verdadeiro	
	EFR	MFR
EFR	47	1
MFR	1	47
Total de N	48	48
N correto	47	47
Proporção	97,9%	97,9%

Fonte: Autor, 2026

Tabela 2: Desempenho da classificação das faces EFR e MFR por análise discriminante com validação cruzada

N	Correto	Proporção
96	94	97,9 %

Fonte: Autor, 2026

Discussão

Os achados deste estudo confirmam de forma clara a diferenciação bioquímica e estrutural entre as faces epitelial e mesenquimal. A separação espectral nítida obtida por FTIR, validada pelas análises de PCA e discriminante, corrobora a hipótese de que as faces possuem composições distintas.

O posicionamento anatômico das faces da membrana amniótica determina diretamente as variações bioquímicas e estruturais observadas. A face mesenquimal, também denominada matriz estromal, por estar em contato direto com o córion, apresenta uma organização voltada à resistência mecânica, formada por colágenos fibrilares do tipo I e III, proteoglicanos e elastina, servindo como um arcabouço fibroso que dá resistência e elasticidade à membrana (Mamede *et al.,* 2012; Niknejad *et al*., 2008; Okhovat et al., 2011). Essas características refletem-se nas bandas identificadas na região de *fingerprint*, especificamente em 1069 cm^{-1} e 976 cm^{-1}, compatíveis com compostos glicídicos e componentes da MEC, podendo estar relacionadas à presença de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, macromoléculas fundamentais para a organização, hidratação e suporte do estroma amniótico. Além disso, apresenta picos bem definidos de Amida I em 1647 cm^{-1} e Amida II em 1544 cm^{-1}, associadas à presença de proteínas estruturais (Vidal 2010; Mamede *et al.,* 2012; Mancilha *et al*., 2025).

Em contrapartida, a face epitelial caracteriza-se por uma monocamada de células epiteliais cúbicas simples assentada sobre uma membrana basal espessa, sendo composta por colágeno tipo IV, laminina, glicoproteínas e glicosaminoglicanos, além de citocinas e fatores de crescimento (Leal Marin *et al*., 2021). Na análise espectroscópica, a presença da camada epitelial celular e de componentes associados à membrana basal contribui para o perfil observado nos picos proeminentes em 1033, 1319 e 1159 cm^{-1}, na região de *fingerprint*, associados respectivamente a carboidratos estruturais, ácidos nucleicos e ligações glicosídicas de glicoproteínas (Aksoy, 2018; Belbachir *et al*., 2009). Dessa forma, além de ser uma barreira física de proteção, a face epitelial atua como um nicho dinâmico de sinalização, concentrando fatores biologicamente ativos, citocinas e inibidores naturais que promovem a modulação inflamatória e a regeneração tecidual (Ruiz-Cañada et al., 2017).

Além das variações proteicas, colágenas e glicídicas, os espectros revelaram divergências marcantes no perfil lipídico entre as duas faces, refletindo diferenças na sua composição celular e organização estrutural. Na face epitelial, a maior intensidade e o deslocamento das bandas de CH_2 e CH_3 para frequências mais altas (2931 e 2879 cm^{-1}) são biofisicamente explicados, uma vez que esse deslocamento reflete a transição das cadeias acílicas de hidrocarbonetos de uma conformação rígida

(all-trans) para arranjos dobrados e dinâmicos (gauche), que demonstram uma fase lipídica de maior mobilidade e desordem conformacional compatível com a alta densidade de vesículas secretoras (Lewis & McElhaney, 2013; Mamede et al, 2012).

Por outro lado, a face mesenquimal revela uma fase lipídica mais rígida e ordenada com picos em menores frequências (2923 e 2853 cm^{-1}), típica de um ambiente onde a celularidade é baixa e o estroma fibroso predomina. O caráter predominantemente fibrilar da MEC da face mesenquimal é também demonstrado pelo pico 1739 cm^{-1}, associado a constituintes lipídicos no perfil espectral da face mesenquimal (Movasaghi *et al*., 2008).

Conclusão

O perfil espectroscópico obtido por FTIR, aliado às análises multivariadas, evidenciou diferenças na composição bioquímica entre as faces epitelial e mesenquimal da membrana amniótica, corroborando a separação dos grupos observada na PCA. Dessa forma, os resultados demonstram a aplicabilidade da espectroscopia FTIR na caracterização do perfil molecular e na diferenciação bioquímica entre as faces da MA.

Como limitações do presente estudo, destaca-se o número reduzido de placentas analisadas. Além disso, embora a espectroscopia FTIR-ATR possibilite associar as bandas espectrais observadas a diferentes grupos e componentes bioquímicos, a técnica não permite identificar, de forma isolada e definitiva, cada molécula presente na amostra. Dessa forma, estudos futuros poderão avaliar de maneira mais específica os efeitos dos diferentes métodos de preservação sobre componentes como colágeno, lipídios, proteínas, glicosaminoglicanos (GAGs) e outros constituintes, bem como relacionar as alterações bioquímicas observadas às possíveis aplicações da membrana amniótica na medicina regenerativa.

Referências

AKSOY, C. et al. FTIR spectroscopy of biological tissues and cells: a review of chemical structure and spectroscopic features. **J. Spectrosc.**, v. 2018, p. 1-15, 2018.

BELBACHIR, K. et al. Characterization of collagen family members by Fourier transform infrared spectroscopy. Spectrochim. **Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 72, n. 5, p. 1022-1026, 2009.

BYRNE, H. J. et al. Vibrational spectroscopy of biological tissues and cells: principles, applications, and advancements. **Anal. Bioanal. Chem**., v. 412, n. 15, p. 3567-3582, 2020.

HOPKINSON, A. et al. Development of a second-generation amnion-based scaffold for ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 27, n. 28, p. 4933-4939, out. 2006.

LEAL-MARIN, S. et al. Human amniotic membrane: a versatile scaffold for tissue engineering and regenerative medicine. **Tissue Eng. Part B Rev**., v. 27, n. 4, p. 343-360, 2021.

LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Membrane lipid phase transitions and lipid-protein interactions studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochim. Biophys. **Acta Biomembr**., v. 1828, n. 10, p. 2347-2358, out. 2013.

MAMEDE, A. C. et al. Amniotic membrane: from biology to clinical application. **Cell. Mol. Life Sci**., v. 69, n. 15, p. 2551-2560, 2012.

MANCILHA, R. Caracterização espectroscópica e estrutural das faces epitelial e mesenquimal da membrana amniótica humana. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, 2025, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Univap, 2025. p. 1-6.

MOVASAGHI, A.; REHMAN, S.; REHMAN, I. O. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Appl. Spectrosc. Rev**., v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

NIKNEJAD, H. et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur. Cell. Mater**., v. 15, p. 88-99, 2008.

OKHOVAT, A. et al. Mechanical properties and structure of human fetal membranes. **J. Mech. Behav**. Biomed. Mater., v. 4, n. 7, p. 1435-1443, 2011.

RUIZ-CAÑADA, C. et al. Biological applications of human amniotic membrane. **Int. J. Mol. Sci**., v. 18, n. 10, p. 2236, 2017.

STUART, B. H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. 224 p.

VIDAL, B. C. Image analysis of collagen alignment and glycosaminoglycan structures in extracellular matrix using FTIR microspectroscopy. **Micron**, v. 41, n. 4, p. 330-339, 2010.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) ao presente trabalho (Processo FAPESP nº2025/00479-1). Além disso, agradecem também ao laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa da Profa. Dra. Luciana Barros Sant'Anna e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) pelo fornecimento das instalações, suporte técnico e pela infraestrutura laboratorial disponibilizada para a execução do trabalho.