

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Crosslinking de colágeno por extratos vegetais aquosos em córneas de
suínos**

ELIMAR MAYARA DE ALMEIDA MENEGOTTO

**Dourados - MS
2024**

ELIMAR MAYARA DE ALMEIDA MENEGOTTO

Crosslinking de colágeno por extratos vegetais aquosos em córneas de suínos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros

Dourados - MS
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M541c Menegotto, Elimar Mayara De Almeida

Crosslinking de colágeno por extratos vegetais aquosos em córneas de suínos [recurso eletrônico] / Elimar Mayara De Almeida Menegotto. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Marcio Eduardo de Barros.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Ceratocone. 2. Crosslinking corneano. 3. Extratos vegetais. 4. Calorimetria Exploratória Diferencial. I. Barros, Marcio Eduardo De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado APRESENTADA POR ELIMAR MAYARA DE ALMEIDA MENEGOTTO, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos cinco dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e quatro, às treze horas, em sessão pública, realizou-se na Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Crosslinking de colágeno por extratos vegetais em córneas de suínos**", apresentada pela mestranda Elimar Mayara de Almeida Menegotto, do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros/UFGD (presidente/orientador), Prof. Dr. Fabio Juliano Negroao/UFGD (membro titular interno), Prof.ª Dr.ª Ariany Carvalho dos Santos/UFGD (membro titular externo). Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**. A Presidente da Banca atesta a participação dos membros que estiveram presentes de forma remota, conforme declarações anexas. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dourados/MS, 05 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIO EDUARDO DE BARROS
Data: 05/03/2024 19:07:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcio Eduardo de Barros
Presidente/orientador
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO JULIANO NEGRAO
Data: 05/03/2024 18:07:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabio Juliano Negroao
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
gov.br ARIANY CARVALHO DOS SANTOS
Data: 05/03/2024 16:21:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.ª Dr.ª Ariany Carvalho dos Santos
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

(PARA USO EXCLUSIVO DA PROPP)

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/____, PELA PROPP/ UFGD.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que contribuíram para sua realização, tanto ativamente quanto prestando qualquer forma de apoio.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Marcio pela paciência e orientações a qualquer tempo e horário. Ao professor Jonas, pela preparação dos extratos e dicas valiosas para a pesquisa. Ao professor Claudio Teodoro, pela disponibilização do Laboratório de Controle de Qualidade e Análise Térmica e equipamentos necessários para a condução do trabalho. À professora Ariany, sempre solícita no fornecimento de insumos e colaboração na análise histológica. Ao Sr. Dirceu, diretor da Seara, pelo fornecimento dos olhos suínos destinados ao estudo, e às funcionárias Ana Paula e Luzia, que realizaram a coleta com muita boa vontade. Ao Hospital dos Olhos Dourados, por ter cedido sala cirúrgica e os equipamentos que eram necessários, bem como à equipe do administrativo, farmacêuticas e enfermagem, sempre dispostos a ajudar. À minha prima Sara, por ter utilizado seu tempo livre da faculdade de medicina para me auxiliar nos procedimentos, além de ter colaborado com as ilustrações deste trabalho. Ao Luiz Fellype, pelo apoio moral e na escrita. Ao colega Matheus, por todas as horas passadas comigo no laboratório de química, na realização das análises calorimétricas. À colega Aline, pela colaboração nas análises estatísticas e revisão do texto. À minha mãe, pela ajuda na organização dos materiais nos dias que antecediam os experimentos, bem como por todas as orações que destinou pelo sucesso deste estudo. A Deus, que concedeu esta oportunidade de aprimoramento pessoal e profissional, em um momento que eu não a esperava.

EPÍGRAFE

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.
Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(WALTER S. LANDOR).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Anatomia da túnica fibrosa do olho	16
Figura 2 – Corte histológico da córnea	17
Figura 3 – Ação da lisil-oxidase nas fibrilas de colágeno	18
Figura 4 – Ligações covalentes cruzadas, em detalhe	18
Figura 5 – Formas de crosslinking de colágeno	25
Figura 6 – Estrutura das proantocianidinas. Variam de subclasse conforme os “R(s)” apresentados.	32
Figura 7 – Representação do crosslinking. Ligação provável entre fibrilas de colágeno e grupos hidroxila da molécula orgânica por ligações de hidrogênio	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura de flavan-3-óis comuns e padrões de hidroxilação	32
Tabela 2 – Conteúdo de proantocianidinas de alimentos selecionados	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
CXL	<i>Crosslinking</i>
UVA	Ultravioleta-A
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimetria exploratória diferencial
PIO	Pressão intraocular
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PA	Proantocianidinas
T	Temperatura
H	Entalpia
DP	Desvio padrão
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
EO	<i>Euterpe oleracea</i> (açai)
VL	<i>Vitis labrusca</i> (uva)
CA	<i>Cinnamomum aromaticum</i> (canela)
SA	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (barbatimão)
TC	<i>Theobroma cacao</i> (cacau)
ATE	Ácido tânico equivalente
AGE	Ácido gálico equivalente
RE	Rutina equivalente

Crosslinking de colágeno por extratos vegetais aquosos em córneas de suínos

RESUMO

Ceratocone é uma doença progressiva que afeta a qualidade de vida dos pacientes, produzindo alterações na curvatura da córnea, causando astigmatismo irregular e piora da qualidade de visão. O *crosslinking* de colágeno da córnea, promovido pela riboflavina estimulada por luz ultravioleta A, aumenta a força biomecânica e resistência da córnea, sendo a intervenção atual que bloqueia efetivamente a progressão da doença. Suas limitações e efeitos colaterais, que estão principalmente relacionados à imprevisibilidade anatômica e exposição à radiação, são o motivo da busca por novos agentes reticuladores. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de cinco extratos aquosos de vegetais: polpa do açaí (*Euterpe oleracea*); semente de uva (*Vitis labrusca*); casca de canela (*Cinnamomum aromaticum*); casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*); e semente de cacau (*Theobroma cacao*), como indutores de *crosslinking* em córnea de suínos, visando uma possibilidade de tratamento alternativo para o ceratocone. Considerando que o aumento das ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno leva ao aumento na temperatura e entalpia de desnaturação dos materiais, a efetividade foi testada utilizando a calorimetria exploratória diferencial. Para esse estudo, as córneas suínas foram divididas em sete grupos: controle negativo, constituído por amostras de córneas não tratadas; controle positivo, onde as córneas foram tratadas com riboflavina 0,1% fotoestimulada com radiação ultravioleta A, conforme protocolo padrão; e cinco experimentais, onde as amostras foram submetidas ao tratamento com o respectivo extrato aquoso a 4% por 2 horas. Após tratadas, as córneas dos sete grupos foram avaliadas quanto ao perfil de desnaturação térmica e alterações histológicas; e os extratos passaram por análise de composição química. Foi verificado que os valores de temperatura e entalpia de desnaturação de quatro grupos de córneas reticuladas aumentaram significativamente em relação ao controle negativo, sendo o grupo tratado com riboflavina, e com os extratos aquosos da casca de barbatimão e da semente de uva e de cacau. Ainda, os grupos destes três extratos apresentaram temperaturas equivalentes às córneas tratadas com o protocolo padrão, e apresentaram maiores teores de taninos em sua composição entre os grupos estudados. Nenhum dos extratos causou alterações histológicas significativas, havendo redução significativa da contagem de ceratócitos apenas no grupo controle positivo, efeito colateral já conhecido do *crosslinking* padrão. Assim, conclui-se que os extratos aquosos da casca do barbatimão e da semente de uva e cacau, foram eficazes em promover *crosslinking* de colágeno nas córneas suínas de forma semelhante ao

tratamento convencional, o que possivelmente relaciona-se com os taninos presentes em sua composição. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para identificar as moléculas presentes nestes extratos que foram responsáveis por este efeito, sendo alternativas promissoras de tratamento para o ceratocone.

Palavras-chave: Ceratocone. *Crosslinking* corneano. Extratos vegetais. Calorimetria Exploratória Diferencial.

Collagen crosslinking by aqueous plant extracts in porcine corneas

ABSTRACT

Keratoconus is a progressive disease that affects patients' quality of life, causing changes in corneal curvature, resulting in irregular astigmatism and deterioration of vision quality. Corneal collagen crosslinking, promoted by riboflavin stimulated by ultraviolet A light, increases the biomechanical strength and resistance of the cornea, being the current intervention that effectively blocks the progression of the disease. The limitations and side effects, primarily associated with anatomical unpredictability and exposure to radiation, are driving the search for new cross-linking agents. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of five aqueous vegetable extracts: açai pulp (*Euterpe oleracea*); grape seeds (*Vitis labrusca*); cinnamon bark (*Cinnamomum aromaticum*); barbatimão bark (*Stryphnodendron adstringens*); and cocoa beans (*Theobroma cacao*), as crosslinking inducers in pig corneas, aiming at a possible alternative treatment for keratoconus. Considering that the increase in crosslinks among collagen fibrils leads to an increase in the temperature and enthalpy of denaturation of the materials, the effectiveness was tested using differential scanning calorimetry. For this study, porcine corneas were divided into seven groups: negative control, consisting of untreated cornea samples; positive control, where the corneas were treated with 0.1% riboflavin photostimulated with ultraviolet A radiation, according to the standard protocol; and five experimental, where the samples were subjected to treatment with the respective 4% aqueous extract for 2 hours. After being treated, the corneas from the seven groups were evaluated for their thermal denaturation profile and histological changes; and the extracts underwent chemical composition analysis. It was verified that the denaturation temperature and enthalpy values of four crosslinked cornea groups significantly increased compared to the negative control, with the group treated with riboflavin, as well as those treated with aqueous extracts of barbatimão peel, grape seeds and cocoa beans. Furthermore, the groups of these three extracts presented temperatures equivalent to the corneas treated with the standard protocol and had higher levels of tannins in their composition analysis among the groups studied. None of the extracts caused significant histological changes, with a significant reduction in keratocyte counts only in the positive control group, a known side effect of standard crosslinking. Thus, it is concluded that the aqueous extracts of barbatimão peel, grape seeds and cocoa beans were effective in promoting collagen crosslinking in porcine corneas similarly to conventional treatment, which possibly relates to the tannins present in their composition. However, further

studies are needed to identify the molecules present in these extracts that were responsible for this effect, being promising alternative treatment options for keratoconus.

Keywords: Keratoconus. Corneal crosslinking. Plant extracts. Differential Scanning Calorimetry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Córnea	16
2.1.1 Histologia	17
2.1.2 Funções	20
2.2 Ceratocone	20
2.3 <i>Crosslinking</i>	23
2.3.1 Efetividade	25
2.3.1.1 DSC	25
2.3.1.2 Degradação enzimática	26
2.3.1.3 Ensaios mecânicos	28
2.3.2 Segurança	29
2.4 Plantas medicinais	30
2.4.1 Proantocianidinas	31
2.4.2 Açaí	34
2.4.3 Barbatimão	35
2.4.4 Semente de uva	37
2.4.5 Canela	39
2.4.6 Cacau	40
3 OBJETIVOS	42
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
5 APÊNDICES	52
5.1 Artigo 1: <i>Crosslinking</i> de colágeno por extratos vegetais em córneas suínas	53
6 CONCLUSÕES	75
7 ANEXOS	76
7.1 Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais	77

1 INTRODUÇÃO

A córnea é um tecido ocular transparente e avascular localizado na porção anterior do globo ocular, com funções refrativas e mecânicas. Divide-se em camadas, sendo o estroma a de espessura mais significativa. Suas células são denominadas ceratócitos, e as principais biomoléculas presentes são as fibrilas de colágeno e os proteoglicanos (BERSANETTI *et al.*, 2019).

As propriedades físico-químicas e biomecânicas corneanas estão principalmente relacionadas com a composição e organização das fibrilas de colágeno, as quais são estabilizadas por ligações cruzadas intermoleculares covalentes, fornecendo resistência à tração e bioestabilidade (DANILOV *et al.*, 2008). Na doença conhecida como ceratocone, estas propriedades são afetadas, causando redução de sua rigidez e alterando a curvatura da córnea, a qual assume um formato cônico, que gera alta miopia e astigmatismo irregular, com perda da qualidade de visão (BERSANETTI *et al.*, 2019; DA CRUZ *et al.*, 2018; RABINOWITZ, 1998; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010).

O *crosslinking* de colágeno da córnea (CXL), descrito inicialmente por Wollensak, Spoerl, e Seiler (2003a), é o único tratamento disponível na oftalmologia que visa desacelerar ou interromper a progressão da doença (WOLLENSAK *et al.*, 2003a). O procedimento convencional (protocolo de Dresden) combina uma substância fotorreagente (riboflavina) e luz ultravioleta A (UVA), em reação fotoquímica que leva à indução de ligações covalentes (*crosslinking*) entre as fibrilas de colágeno no estroma corneano, aumentando assim a estabilidade mecânica e bioquímica das córneas tratadas (DHAWAN *et al.*, 2011; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010; SANTHIAGO, 2017; ZEITOUNE *et al.*, 2020). Embora o CXL apresente resultados positivos, possui ainda limitações relacionadas a exposição à luz UVA, potencialmente citotóxica e mutagênica (O'BRART, 2017), causando danos no plexo nervoso subepitelial, ceratócitos e endotélio (ZARE *et al.*, 2016), não sendo recomendado se a paquimetria for menor que 400 micra (WOLLENSAK *et al.*, 2003b).

Dessa forma, agentes reticuladores naturais que não necessitem de estimulação da luz têm sido testados com o objetivo de enrijecimento da córnea como alternativa ao protocolo padrão. As proantocianidinas, por exemplo, compostos polifenólicos também conhecidos como taninos condensados, exibem potencial para gerar estruturas estáveis com ligações de hidrogênio. Estudos de extratos vegetais ricos em proantocianidinas já foram conduzidos com o açaí e a casca do barbatimão, apresentando resultados promissores (BERSANETTI *et al.*, 2017, 2019, 2023; DA CRUZ *et al.*, 2018; ZEITOUNE *et al.*, 2020).

Na existência de outros produtos vegetais com teores mais elevados de proantocianidinas, como semente de cacau, casca de canela e semente de uva (BHAGWAT; HAYTOWITZ, 2015), no presente estudo, seus extratos foram somados aos da polpa do açaí e da casca do barbatimão, e ao tratamento convencional, para tratamento de córneas suínas, visando seu enrijecimento e futuras aplicações no tratamento do ceratocone. A efetividade como indutores de *crosslinking* foi verificada através da calorimetria exploratória diferencial, visto que o aumento do número de ligações cruzadas gerada pelos compostos levará à maior estabilização da estrutura de colágeno, com conseqüente aumento da temperatura e entalpia de desnaturação (BERSANETTI *et al.*, 2023).

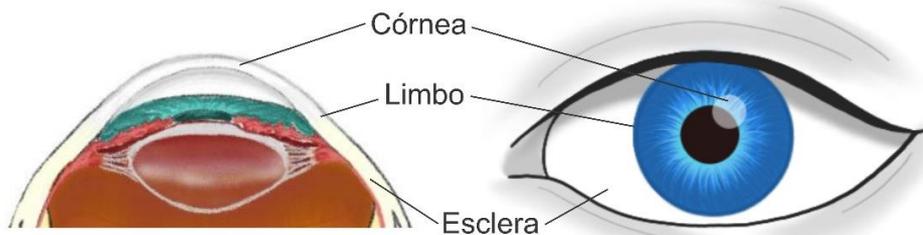
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Córnea

O olho é um dos órgãos mais complexos do corpo humano e sua principal função é converter a luz em sinais elétricos para processamento neural. Embora todas as estruturas sejam importantes, a córnea fornece a maior parte do poder refrativo do olho e, portanto, desempenha um papel significativo na formação da imagem (AMBEKAR *et al.*, 2011).

A córnea é um tecido ocular transparente e avascular, altamente estruturado, localizado na porção anterior do globo ocular, unida à esclera pelo limbo, juntas compondo a túnica fibrosa do olho (Figura 1). Sua forma é de um menisco elíptico, maior no eixo horizontal (11 a 12,5 mm) e com o vertical mais curto (10 a 11,5 mm). A espessura da córnea aumenta do centro (em média 0,52 mm) em direção à periferia, até atingir 0,7 mm no limbo (VIEIRA; HÖFLING-LIMA, 2013). O formato da córnea é proladado, sendo mais plana na periferia e mais curva na região central, o que a torna esférica (FARAJO *et al.*, 2011).

Figura 1: Anatomia da túnica fibrosa do olho.

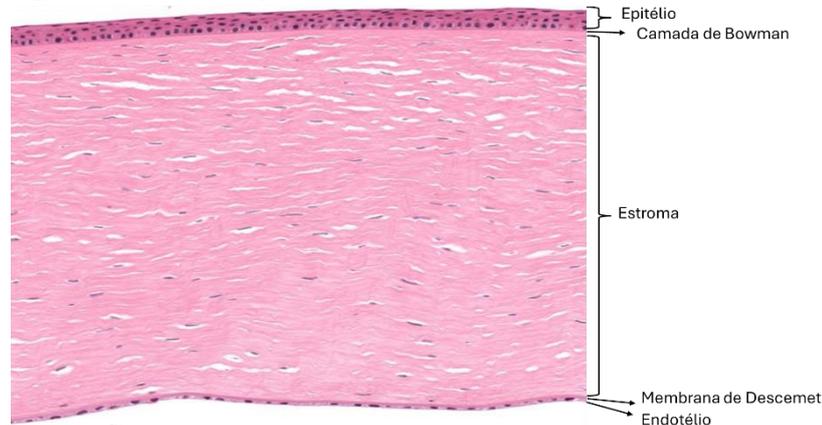


Fonte: Adaptado de <https://www.allaboutvision.com/pt-br/anatomia-ocular/iris-uvea-coroideal/> por Sara Vanessa Braatz de Almeida, 2023.

2.1.1 Histologia

A córnea é composta por 5 camadas, do lado anterior ao lado posterior, há o epitélio, a camada de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (TIDU *et al.*, 2020).

Figura 2- Corte histológico da córnea.



Fonte: Adaptado pelo autor de Sorenson; Brelje (2023)

O epitélio da córnea tem cerca de 50 μm de espessura e é constituído por epitélio escamoso estratificado não queratinizado, com 5 a 7 camadas de células, sendo uma basal, e duas a três aladas e superficiais. Ocorre constante processo de diferenciação das células epiteliais basais, formando as superficiais em um período de 7 a 14 dias. As células basais secretam a membrana basal, com 50 nm de espessura, composta principalmente de colágeno tipo IV (SRIDHAR, 2018; VIEIRA; HÖFLING-LIMA, 2013).

A membrana de Bowman situa-se imediatamente anterior ao estroma e não é uma membrana verdadeira, é um condensado acelular de colágeno (Tipo I e V) e proteoglicanos. Sua estrutura possui 12 μm e ajuda a córnea a manter sua forma. Não tem capacidade regenerativa, portanto, quando ferida, pode resultar em cicatriz (SRIDHAR, 2018).

O estroma representa 70% do peso da córnea desidratada e é composto pela matriz extracelular, ceratócitos e fibras nervosas. O componente celular ocupa 2-3% do volume. A matriz extracelular é composta por colágeno e proteoglicanos. O colágeno é primariamente do tipo I, e em menor quantidade dos tipos II, V e VI, sendo produzidos pelos ceratócitos (DANTAS, 2013a; VIEIRA; HÖFLING-LIMA, 2013).

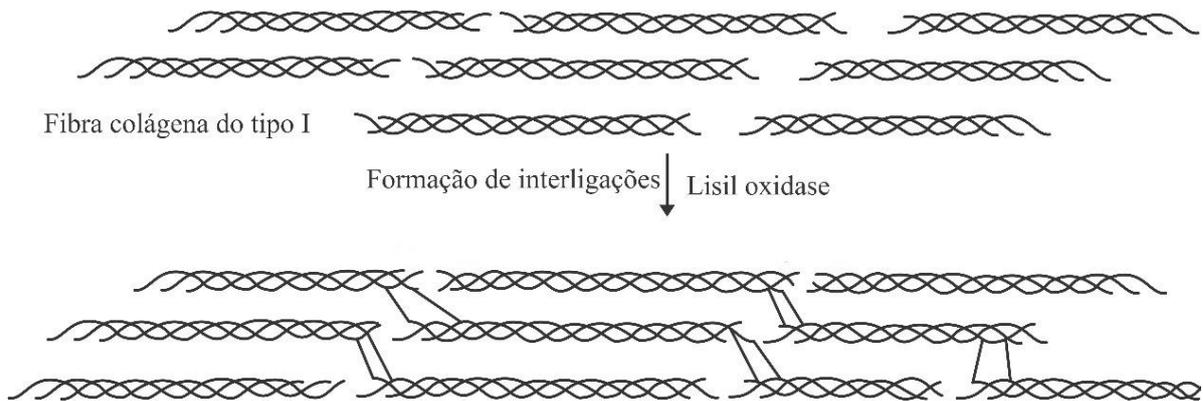
Os ceratócitos são uma população única de células que povoam o estroma da córnea. São mitoticamente quiescentes, exibem uma morfologia dendrítica com extensos contatos intercelulares e junções comunicantes. Organizados como redes entre as lamelas estromais com pequenos corpos celulares compactos, minimizam a dispersão da luz. São essenciais para o desenvolvimento e manutenção das propriedades únicas do estroma, pois sintetizam

componentes da matriz estromal, ou seja, colágenos e proteoglicanos, que substituem a matriz extracelular rica em hialuronato/água pela matriz extracelular fibrilar colagenosa densamente compactada (ESPAÑA; BIRK, 2020).

O colágeno tem uma estrutura característica que consiste em três cadeias de aminoácidos que se unem em espirais para formarem uma hélice tripla. Existem cerca de 20 espécies de cadeias alfa, que variam de acordo com os tipos de colágeno. A molécula de colágeno tipo I possui duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2. Essas cadeias peptídicas se enrolam e estão unidas entre si por pontes de hidrogênio. As moléculas individuais formam ligações naturais criando longos agrupamentos de moléculas paralelas, que são as fibrilas de colágeno (Figura 2) (DANTAS, 2013a).

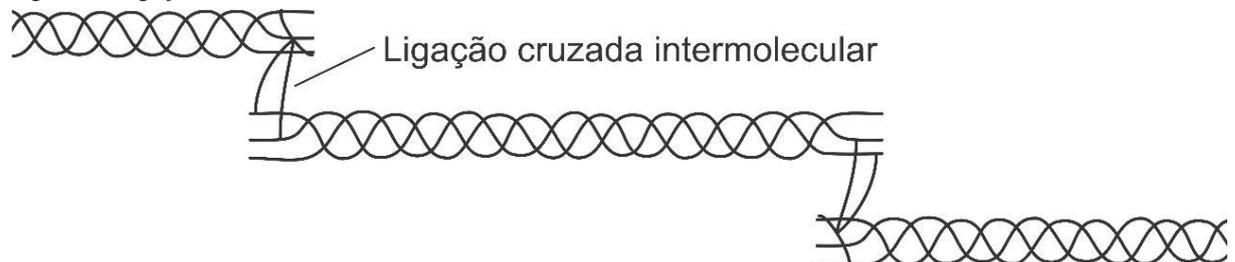
O arranjo fibrilar de moléculas de colágeno serve de substrato para a lisil-oxidase, enzima que desmina oxidativamente alguns resíduos lisil e hidroxilisil do colágeno, gerando aldeídos reativos (alisina e hidroxilisil) que se condensam com outros do mesmo tipo nas moléculas de colágeno vizinhas, gerando ligações covalentes cruzadas (Figura 3). Estas, são essenciais para a resistência do tecido. Portanto, qualquer mutação que interfira com a capacidade do colágeno de formar ligações cruzadas entre as fibrilas, afetará sua estabilidade (DANTAS, 2013a).

Figura 3- Ação da lisil-oxidase nas fibrilas de colágeno



Fonte: Adaptado de Dantas (2013a, p. 462)

Figura 4- Ligações covalentes cruzadas, em detalhe



Fonte: Adaptado de Dantas (2013a, p. 460)

Entre as fibras colágenas são encontrados vários glicosaminoglicanos, sendo o mais frequente o queratan sulfato (65%), que apresentam capacidade de reter água. O lumican, associado ao queratan sulfato, e decorin com o dermatan sulfato, são os principais proteoglicanos estromais (VIEIRA; HÖFLING-LIMA, 2013). O volume ocupado pelos glicosaminoglicanos nos proteoglicanos em torno das fibrilas de colágeno depende em grande parte do conteúdo de água na matriz, que precisa ser mantido em limites bem estreitos para manter o espaçamento regular e constante, ideal para a transparência (DANTAS, 2013a).

Desta forma, o estroma da córnea tem um arranjo altamente organizado de fibrilas de colágeno de pequeno diâmetro que são separadas por uma matriz de proteoglicanos que mantém o espaçamento interfibrilar uniforme (KOTECHA, 2007). Essas fibrilas são ainda organizadas em feixes planos, ou lamelas. Em torno de 300-500 lamelas, que são geralmente paralelos à superfície da córnea e são os principais responsáveis pelas propriedades mecânicas de tração na córnea (RUBERTI; ZIESKE, 2008). As lamelas variam em número ao longo da superfície da córnea, de aproximadamente 300 centralmente para 500 no limbo. As lamelas do estroma anterior correm obliquamente e aleatoriamente através da córnea. Em contraste, as lamelas posteriores são mais espessas, mais largas e têm um arranjo limbo a limbo mais ordenado (KOTECHA, 2007).

A lâmina de Descemet é uma matriz interfacial que integra o estroma posterior com a membrana basal endotelial da córnea. Formada na vida fetal, as células endoteliais adicionam continuamente material, tornando-a mais espessa com o envelhecimento (ESPAÑA; BIRK, 2020). Dessa forma, apresenta ao nascimento uma espessura de 3 a 4 μm e, no adulto, de 10 a 12 μm ; e está composta de duas camadas diferentes: uma superficial, ao nível do terço anterior, próxima da substância própria, que corresponde à lâmina limitante posterior embrionária; e outra camada, profunda e posterior, é secretada pelas células endoteliais após o nascimento (DANTAS, 2013b). É homogênea, altamente retrátil, flexível, elástica (DANTAS, 2013b) e acelular, composta por redes hexagonais de colágeno VIII bem como IV e XII (ESPAÑA; BIRK, 2020).

O endotélio é uma estrutura de camada única com 5 μm de espessura. As células são hexagonais, interdigitadas, e dispostas em padrão de mosaico ou favo de mel. São ativas em metabolismo e secreção, funcionando adequadamente, ajudam a manter a hidratação corneana em 78%, graças a uma bomba endotelial que regula o conteúdo de água (SRIDHAR, 2018; VIEIRA; HÖFLING-LIMA, 2013). A bomba endotelial é controlada por enzimas (NaK-ATPase) localizadas na membrana lateral das células endoteliais, chegando a existir aproximadamente 3 milhões de sítios por célula (VIEIRA; HÖFLING-LIMA, 2013).

As células endoteliais não proliferam *in vivo* em humanos. A densidade de células endoteliais no nascimento é de 3500 células/mm² e diminui em média aproximadamente 0.6% ao ano em córneas normais ao longo da vida adulta, situando-se em torno de 1400 a 2500 células/mm² na idade adulta. Quando existe perda endotelial, ocorre um deslizamento das células vizinhas na tentativa de recompor o espaço (DANTAS, 2013a; SRIDHAR, 2018).

2.1.2 Funções

A córnea fornece três atributos funcionais fundamentais para o sistema óptico ocular: proteção, refração e transmissão da luz (RUBERTI; ZIESKE, 2008).

-Refração: A córnea contribui com 74% do poder dióptrico do olho (43,25 dioptrias), de um total de 58,60 D, e a maior parte desse grau encontra-se na superfície ar-lágrima (+44D), lágrima córnea (+5D) e córnea humor-aquoso (-6D)(DANTAS, 2013a). Configura, portanto, o principal componente refrativo ocular, permitindo a convergência da luz na parte central da retina (TIDU *et al.*, 2020).

-Proteção: A proteção de transporte, se dá através das estreitas junções das células escamosas superficiais, formando uma barreira para substâncias químicas deletérias e patógenos; e a proteção mecânica ao conteúdo intraocular é fornecida pelas propriedades de tração da matriz extracelular estromal, permitindo a sobrevivência à impactos traumáticos significativos sem ruptura (RUBERTI; ZIESKE, 2008).

-Transmissão: A transmissão da luz é crítica para a função do tecido e sua eficiência está relacionada à sua transparência, que, por sua vez, depende da regularidade da superfície epitelial, da disposição regular das estruturas celulares e extracelulares estromais, da conformação em treliça das fibras colágenas, e da hidratação da córnea, influenciada pelas barreiras epiteliais e endoteliais, pressão intraocular, e bomba endotelial (DANTAS, 2013a; HASSELL; BIRK, 2010; RUBERTI; ZIESKE, 2008).

2.2 Ceratocone

O distúrbio da córnea mais comum associado a alterações na biomecânica da córnea é o ceratocone (MA *et al.*, 2018). A palavra ceratocone deriva das palavras gregas '*k'éras*', que significa córnea, e '*conus*', que significa cone, que juntas significam córnea 'em forma de cone'. É considerado uma doença ocular bilateral e assimétrica que resulta em afinamento progressivo e aumento da curvatura da córnea, levando a astigmatismo irregular e diminuição da acuidade visual (SANTODOMINGO-RUBIDO *et al.*, 2022). Geralmente torna-se aparente durante a

segunda década de vida, durante a puberdade, e progride até a quarta década de vida, quando comumente se estabiliza (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010). No entanto, cerca de 10% a 20% das pessoas com ceratocone progridem para estágios avançados e podem necessitar de transplante de córnea (RABINOWITZ, 1998).

Os sinais e sintomas oculares do ceratocone variam de acordo com a gravidade da doença. Em estágios incipientes, também referidos como formas subclínicas ou frustras, o ceratocone normalmente não produz nenhum sintoma e, portanto, pode passar despercebido pelo paciente e pelo médico, a menos que testes específicos (como topografia da córnea) sejam realizados para o diagnóstico. A progressão da doença se manifesta por uma redução significativa da acuidade visual que não corrige com óculos (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010).

A prevalência e a incidência do ceratocone variam de acordo com a etnia e a localização geográfica. Estudos de populações predominantemente caucasianas relatam taxas de prevalência abaixo de 1.000 por 100.000 pessoas, enquanto estudos conduzidos em populações da Ásia e do Oriente Médio relatam taxas de prevalência entre 1.500 e 5.000 por 100.000 pessoas (SANTODOMINGO-RUBIDO *et al.*, 2022).

A etiologia exata do ceratocone não é bem compreendida. Apesar de muitas pesquisas sobre a patogênese do ceratocone, o mecanismo preciso pelo qual as córneas afetadas progressivamente se afinam e se inclinam permanece desconhecido. Em particular, não está claro se o afinamento estromal associado à doença é causado por uma perda de colágeno mediada por enzimas, uma interrupção da fibrilogênese devido à presença de ceratócitos defeituosos ou proteoglicanos anormais, ou se é devido ao deslizamento entre as lamelas resultando em uma redistribuição de colágeno longe do ápice do cone (HAYES *et al.*, 2007).

Porém, é mais comum em pacientes com condições atópicas, asma, dermatite e síndrome de Down e está associado a certas deficiências enzimáticas e doenças do tecido conjuntivo, como a síndrome de Ehlers-Danlos (hipermobilidade das articulações e aumento da elasticidade da pele) e osteogênese imperfeita (doença dos ossos de vidro) (AMBEKAR *et al.*, 2011). Essas associações sugerem que o ceratocone pode ser devido em parte a uma anormalidade do tecido conjuntivo, resultando em fraqueza da estrutura do colágeno. Os sinais clínicos característicos do ceratocone, como estrias de Vogt (linhas de estresse da córnea), distorção topográfica da córnea e, em casos graves, ruptura da membrana de Descemet (hidropsia da córnea) são características que sugerem alterações nas propriedades biomecânicas da córnea (VELLARA; PATEL, 2015).

Adelgaçamento do estroma da córnea, fraturas na camada de Bowman e deposição de ferro na camada basal do epitélio da córnea compreendem uma tríade de características histopatológicas clássicas encontradas no ceratocone, enquanto a lâmina limitante posterior (membrana de Descemet) parece ser afetada com muito menos frequência (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010; SANTODOMINGO-RUBIDO *et al.*, 2022).

O adelgaçamento das lamelas de colágeno tem sido atribuído à diminuição do número de ligações cruzadas (ligações entre e dentro das fibrilas de colágeno). No geral, esses achados sugerem que uma alteração anormal na microestrutura da organização das fibras de colágeno é responsável pela fraqueza mecânica das córneas com ceratocone e, portanto, por sua forma cônica (AMBEKAR *et al.*, 2011).

A elasticidade das fibras de colágeno é diminuída em 36% em pacientes com ceratocone. Além disso, a falta de feixes de microfibrilas anteriores à membrana de Descemet é encontrada em olhos com ceratocone, também altera as propriedades biomecânicas do tecido, podendo contribuir para a patogênese da doença. Também foi demonstrado que há expressão alterada ou localização anormal de componentes da matriz extracelular em olhos com ceratocone, com níveis significativamente diminuídos, lumican e queratan, que são proteínas do núcleo proteoglicano, e colágeno. (MA *et al.*, 2018)

Existem vários tratamentos cirúrgicos e não cirúrgicos disponíveis para o ceratocone e a seleção do tratamento é baseada no estágio e na progressão da doença. Casos leves e sem evolução podem ser tratados com óculos ou lentes de contato, enquanto casos mais avançados podem necessitar de tratamentos mais sofisticados como implante de segmentos de anel intraestromal ou transplante de córnea, sendo opção a ceratoplastia lamelar anterior profunda. *Crosslinking* pode ser usado para endurecer a córnea em estágios iniciais da doença, estabilizando o estroma em uma forma onde a visão ainda pode ser corrigida com óculos ou lentes de contato (AMBEKAR *et al.*, 2011; VOLATIER *et al.*, 2020).

Alguns tratamentos, como lentes de contato e anel intraestromal são projetados para alterar apenas a forma da córnea, enquanto outros, como o *crosslinking* de colágeno, alteram a estrutura ou a composição da córnea. O transplante de córnea e a ceratoplastia lamelar anterior profunda não alteram a forma ou estrutura/ composição da córnea existente, mas substituem toda a córnea ou algumas camadas da córnea pela córnea saudável do doador (AMBEKAR *et al.*, 2011).

2.3 Crosslinking

O *crosslinking* (CXL) de colágeno, também traduzido como reticulação do colágeno, é o único procedimento cirúrgico minimamente invasivo na prática atual que é proposto para interromper a progressão do ceratocone, sendo considerado o padrão ouro para esta finalidade (SUBASINGHE *et al.*, 2018).

A reticulação em geral é a criação de ligações químicas entre moléculas grandes, como proteínas, induzindo um efeito de polimerização. É um princípio amplamente difundido para endurecer e preservar materiais e já era, por exemplo, usado para a preservação das múmias egípcias há aproximadamente 3.000 anos. A reticulação física por luz ultravioleta (UV) é usada na odontologia para endurecer materiais de restauração e na indústria automobilística para estabilizar a laca. A reticulação química é realizada no processo de polimerização de materiais de lentes de contato ou intraoculares; para a preparação de biopróteses, como válvulas cardíacas protéticas ou pericárdio, para aumentar sua durabilidade, resistência à degradação enzimática e redução de sua imunogenicidade; e em patologia para a preservação de espécimes de tecido por glutaraldeído ou formaldeído (WOLLENSAK, 2017).

O tratamento de reticulação da córnea usando o fotossensibilizador riboflavina e luz ultravioleta A (UVA) foi introduzido por Wollensak *et al.* (2003a) com base nas primeiras investigações *in vitro* de Spoerl *et al.* (1998) em reticulação da córnea suína. Antes disso, vários métodos para endurecer tecidos contendo colágeno foram testados. Reticuladores de açúcar foram descartados devido ao longo tempo para produzir o efeito; o formaldeído, porque não era possível um tratamento em região delimitada; e a luz, como era conhecida na odontologia, não mostrou um efeito suficiente na córnea transparente. Portanto, foi optado pelo uso de fotossensibilizador. A riboflavina (vitamina B2) foi escolhida para esta função porque é não tóxica e é um potente produtor de radicais de oxigênio. Para alcançar um bom efeito, o comprimento de onda da luz foi escolhido de acordo com o ponto máximo de absorção da riboflavina, em 365 nm. Ainda, o efeito da reticulação foto-oxidativa pode ser espacialmente restrito de modo que a reticulação de estruturas adjacentes ou mais profundas possa ser evitada (SPOERL; RAISKUP, 2017)

Dessa forma, foi criado o procedimento convencional (protocolo de Dresden), que envolve a remoção do epitélio da córnea em um diâmetro de 6–7 mm central seguido da instilação de riboflavina 0,1% de 5-5 minutos por 30 minutos e radiação da córnea com luz ultravioleta A (UVA) com 360-370 nm a 3 mW/cm² por 30 minutos (5,4 J/cm²), mantendo a instilação de riboflavina (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010; SANTHIAGO, 2017).

A radiação ultravioleta ativa a riboflavina, gerando espécies de oxigênio reativo que induzem ligações covalentes entre as fibrilas de colágeno no estroma corneano (*crosslinking*), aumentando assim a estabilidade mecânica e bioquímica das córneas tratadas (DHAWAN *et al.*, 2011; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010; SANTHIAGO, 2017; ZEITOUNE *et al.*, 2020). Usando uma máquina de teste de biomaterial controlada por microcomputador, as medições biomecânicas de resistência à tração mostraram um aumento impressionante na resistência da córnea de 71,9% em suínos e 328,9% em córneas humanas (WOLLENSAK *et al.*, 2003c).

Nos últimos anos, o *crosslinking* da córnea foi introduzida como uma opção de tratamento e revolucionou o tratamento de ceratocone e outras ectasias da córnea. De acordo com o Consenso Global de Ceratocone e Doenças Ectásicas publicadas em 2015, atualmente, 83,3% dos oftalmologistas estão realizando CXL como uma modalidade de tratamento para ceratocone e todos os médicos que atualmente não têm acesso a esta técnica estão dispostos a usar este procedimento assim que estiver disponível (SUBASINGHE *et al.*, 2018).

Embora o CXL apresente resultados positivos, como melhora na acuidade visual não corrigida e da ceratometria máxima (ZARE *et al.*, 2016), possui ainda limitações. Como a reticulação padrão é fotoquímica, há exposição aos efeitos citotóxicos e potencialmente mutagênicos da luz UVA (O'BRART, 2017), que pode causar danos no plexo nervoso subepitelial e uma redução significativa na densidade celular do estroma anterior e médio, mesmo 6 meses após o CXL (ZARE *et al.*, 2016).

A irradiação UVA também pode causar destruição ou morte de células endoteliais da córnea. Felizmente, estima-se que mais de 85% de uma dosagem típica de tratamento com UVA é absorvida pela riboflavina nas porções anteriores do estroma, deixando menos da metade da dosagem citotóxica para o endotélio (WOLLENSAK *et al.*, 2003b), por isso, a seleção do paciente é importante para o CXL, sendo geralmente aceita a técnica padrão quando o estroma da córnea é mais espesso que 400 μm , não havendo segurança no método nos estágios avançados da doença, quando há afinamento corneano importante.

Ainda, se a ceratometria máxima for > 58 dioptrias, a idade > 35 anos ou a acuidade visual corrigida melhor que 20/25, a taxa de complicações aumenta (DHAWAN *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2017).

Os efeitos colaterais e limitações do *crosslinking* convencional, principalmente relacionados à imprevisibilidade anatômica e à exposição estromal (danos por oxidação, inflamação, infecção), bem como a redução de complicações pós-operatórias, como cicatrização lenta da córnea e ceratite, são o motivo da busca por novos agentes CXL,

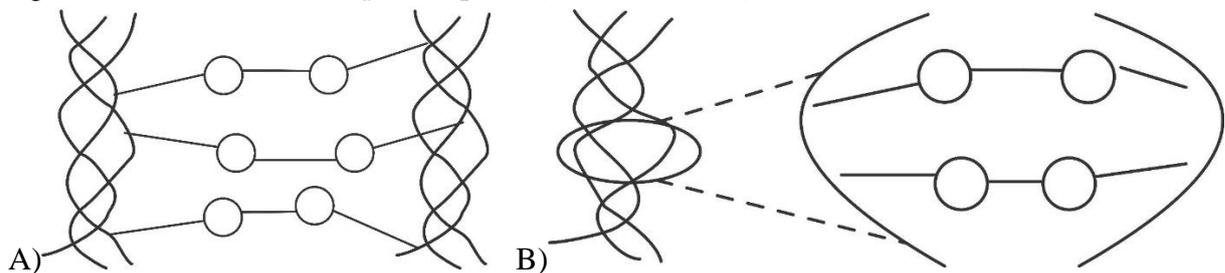
principalmente por moléculas que promovam CXL sem estimulação da luz (DA CRUZ *et al.*, 2018; GU *et al.*, 2019; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2010).

2.3.1 Efetividade

As fibrilas de colágeno são formadas pela polimerização de unidades moleculares alongadas denominadas tropocolágeno. A molécula de tropocolágeno nativa (massa molecular 300 kDa) consiste em três cadeias polipeptídicas de cerca de 1000 resíduos de aminoácidos cada um enrolado em torno do outro para formar uma hélice tripla. Os átomos nas cadeias individuais são mantidos juntos com ligações covalentes, enquanto as três cadeias são mantidas na estrutura tripla-hélice por ligações mais fracas. A estabilidade da tripla hélice no colágeno depende de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (SIONKOWSKA, 2005). Reticulações exógenas podem ser adicionadas à molécula de tropocolágeno dentro de suas fitas helicoidais individuais (intra-helicoidal entre duas microfibrilas – Figura 4A) ou entre moléculas diferentes adjacentes (reticulações interhelicoidais – Figura 4B) com um agente de reticulação (SUNG *et al.*, 2003).

As fibras de colágeno levam a um aumento da resistência mecânica, térmica e bioquímica das córneas. Portanto, a eficiência do processo de reticulação pode ser avaliado usando as seguintes técnicas: calorimetria exploratória diferencial (DSC), digestão enzimática e ensaios mecânicos (BERSANETTI *et al.*, 2023).

Figura 5 – Formas de *crosslinking* de colágeno. A) interhelicoidal. B) Intrahelicoidal



Fonte: Adaptado de Sung et al. (2003, p .6)

2.3.1.1 DSC

As fibras de colágeno *in vivo* devem ser estáveis o suficiente para suportar a influência disruptiva da agitação térmica, mas capazes de montar e desmontar as componentes moleculares. Separados, as temperaturas de desdobramento de uma ampla gama de colágenos estão, a apenas alguns graus da temperatura corporal dos animais, mas quando as moléculas são

agregadas para formar fibrilas há um aumento na temperatura de transição de aproximadamente 27° C. Quando a proteína é desnaturada pelo calor, as ligações fracas são quebradas mais facilmente, e as ligações covalentes permanecem intactas, as três cadeias se separam umas das outras e colapsam aleatoriamente em maior temperatura. A desnaturação térmica do colágeno depende do teor de água, pH do meio ambiente e grau de reticulação (SIONKOWSKA, 2005).

Assim, a efetividade dos reticuladores pode ser verificada através do uso de DSC, visto que o aumento do número de ligações cruzadas gerada pelos compostos levará à maior estabilização da estrutura de tripla hélice das moléculas de colágeno, com consequente aumento da temperatura de desnaturação do material. Nesse contexto, torna-se possível realizar uma análise rápida e eficiente do aumento da resistência da córnea devido à eficiência na formação de ligações cruzadas (BERSANETTI *et al.*, 2023).

Ainda, as ligações cruzadas podem desidratar a fibra pela ligação mais próxima das moléculas (MILES *et al.*, 2005), com adicional aumento da temperatura de desnaturação pela redução do teor de água (BERSANETTI *et al.*, 2019; DA CRUZ *et al.*, 2018; MORANDIM-GIANNETTI *et al.*, 2023). Miles *et al.* (2005), deduziram que a desidratação é o mecanismo dominante que aumenta a estabilidade térmica das fibras de colágeno reticuladas.

Os resultados das análises térmicas por DSC de córneas reticuladas mostraram-se promissores para a avaliação *in vitro* da organização molecular do colágeno no estroma (MORANDIM-GIANNETTI *et al.*, 2023). A aplicação de moléculas como riboflavina/ UVA e extratos de plantas mostraram-se eficientes em promover *crosslinks* de colágeno em diversos tecidos, considerando o aumento da temperatura de desnaturação (BERSANETTI *et al.*, 2023).

Foi utilizada a DSC para avaliação de estabilidade do colágeno em estudos conduzidos por Sung *et al.* (2003) em pericárdio suíno; por Wang *et al.* (2010) e Onem *et al.* (2017) em pele de carneiro; Miles (2005) em tendão de cauda de rato; Bedran-Russo *et al.* (2011) em dentina de molares; He *et al.* (2011) em tendão bovino; Danilov *et al.* (2008) em esclera de coelhos; Sionkowska (2005) em cristalino e córnea bovinos; e em córneas de coelho por Bersanetti *et al.* (2017) da Cruz *et al.* (2018), e de suíno por Moradim-Giannetti *et al.* (2023), Bersanetti *et al.* (2019 e 2023).(ONEM *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2010)

2.3.1.2 Degradação enzimática

A reticulação de proteínas tem sido usada de várias maneiras para modificar as propriedades biológicas e mecânicas de biomateriais. Tem sido extensivamente utilizado *in vitro* para modular as propriedades mecânicas de vários tecidos. Outro benefício da reticulação é a estabilização das matrizes de colágeno, tornando-as menos suscetíveis à degradação

enzimática (SLUSAREWICZ *et al.*, 2010), pois quanto maior for a resistência, menor será a taxa de degradação (ZHAI *et al.*, 2006).

Como o CXL promove um aumento na resistência à degradação da córnea, ensaios *in vitro* de digestão enzimática podem ser utilizados para avaliar os resultados deste procedimento. A taxa de digestão após o CXL padrão é reduzida possivelmente devido à compactação do tecido e menor acesso das enzimas às fibrilas. Como a atividade da proteinase está aumentada em córneas ceratocônicas, a resistência à digestão da colagenase é um aspecto importante a ser avaliado e relacionado à eficiência do procedimento. Quanto mais lenta a digestão, mais endurecida a córnea e menor a progressão do ceratocone esperada (BERSANETTI *et al.*, 2019).

Vários estudos já foram realizados utilizando a degradação enzimática como teste de eficácia para diferentes agentes reticuladores em diversos tecidos. Também existem diversas maneiras de se quantificar a degradação efetuada pelas enzimas, sendo uma delas a associação com análise DSC.

Spoerl, Wollensak e Seiler (2004), avaliaram a influência do tratamento de *crosslinking* convencional na resistência da córnea à degradação enzimática da pepsina, tripsina e colagenase. Concluíram através de análises micro e macroscópicas que a reticulação fotoquímica da córnea usando riboflavina e UVA aumentou marcadamente a resistência do colágeno à digestão pelas enzimas (SPOERL *et al.*, 2004).

Bersanetti *et al.* (2019) submeteram córneas suínas tratadas com extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Euterpe oleracea* Mart. à digestão enzimática pela colagenase e analisaram a resistência por DSC. Da mesma forma, Bersanetti *et al.* (2023) utilizaram a digestão enzimática em combinação com o DSC para avaliar influência da concentração dos extratos de *S. adstringens* na formação de ligações covalentes de colágeno bem como a influência do tempo de contato. E Moramdim-Giannetti *et al.* (2023) testaram a eficiência do procedimento de reticulação utilizando a enzima lacase via caracterização térmica por DSC e degradação enzimática por colagenase. Nesses estudos, o tratamento com o agente reticulador aumenta a resistência do tecido à degradação enzimática, mantendo sua temperatura de desnaturação nas análises por DSC, diferente do que ocorre nos grupos não tratados, cuja degradação enzimática causa a redução da temperatura.

Zhai *et al.* (2006), avaliaram o efeito de reticulação de procianidinas em válvulas cardíacas suínas, incluindo resistência à tração e a resistência à degradação enzimática *in vitro*. A degradação foi quantificada pela porcentagem de perda de peso.

Han *et al.* (2003) avaliaram proantocianidinas extraídas de sementes de uva como um reagente de reticulação de colágeno em tendão bovino, refletido pela degradação enzimática

após fixação em solução da proantocianidina por 48h. A degradação foi expressa pela porcentagem de colágeno que foi solubilizado após a exposição à enzima.

Sung et al (2003) conduziram estudo para investigar as características de reticulação, propriedades mecânicas e resistência contra a degradação enzimática de tecidos biológicos após a fixação com genipina derivada da *Gardenia jasminoides* J.Ellis e/ou carbodiimida em pericárdio suíno. Os graus de degradação do tecido foram determinados pelo ensaio da ninidrina, para verificação do conteúdo de grupos amino livres, gerados pela clivagem das ligações peptídicas após a degradação enzimática.

2.3.1.3 Ensaio mecânicos

As propriedades biomecânicas da córnea se encontram intimamente relacionadas à sua estrutura, com especial envolvimento de seu estroma. Sua elasticidade depende basicamente do arranjo estabelecido pelas fibras colágenas (DINIZ *et al.*, 2019). Existem vários métodos usados para tentar estabelecer o comportamento biomecânico da córnea humana *ex vivo*, incluindo extensometria e teste de insuflação (PYE, 2020).

Um dos valores-chave para o comportamento biomecânico de um tecido é a medição da forma como o tecido se comporta quando submetido a uma carga aplicada (ou estresse). Isso dá origem a uma relação tensão/deformação chamada módulo de Young (PYE, 2020).

Testes de resistência à tração (extensometria) são métodos de cálculo do aumento da rigidez que implicam cortar o tecido em questão e medir as forças unidirecionalmente, portanto, as tensões não são distribuídas em várias direções, como *in vivo* (AVILA *et al.*, 2012).

Ensaio de tração são realizados utilizando equipamentos como reômetros, nos quais tiras de córnea são submetidas à tensão aumentada linearmente com detecção da deformação, gerando curvas de tensão-deformação e permitindo cálculo do módulo de Young (SPOERL *et al.*, 1998; WOLLENSAK *et al.*, 2003c). Um reômetro também foi utilizado por Danilov et al. (2008) para avaliar a estabilização do colágeno escleral por reticulação de glicerol aldeído.

Ainda, máquinas de ensaio universais, também conhecidas como máquinas de teste de tração, permitem determinar o módulo de elasticidade, deformação máxima e a tensão das córneas, como nos estudos conduzidos em córneas de coelhos por BERSANETTI et al. (2017) e suínas por Diniz et al. (2019), e escleras suínas por LIU e WANG (2013).

No entanto, os procedimentos de extensometria envolvem alguns defeitos intrínsecos, que podem reduzir a confiabilidade da técnica. Dois desses problemas estão relacionados à geometria da córnea: uma tira de amostra é originalmente parte de uma superfície esférica, enquanto a tensão produz achatamento. Além disso, a análise dos resultados obtidos nos testes

de tração geralmente leva em consideração a espessura central da córnea ignorando o aumento natural da espessura periférica. Assim, os testes de tração, apesar de sua relativa simplicidade e baixo custo, têm sido substituídos por testes de insuflação, que permitem a manutenção da forma asférica da córnea e resolvem alguns dos problemas existentes nos testes de tração (MATTEOLI *et al.*, 2016).

Nos testes de insuflação, a rigidez ocular é calculada como a razão de ajuste exponencial entre a PIO (pressão intraocular) e o volume, de acordo com a equação de Friedenwald (1937). Essa relação dá uma estimativa da resistência do olho à distensibilidade, portanto, se o olho estiver enrijecido, a resistência é maior (AVILA *et al.*, 2012). O aumento do volume intraocular leva a um aumento da PIO, que é maior quanto mais resistência houver nos tecidos oculares. No estudo de Avila *et al.* (2012) com olhos suínos, a PIO aumentou mais foi acentuadamente nas córneas reticuladas, frente a insuflação do globo ocular.

Já Matteoli *et al.* (2016), utilizaram a insuflação *ex vivo* para medir o deslocamento anterior do ápice da córnea em função da pressão de entrada, e o módulo de elasticidade foi então calculado pela inclinação causada pela tensão-deformação. Havendo maior resistência a tração, a inclinação do ápice corneano causada por uma dada pressão, será menor.

Kling *et al.* (2010) desenvolveram um modelo para a relação tensão-deformação da córnea com base na variação da PIO e alterações relacionadas à espessura e no raio de curvatura para fornecer estimativas do módulo de Young nas córneas não tratadas e reticuladas. O modelo assume que a espessura da córnea e o raio médio de curvatura são uma função da PIO, ou seja, aumentar a PIO fará com que o globo ocular se expanda, e a espessura da córnea diminui porque a córnea fica esticada em uma área maior. Nesse contexto, forneceram dados sobre a rigidez da córnea pela insuflação ocular através da mudança no deslocamento do ápice, espessura e raios da curvatura anterior e posterior da córnea.

2.3.2 Segurança

A segurança de agentes reticuladores quanto à toxicidade para as células endoteliais tem sido avaliada por meio de microscopia óptica, confocal e eletrônica (AVILA *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2017), e para os ceratócitos por colorações histológicas, cultura de células e testes de viabilidade celular (AVILA *et al.*, 2012; DINIZ *et al.*, 2019; HAN *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2017).

Wollensak *et al.* (2003b) avaliaram o dano citotóxico ao endotélio da córnea de coelhos após o tratamento com riboflavina-UVA com análises histológicas por microscopia óptica e eletrônica.

Outro agente reticulador muito estudado é a genipina. Avila et al. (2012) utilizaram a microscopia ótica alinhado a softwares de avaliação de imagens para quantificar o dano endotelial e estromal do *crosslinking* tradicional, comparado com genipina e glutaraldeído. O dano celular foi calculado a partir da porcentagem de células com anormalidades morfológicas ou perda de células, também foram calculados a área celular e o número de células por mm². Já os ceratócitos, foram contados campo a campo após processamento histológico.

Song et al. (2017) estudaram estes mesmos reticuladores, porém foram avaliadas as alterações endoteliais por microscopia eletrônica e confocal. A densidade de células endoteliais foi avaliada usando o *software* fornecido pelo equipamento de microscopia confocal. Já a microscopia eletrônica foi utilizada para verificar alterações estruturais da camada endotelial.

A avaliação da citotoxicidade do *crosslinking* tradicional e da genipina *in vitro* foi realizada no estudo de Diniz et al. (2019) pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos L929 em cultura. Culturas de células também foram utilizados por Han et al. (2003) e Zhaia et al. (2006) para verificar citotoxicidade de proantocianidinas em válvulas cardíacas e pericárdio bovino.

2.4 Plantas medicinais

Ao longo dos tempos, os seres humanos confiaram na natureza para atender às suas necessidades básicas, entre as quais medicamentos para o tratamento de um amplo espectro de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013). O uso de plantas medicinais pela população, é uma prática comum desde milhares de anos antes de Cristo. Por exemplo, o uso da papoula (*Papaver somniferum* L.) e da maconha (*Cannabis sativa* L.) é descrito há mais de 4.000 anos. No entanto, a busca pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais só teve início no século XIX, levando assim à concepção do primeiro fármaco com as características que conhecemos hoje. Friedrich Serturmer, em 1806, foi pioneiro ao isolar o alcaloide morfina da papoula: fato que motivou uma busca contínua por outros medicamentos derivados de plantas (DUTRA *et al.*, 2016).

Assim, os produtos naturais têm sido as principais fontes de diversidade química para matérias-primas enquanto impulsionam a descoberta farmacêutica ao longo do último século (MISHRA; TIWARI, 2011). Notavelmente, os compostos derivados de plantas são empregados atualmente na terapia moderna, além de desempenhar um papel importante para a síntese de algumas moléculas mais complexas. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos

terapêuticos disponíveis são derivados de fontes naturais, notadamente de plantas e microrganismos. (DUTRA *et al.*, 2016)

Aproximadamente, existem 200 plantas distribuídas em todo o mundo que são estudadas no tratamento de distúrbios oculares. Tentativas foram feitas para investigar novos compostos com o objetivo de fornecer benefícios substanciais ao tecido ocular e à visão com menos efeitos colaterais e toxicidade. A descoberta de drogas antiglaucomatosas fitotetápicas e agentes anestésicos para o tecido ocular levou ao crescimento exponencial da farmacêutica ocular (NAFEES *et al.*, 2022).

A *Atropa belladonna* L., é a fonte da atropina, agonista muscarínico cujo principal efeito é cicloplégico e midriático, atualmente sendo utilizado também para retardar a progressão da miopia. A fisostigmina de *Physostigma venenosum* Balf. é reconhecida como droga hipotensora ocular. E outras plantas vem sendo estudadas com diversas finalidades na oftalmologia: *Abrus precatorius* L. para retardar a progressão da catarata, *Coptis teeta* Wall. no tratamento do tracoma, *Crocus sativus* L. na degeneração macular relacionada a idade, *Foeniculum vulgare* Mill. como hipotensor ocular, *Ginkgo biloba* L. no glaucoma de pressão normal, *Zingiber officinale* Roscoe como antiglaucomatoso (NAFEES *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços tecnológicos na síntese de medicamentos, a indústria farmacêutica ainda busca novos compostos ativos de fontes naturais, bem como revisita compostos de origem natural já consagrados. No entanto, o surgimento de métodos mais seguros e medicamentos oftálmicos eficazes depende dos estudos científicos nas diversas áreas da oftalmologia (NAFEES *et al.*, 2022).

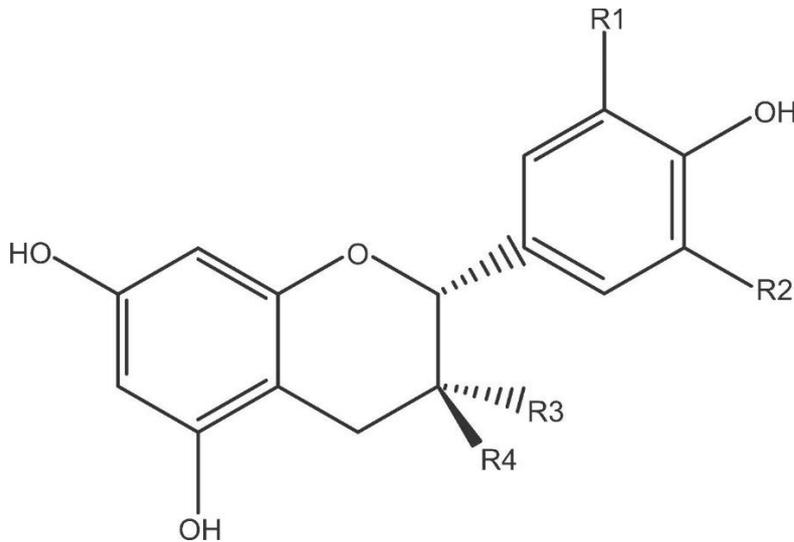
2.4.1 Proantocianidinas

Materiais à base de plantas também têm sido utilizados na engenharia de tecidos. Esforços recentes nessa área têm se concentrado na substituição dos reticuladores sintéticos pelos naturais derivados de fontes biológicas, essencialmente derivados dos componentes das plantas, portanto, produtos mais ecológicos e ambientalmente sustentáveis e renováveis (INDURKAR *et al.*, 2021).

Dentre estes, já foram estudados como indutores de *crosslinking* o cinamaldeído (*Cinnamomum* sp.); galato de epigalocatequina (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze.); genipina (*Genipa americana* L.); ácidos orgânicos (ácido cítrico); polifenóis e taninos (ácido ferúlico, ácido gálico, quercitina, hesperidina, proantocianidinas) (INDURKAR *et al.*, 2021).

As proantocianidinas (PAs), também conhecidas como “taninos condensados”, são oligômeros e polímeros de flavan-3-óis, de variados padrões de hidroxilação. Incluem diferentes classes, como procianidinas, propelargonidinas e prodelfidinas (Figura 5 e Tabela 1). As procianidinas são as mais comuns (BHAGWAT; HAYTOWITZ, 2015).

Figura 6- Estrutura das proantocianidinas. Variam de subclasse conforme os “R(s)” apresentados (vide tabela 1).



Fonte: Adaptado de Bhagwat; Haytowitz (2015, p. 2-3).

Tabela 1- Estrutura de flavan-3-óis comuns e padrões de hidroxilação.

Subclasses de proantocianidinas	Flavan-3-ol	R1	R2	R3	R4
Procianidina	Catequina	OH	H	H	OH
	Epicatequina	OH	H	OH	H
Prodelfidina	Galocatequina	OH	OH	H	OH
	Epigalocatequina	OH	OH	OH	H
Propelargonidina	Afzelequina	H	H	H	OH
	Epiafzelequina	H	H	OH	H

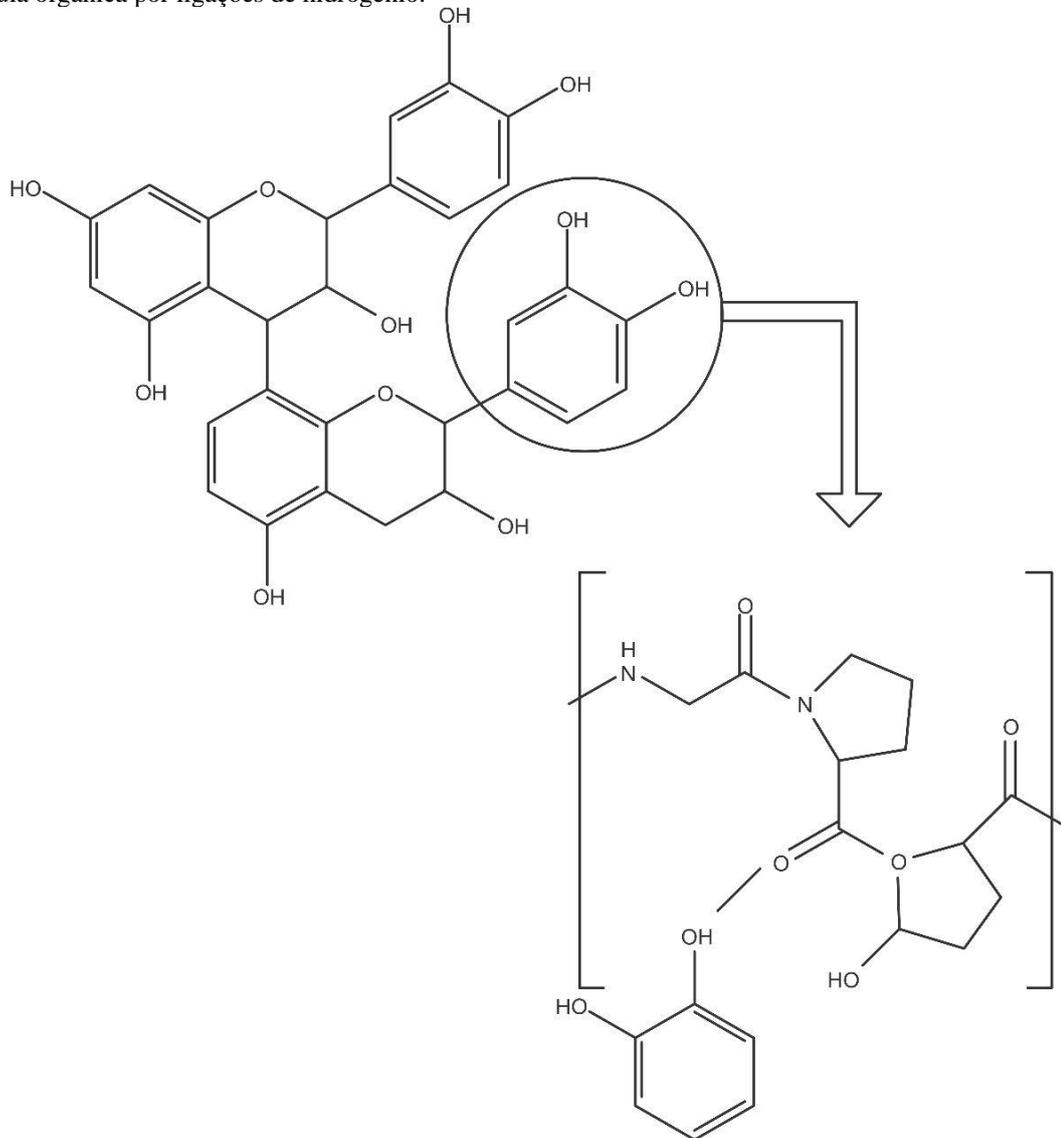
Fonte: Adaptado de Bhagwat; Haytowitz (2015, p. 2-3).

Esses compostos complexos, análogos a outros equivalentes polifenólicos, possuem múltiplas aplicações como resultado de suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, propriedades antidiabéticas e neuroprotetoras (INDURKAR *et al.*, 2021). Ademais, têm estruturas polifenólicas que exibem o potencial para promover estruturas estáveis de ligações de hidrogênio. As interações intermoleculares podem ser formadas entre os grupos carbonila dos aminoácidos das fibrilas de colágeno e os grupos hidroxila dos polifenóis (Figura 5).

São encontradas principalmente em frutas roxas, vegetais, sementes, nozes, flores e cascas, e são os principais precursores dos pigmentos azul-violeta e vermelho nas plantas, além

de contribuir com sabor adstringente aos alimentos (BHAGWAT; HAYTOWITZ, 2015; FINE, 2000).

Figura 7- Representação do *crosslinking*. Ligação provável entre fibrilas de colágeno e grupos hidroxila da molécula orgânica por ligações de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de Bersanetti et al. (2017, p. 2)

Dessa forma, alguns extratos vegetais ricos em proantocianidinas têm sido testados com o objetivo de enrijecimento da córnea como alternativa ao *crosslinking* padrão, sendo os mais testados o fruto do açaí (*E. oleracea*) (BERSANETTI *et al.*, 2017, 2019) e casca do barbatimão (*S. adstringens*) (BERSANETTI *et al.*, 2019, 2023; DA CRUZ *et al.*, 2018).

No entanto, conforme o “Banco de dados da USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) do conteúdo de proantocianidinas em alimentos”, os maiores teores de

proantocianidinas são encontrados no cacau - *Theobroma cacao* L. (semente); canela - *Cinnamomum aromaticum* Nees (casca); uva - *Vitis vinifera* L. (semente) (BHAGWAT; HAYTOWITZ, 2015), conforme os dados da Tabela 2.

Tabela 2- Conteúdo de proantocianidinas de alimentos selecionados.

	Proantocianidina	Média (mg/100g)
Casca de canela	Dímeros	526,29
	Trímeros	1252,20
Semente de cacau	Dímeros	831,29
	Trímeros	785,70
Semente de uva	Dímeros	360,88
	Trímeros	44,07

Fonte: Adaptado de Bhagwat; Haytowitz (2015, p. 12-31).

Todos já foram testados de alguma maneira como agentes para *crosslinking* em alguns estudos, porém não direcionados a tecidos oculares. A maioria dos estudos envolvem biomodificação da dentina através da reticulação do colágeno, já estudada com a semente de uva (AGUIAR *et al.*, 2014; AL-AMMAR *et al.*, 2009; BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2011; CASTELLAN *et al.*, 2010, 2013; GAJJELA *et al.*, 2017; PHANSALKAR *et al.*, 2015); da semente do cacau (AGUIAR *et al.*, 2014; CASTELLAN *et al.*, 2010, 2013); e da casca da canela (AGUIAR *et al.*, 2014; JING *et al.*, 2022; NAM *et al.*, 2020). Ainda, Han *et al.* (2003), e He *et al.* (2011), utilizaram proantocianidinas provenientes de sementes de uva para *crosslinking* em tendões bovinos.

2.4.2 Açaí

O açaí pertence à família *Arecaceae* (palmeira), gênero *Euterpe*, composto por sete espécies distribuídas da América Central à América do Sul. No Brasil, *Euterpe edulis* Mart., *Euterpe oleracea* Mart. e *Euterpe precatoria* Mart. são consideradas as espécies mais importantes do gênero devido à ampla distribuição e importância econômica de seus frutos e palmitos, obtido principalmente pela atividade extrativista (OLIVEIRA *et al.*, 2016). As palmeiras crescem a uma densidade de 2.500 a 3.500 árvores por hectare, servindo como a planta de dossel predominante dentro do delta do rio Amazonas nos estados do Pará e Amapá, cobrindo uma área de mais de três milhões de hectares (KANG *et al.*, 2010).

O fruto dessa palmeira é uma pequena baga roxo escuro que atinge cerca de 10 mm de diâmetro e é geralmente consumido em todos os estados brasileiros por ser rico em tocoferol, fibras, lipídios, polifenóis e íons minerais (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Normalmente, os frutos são usados para preparar um líquido com textura cremosa macerando o pericarpo e misturando-

o com diferentes quantidades de água, produzindo polpa de açaí comercialmente disponível. Na região produtora, o açaí está integrado à alimentação diária dos nativos e normalmente é utilizado nas principais refeições (GORDON *et al.*, 2012).

Os frutos do açaizeiro ganharam popularidade na América do Norte e nos países europeus recentemente como uma nova “superfruta” em grande parte devido à sua capacidade antioxidante extremamente alta e potenciais atividades anti-inflamatórias (KANG *et al.*, 2011). Desde que sua alta capacidade antioxidante foi revelada, inúmeras investigações de pesquisa se concentraram em análises e avaliações associadas às capacidades antioxidantes da polpa de açaí, suco ou extratos (KANG *et al.*, 2010).

Os flavonoides são moléculas antioxidantes de origem vegetal que atuam como uma armadilha para os radicais livres, oferecendo perspectivas na prevenção de danos oxidativos. Na polpa do açaí, os compostos fenólicos mais abundantes são as antocianinas, proantocianinas, lignanas e outros flavonoides (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

As proantocianidinas presentes no açaí já foram objeto de estudo como agentes de *crosslinking* na córnea de coelhos (BERSANETTI *et al.*, 2017; BUENO *et al.*, 2014) e suínos (BERSANETTI *et al.*, 2019; ZEITOUNE *et al.*, 2020), apresentando efeitos de enrijecimento principalmente comprovados por calorimetria de varredura e testes de tensão.

2.4.3 Barbatimão

O barbatimão é uma árvore da família *Fabaceae* (*Mimosaceae*) que pode atingir aproximadamente 4–6 m com um tronco de até 30 cm de diâmetro. Suas folhas são alongadas e possui flores pequenas dispostas em racemos axilares. Os frutos são vagens que contêm sementes marrons. São cultivadas a partir de sementes em sacos plásticos até a muda atingir 20 a 25 cm de altura, sendo então transplantadas para seu local definitivo de cultivo. Prefere solos arenosos e de rápida drenagem e floresce nas estações primavera e verão (RIBEIRO *et al.*, 2022).

Existem atualmente 42 espécies associadas ao gênero *Stryphnodendron*, localizadas principalmente no Brasil, em florestas tropicais e no bioma Cerrado. Através da análise filogenética (variando em aspectos morfológicos), diferentes espécies podem ser identificadas, como *S. adstringens* (Mart.) Coville, *S. rotundifolium* Mart. e *S. polyphyllum* Mart., sendo esta última encontrada principalmente em florestas tropicais. Outros nomes populares dessas árvores incluem “barba-de-timão”, “chorãozinho-roxo” e “casca-da-virgindade” (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2018).

Apesar de algumas espécies serem popularmente conhecidas como barbatimão e possuírem propriedades terapêuticas, apenas o *S. adstringens*, ou seu sinônimo, *Stryphnodendron barbatimam* (Vell.) Mart. é considerada o “Barbatimão verdadeiro” (RIBEIRO *et al.*, 2022).

Essa planta foi descrita no século XIX por naturalistas que viajaram pelo sudeste do Brasil, em particular pelo estado de Minas Gerais (BRANDÃO *et al.*, 2008). Como fitoterápico, a casca tem diversas aplicações, como no tratamento de leucorreia, hemorragias, feridas ulcerativas, corrimento vaginal, dor de garganta, hemorroidas, diarreia, e para limpeza de feridas, na forma de chás ou decocções, a serem usados externamente ou ingerido (DO NASCIMENTO *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2022; SANCHES *et al.*, 2007). Estudos anteriores descreveram propriedades antiulcerogênicas, antioxidantes, antitirosinase, antimicrobianas, tripanocidas, leishmanicidas e moluscicidas. (RIBEIRO *et al.*, 2022)

Além disso, produtos fitoterápicos e cosméticos à base de Barbatimão já são comercializados principalmente no território brasileiro. Alguns exemplos incluem um creme cicatrizante chamado Fitoscar®, aprovado em 2007 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RIBEIRO *et al.*, 2022). SOUZA *et al.* (2007) demonstraram que sabonete líquido contendo extratos secos cascas de Barbatimão apresenta propriedades anti-sépticas. Assim, já existem aplicações comerciais para extratos dessa espécie.

Suas cascas e folhas apresentam uma ampla gama de compostos bioativos, principalmente ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (RIBEIRO *et al.*, 2022). Porém, DA CRUZ *et al.* (2022) verificaram que o teor de fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos é maior nas cascas do caule (970,4 mg GAE/g) do que nas folhas (693,8 mg GAE/g).

A cicatrização de feridas, é relacionada à presença de proantocianidinas. Estas substâncias permanecem a partir do extrato etanólico de cascas do caule de *S. adstringens* e foram identificados ácido gálico, catequina, galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina (DO NASCIMENTO *et al.*, 2013).

As proantocianidinas presentes em *S. adstringens* foram objeto de estudo para *crosslinking* de colágeno corneano em três estudos, conduzidos no Brasil. Da Cruz *et al.*, (2018) verificaram a influência dos extratos do caule desta planta, na reticulação das córneas de coelhos, por DSC; e Bersanetti *et al.* (2019) usando a mesma técnica associada à digestão enzimática em córneas de suínos, comparando com extratos de açaí. Posteriormente, Bersanetti *et al.* (2023) analisaram da influência do tempo e da concentração do extrato da casca de *S. adstringens* no *crosslinking* corneano.

2.4.4 Semente de uva

A produção de uva é uma atividade econômica de origem bastante remota. Estudos arqueológicos revelaram fósseis de sementes de videira que datam da Era Cenozoica. O centro de origem, provavelmente, é a Groenlândia, onde há 300 mil anos surgiu a primeira espécie de videira. Pouco a pouco a videira foi se difundindo e se adaptando a diversas regiões do globo terrestre (CABRAL, 2009).

A uva, fruto da videira, pode ter forma redonda, ovoide ou elipsoide, e é de peso e tamanho variável, de cor verde, amarela, dourada, rosada, rubra, azulada ou preta, geralmente doce e mais ou menos ácida e comestível, surge em forma de cacho. É amplamente consumida, in natura ou na forma de sucos e geleias. O tronco corresponde à zona mais volumosa, é tortuoso e tem uma casca espessa tanto maior quanto mais velha é a videira. Como a videira é uma planta trepadeira, tem necessidade de se agarrar a um guia para ficar na posição vertical (PIRES, 2010).

As videiras pertencem à família *Vitaceae*, que pode ser dividida em dois gêneros. O gênero *Vitis* agrupa as espécies de maior importância econômica, que são as uvas de mesa e as uvas para vinho. Há também o gênero *Cissus*, de espécies ornamentais (CABRAL, 2009).

O gênero *Vitis* é representado por 80 espécies, compostas por dois subgêneros, *Muscadinia* e *Euvitis*. A maioria das videiras cultivadas pertence ao subgênero *Euvitis*, incluindo as duas videiras mais importantes economicamente, *Vitis vinífera* L. (grupo eurasiático), que representa a maioria das variedades de *Vitis* do mundo, e *Vitis labrusca* L. (grupo americano) que predomina em área cultivada no Brasil. As variantes destas duas espécies (Isabel, Concord, Bordô, Niágara, etc.) são as principais cultivares utilizadas na indústria de processamento de uva (para uso em vinho, suco, passas, uvas de mesa, etc.) nos 10 maiores produtores mundiais (mais de 85% nos EUA e Brasil) (KURT-CELEBI *et al.*, 2020).

A área plantada com videiras no Brasil, em 2021, foi de 75.007 hectares, sendo na Região Sul a maior concentração de viticultura e maior produtora de uvas, com 73% da área total e 62,92% da produção nacional. O Rio Grande do Sul é o principal estado produtor, representando 62,41% da área vitícola nacional, o que corresponde a uma área de 46.815 hectare, com produção de 951.567 toneladas de uvas em 2021, 56,05% da produção nacional. A maior parte da produção refere-se às cultivares de uvas americanas e híbridas, destinadas principalmente ao processamento para elaboração de vinhos de mesa e suco de uvas, (MELLO; MACHADO, 2022).

Devido à uva ser uma das frutas mais cultivadas em todo o mundo, sua composição e propriedades têm sido extensivamente investigadas e recebido atenção considerável por causa

de seus polifenóis, uma importante fonte de fitoquímicos nas uvas, principalmente estilbenos (resveratrol), flavonoides, proantocianidinas, antocianinas e ácidos fenólicos que são encontrados em quantidades variadas na casca, polpa e semente. Apresentam um amplo espectro de propriedades promotoras da saúde, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antibacterianas (KURT-CELEBI *et al.*, 2020).

As sementes e a casca são subprodutos obtidos após a produção do vinho e constituem uma fonte barata para a extração de compostos antioxidantes, proporcionando importantes vantagens econômicas. São boas fontes de fitoquímicos, como ácido gálico, catequina, epicatequina e procianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas, e são matérias-primas adequadas para a produção de suplementos dietéticos antioxidantes. Ainda, podem potencialmente conter mais antioxidantes quantitativa ou qualitativamente do que a polpa (ROCKENBACH *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011).

A composição das sementes de uva é basicamente (p/p) 40% fibra, 16% óleo essencial, 11% proteína, 7% compostos fenólicos complexos como taninos, açúcares, minerais e outras substâncias (ROCKENBACH *et al.*, 2011). O extrato de semente de uva é um dos aditivos naturais recomendado como antioxidante. O componente de interesse é o polifenol, principalmente proantocianidinas (SANTOS *et al.*, 2011).

As proantocianidinas derivadas da semente de uva, têm sido utilizadas como agentes de *crosslinking* principalmente em estudos da odontologia. O uso de reticuladores de colágeno é proposto para melhorar as propriedades mecânicas da matriz dentária. O reforço e o fortalecimento do colágeno dentinário por meio da reticulação de colágeno inter e intramolecular ajudam a aumentar a resistência de união e a durabilidade da interface resina/dentina com o tempo contra a degradação enzimática e/ou hidrolítica (GAJJELA *et al.*, 2017).

Castellan *et al.* (2011) caracterizaram as propriedades da matriz de dentina tratada com agentes reticulantes ricos em proantocianidinas e seu efeito nas interfaces de união dentinária; castellan *et al.* (2013), investigaram a resistência de ligações resina-dentina biomodificadas por proantocianidinas; Gajjela *et al.* (2017), Al-Ammar *et al.* (2009), Bedran-Russo *et al.* (2011) e Aguiar *et al.* (2014) comparam as alterações nas propriedades bioquímicas e biomecânicas nas matrizes de dentina biomodificada pelas proantocianidinas com outros reticuladores. Todos incluíram a semente de uva como uma fonte de proantocianidinas.

Tendões bovinos também foram utilizados em experimentos com proantocianidinas extraídas de semente de uva como agente de reticulação de colágeno. HE *et al.* (2011)

investigaram a estrutura de moléculas e microfibrilas de colágeno tipo I e HAN *et al.* (2003), avaliaram a estabilização de matrizes de colágeno para biopróteses.

2.4.5 Canela

Cinnamomum deriva da palavra grega “*kinnamomon*” que significa “especiaria” e “madeira doce” (KUMAR *et al.*, 2019). O gênero *Cinnamomum* (família *Lauraceae*) foi descrito por Schaeffer, Jacob Christian (H. von) Schaeffer, no ano de 1760, e contém mais de 300 árvores aromáticas perenes e arbustos de 10 a 15 m de altura, encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, frequentemente na Ásia e algumas na América do Sul e Central e na Austrália (KUMAR *et al.*, 2019; NABAVI *et al.*, 2015).

As folhas são ovais-oblongas e 7-18 cm de comprimento, as flores são de cor esverdeada e dispostas em panículas e a fruta é uma baga roxa de 1 cm com uma única semente. Distribui-se por florestas tropicais em várias altitudes, desde encostas de terras altas até florestas de terras baixas, incluindo lugares pantanosos e em solos bem drenados. No entanto, são mais raras em latitudes com condições climáticas sazonais (KUMAR *et al.*, 2019).

Quatro espécies têm grande importância econômica por seus múltiplos usos culinários como especiarias comuns em todo o mundo: *Cinnamomum verum* J. Presl (canela verdadeira, canela do Sri Lanka ou canela do Ceilão, sinônimo: *Cinnamomum zeylanicum*), *Cinnamomum loureiroi* Nees. (canela vietnamita ou Saigon), *Cinnamomum burmanni* (Nees & T.Nees) Blume (Java ou canela indonésia) e *Cinnamomum aromaticum* Nees (sinônimo: *Cinnamomum cassia* (L.) Presl, conhecida como canela cássia ou canela chinesa) (KUMAR *et al.*, 2019; NABAVI *et al.*, 2015).

O termo canela comumente se refere à casca seca de *C. verum* ou *C. aromaticum* usada para a preparação de diferentes tipos de chocolate, bebidas, doces picantes e licores. Além disso, a canela é usada em vários pratos salgados, pickles, sopas e doces (NABAVI *et al.*, 2015).

Ainda, a casca de *C. cassia* tem sido usada como medicamento tradicional para tratar amenorreia, distúrbios gastrointestinais, palpitações cardíacas, diarreia, edema, dismenorreia, artrite reumatoide, impotência e diabetes. O extrato aquoso de canela exibe atividades imunossupressoras, antioxidantes, antiproliferativas, angiogênicas, antinociceptivas e anti-inflamatórias (CHANG *et al.*, 2021).

Representa uma das principais fontes de compostos fenólicos, e existem vários metabólitos secundários e bioativos, como diterpenóides, fenilpropanóides, flavonoides, lignanas, sesquiterpenóides, proantocianidinas, ácidos cinâmicos, cumarinas, ácidos protocatecúicos e outros compostos (CHANG *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2018).

Killday *et al.* (2011) isolaram duas proantocianidinas triméricas, cinamtanino B-1 e cinamtanino D-1, da casca de *C. cassia* juntamente com o tetrâmero parameritanino A-1 e um tetrâmero não relatado anteriormente, denominado cassiatanino A.

Wu *et al.* (2021) identificaram em *C. cassia* e *C. verum* 108 componentes característicos, incluindo 58 proantocianidinas, 18 alcaloides e 32 outros componentes.

Poucos estudos com espécies de canela como geradores de proantocianidinas para *crosslinking* foram realizados. Habilidades de biomodificação da dentina por proantocianidinas triméricas e tetraméricas isoladas da casca de *C. verum* foram estudadas por Jinga *et al.* (2022) e Nam *et al.* (2020). Extratos de *C. verum* e *C. cassia* também foram estudados por Aguiar *et al.* (2014) em interação com a matriz da dentina, quanto às propriedades mecânicas e biodegradabilidade.

2.4.6 Cacau

O cacauero, *Theobroma cacao L.*, do grego *theo* (Deus) e *broma* (bebida) - “bebida dos deuses”, é a árvore da qual se origina o cacau, uma eudicotiledônea pertencente à família das Malváceas. Endêmica das florestas tropicais da América, esta frutífera foi domesticada há cerca de 3000 anos, tornando-se importante fonte econômica pelo fato das sementes serem a matéria-prima para a produção de chocolate (ALEXANDRE *et al.*, 2015; KWIK-URIBE, 2005).

Três variedades principais são cultivadas em todo o mundo: Forastero (grau a granel, baixa qualidade), Criollo (grau fino, qualidade mais alta) e Trinitario (grau fino, híbrido de Forastero e Criollo). Forasteiro é a variedade mais produzida e utilizada. Seus grãos correspondem a 80% da produção total de chocolate, enquanto os grãos Trinitario e Criollo apenas em 10-15% e 5-10%, respectivamente (ESATBEYOGLU *et al.*, 2015).

Os principais produtores de cacau são a Costa do Marfim e Gana, pois cobrem 60% de todo o cacau usado para a produção de chocolate em todo o mundo. No entanto, os maiores fabricantes de chocolate estão sediados na América do Norte e na Europa, sendo os suíços os principais consumidores (8,8 kg/ano/per capita) (MARTIN; RAMOS, 2021). No Brasil, o sul da Bahia é o principal produtor de amêndoas de cacau, sendo responsável por cerca de 70% da produção nacional seguido dos estados do Pará e Espírito Santo, com 25 e 3%, respectivamente (ALEXANDRE *et al.*, 2015).

Embora grande parte do mundo relacione o cacau somente com o chocolate, o cacau tem uma longa história de uso como alimento e como medicamento tradicional. Originário do Novo Mundo e depois adotado pela Europa no século XVI, o cacau e o chocolate foram usados como veículos para a administração de medicamentos, além de serem considerados

medicamentos por si só. Sozinho ou em combinação com outras ervas, plantas e alimentos, o foram administrados para tratar uma série de doenças, como distúrbios digestivos, dores cardíacas, inflamação e insônia (KWIK-URIBE, 2005).

Nas últimas décadas, tem havido um crescente interesse em estudar o cacau e seus derivados como superalimentos, não apenas por suas características sensoriais únicas, mas também por seus compostos nutricionais benéficos à saúde humana (CORTEZ *et al.*, 2023). O cacau constitui uma rica fonte de fibras (40-26%), lipídios (24-10%), proteínas (20-15%), carboidratos (15%) e micronutrientes (<2%), incluindo minerais (P, Ca, K, Na, Mg, Zn, Cu) e vitaminas (A, B, E) (MARTIN; RAMOS, 2021). Ainda, diferentes estudos demonstraram que o cacau possui efeitos benéficos à saúde, contribuindo para a prevenção de doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, diabetes, obesidade e envelhecimento, portanto, essa espécie apresenta amplo potencial para o desenvolvimento de fármacos e cosméticos (MARTÍN; RAMOS, 2017).

O cacau também contém grandes quantidades de metilxantinas (teobromina e cafeína) e compostos fenólicos denominados flavanóis, que compõem 13,5% dos grãos de cacau não fermentados secos. As procianidinas, depois dos flavan-3-óis, são as principais classes de polifenóis no cacau e nos produtos de cacau que lhes conferem o sabor adstringente e amargo. O teor de flavan-3-ol e procianidina em vários produtos de cacau varia de 2 a 500 mg/g principal flavan-3-ol nos grãos de cacau é a (-)-epicatequina, que também é a principal unidade de extensão das procianidinas diméricas (B2, B5 e B1). Além disso, ocorrem as procianidinas trimérica C1 e procianidina tetramérica (cinamtanino A2) e outros polifenóis em quantidades menores (luteolina, apigenina, naringenina, quercetina, isoquercitrina, etc.) (ESATBEYOGLU *et al.*, 2015; MARTIN; RAMOS, 2021; MARTÍN; RAMOS, 2017).

As proantocianidinas presentes no cacau já foram exploradas como agentes reticuladores de colágeno em estudos de odontologia restauradora, com objetivo de melhorar as propriedades biomecânicas da dentina através da reticulação de colágeno, reduzindo suas taxas de biodegradação. Segundo estudos de Aguiar *et al.* (2014) e Castellan *et al.* (2010), induziram um aumento significativo no módulo de elasticidade da dentina desmineralizada, e no estudo de Castellan *et al.* (2013), forneceram adesão imediata aprimorada e estabilização para dentina desmineralizada após armazenamento prolongado.

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a eficácia de extratos vegetais aquosos como indutores de *crosslinking* de colágeno na córnea de suínos, visando alternativas ao tratamento do ceratocone.

ESPECÍFICOS

Utilizar dados de DSC para avaliar a efetividade do *crosslinking* pelos extratos vegetais aquosos;

Avaliar a toxicidade dos extratos vegetais aquosos na córneas suínas através de histologia e microscopia óptica;

Comparar o perfil de desnaturação e toxicidade das córneas suínas expostas aos extratos vegetais aquosos com o das córneas não tratadas, e das tratadas com *crosslinking* tradicional;

Reproduzir estudos prévios com açáí e barbatimão para padronização metodológica;

Verificar a composição química dos extratos vegetais aquosos em estudo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M. P.; PHANSALKAR, R. S.; TODOROVA, I.; NAPOLITANO, J. G.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 417–422, 2014.

AL-AMMAR, A.; DRUMMOND, J. L.; BEDRAN-RUSSO, A. K. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 91, n. 1, p. 419–424, 2009.

ALEXANDRE, R. S.; CHAGAS, K.; MARQUES, H. I. P.; COSTA, P. R.; CARDOSO FILHO, J. Fruit characterization of cocoa clones in the coastal region of São Mateus city, ES. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 8, p. 785–790, 2015.

AMBEKAR, R.; TOUSSAINT, K. C.; WAGONER JOHNSON, A. The effect of keratoconus on the structural, mechanical, and optical properties of the cornea. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 3, p. 223–236, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.09.014>.

AVILA, M. Y.; GERENA, V. A.; NAVIA, J. L. Corneal crosslinking with genipin, comparison with UV-riboflavin in ex-vivo model. **Molecular Vision**, v. 18, n. November 2011, p. 1068–1073, 2012.

BEDRAN-RUSSO, A. K. B.; CASTELLAN, C. S.; SHINOHARA, M. S.; HASSAN, L.; ANTUNES, A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1735–1741, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.013>.

BERSANETTI, P. A.; BUENO, T. L. N.; MORANDIM-GIANNETTI, A. de A.; NOGUEIRA, R. F.; MATOS, J. R.; SCHOR, P. Characterization of Rabbit Corneas Subjected to Stromal Stiffening by the Açai Extract (*Euterpe oleracea*). **Current Eye Research**, v. 42, n. 4, p. 528–533, 2017.

BERSANETTI, P. A.; DA CRUZ, L. G. I.; CARLSTRON, R.; SCHOR, P.; MORANDIM-GIANNETTI, A. de A. DSC characterization of enzymatic digestion of corneas treated with plant extracts rich in polyphenols. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, n. 5, p. 3797–3802, 2019.

BERSANETTI, P. A.; MARQUINI, A. de A.; MORANDIM-GIANNETTI, A. de A. DSC analysis of the influence of time and concentration of *Stryphnodendron adstringens* extract on corneal cross-linking. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 148, n. 1, p. 191–195, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11730-9>.

BHAGWAT, S.; HAYTOWITZ, D. USDA database for the proanthocyanidin content of selected foods. **U. S. Department of Agriculture**, v. 2, p. 1–45, 2015.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2,

p. 141–148, 2008.

BUENO, T. L. N.; NOGUEIRA, R. F.; MORANDIM-GIANNETTI, A. A.; SCHOR, P.; BERSANETTI, P. A. Avaliação do efeito de extratos vegetais na formação de ligações cruzadas em córneas de coelho por calorimetria exploratória diferencial. *In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA*, 2014, . **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 2014.

CABRAL, V. D. O. S. **Desenvolvimento Qualitativo Da Uva Niagara Rosada Cultivada No Norte Fluminense**. 2009. 1–78 f. Tese (Doutorado) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ, CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ 2009.

CASTELLAN, C. S.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; ANTUNES, A.; PEREIRA, P. N. R. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: One-year bond strength study. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, 2013.

CASTELLAN, C. S.; PEREIRA, P. N.; HELENA, R.; GRANDE, M.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; MATERIALS, D.; PAULO, S.; PAULO, S. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. **Dent Mater**, v. 26, n. 10, p. 968–973, 2010.

CHANG, S. W.; LEE, J. S.; LEE, J. H.; KIM, J. Y.; HONG, J.; KIM, S. K.; LEE, D.; JANG, D. S. Aromatic and Aliphatic Apiuronides from the Bark of *Cinnamomum cassia*. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 3, p. 553–561, 2021.

CORTEZ, D.; QUISPE-SANCHEZ, L.; MESTANZA, M.; OLIVA-CRUZ, M.; YOPLAC, I.; TORRES, C.; CHAVEZ, S. G. Changes in bioactive compounds during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) harvested in Amazonas-Peru. **Current Research in Food Science**, v. 6, n. March, 2023.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.

DA CRUZ, J. E. R.; COSTA, J. L. G.; TEIXEIRA, T. A.; FREITAS, G. R. O.; DE SOUZA GOMES, M.; MORAIS, E. R. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activity of extract from leaves and bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 53, p. 1–9, 2022.

DA CRUZ, L. G. I.; MORAES, G. de A.; NOGUEIRA, R. F.; MORANDIM-GIANNETTI, A. de A.; BERSANETTI, P. A. DSC characterization of rabbit corneas treated with *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville extracts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 621–625, 2018.

DANILOV, N. A.; IGNATIEVA, N. Y.; IOMDINA, E. N.; SEMENOVA, S. A.; RUDENSKAYA, G. N.; GROKHOVSKAYA, T. E.; LUNIN, V. V. Stabilization of scleral collagen by glycerol aldehyde cross-linking. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 5, p. 764–772, 2008.

DANTAS, A. M. **Anatomia do aparelho visual**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2013.

2013.

DANTAS, A. M. Fisiologia da túnica fibrosa. *In*: DANTAS, Adalmir Morterá; FILHO, Acácio Alves de Souza Lima; MARBACK, Roberto Lorens (org.). **Fisiologia, farmacologia e patologia ocular - Série oftalmologia brasileira**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2013. p. 3–58.

DHAWAN, S.; RAO, K.; NATRAJAN, S. Complications of Corneal Collagen Cross-Linking. **Journal of Ophthalmology**, v. 2011, p. 1–5, 2011.

DINIZ, C. M. G. P.; BURITI, J. da S.; BARBOSA, R. C.; FOOK, M. V. L. Comparative study between reticulating agents for possible application in the treatment of keratoconus. **Revista Materia**, v. 24, n. 3, 2019.

DO NASCIMENTO, A. M.; GUEDES, P. T.; CASTILHO, R. O.; VIANNA-SOARES, C. D. Stryphnodendron adstringens (Mart.) coville (Fabaceae) proanthocyanidins quantitation by RP-HPLC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 549–558, 2013.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>.

ESATBEYOGLU, T.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric and pentameric procyanidins from unroasted cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) using countercurrent chromatography. **Food Chemistry**, v. 179, p. 278–289, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.130>.

ESPANA, E. M.; BIRK, D. E. Composition, structure and function of the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 198, n. July, p. 108137, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108137>.

FARAJO, A. A.; MCDERMOTT, M. L.; SOONG, H. K. Anatomia, fisiologia e reparo da córnea. *In*: YANOFF, Myron; DUKER, Jay S (org.). **Oftalmologia**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 203–208.

FINE, A. M. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 2, p. 144–151, 2000.

FRIEDENWALD, J. S. Contribution to the theory and practice of hypochlorite bleaching. **Am J Ophthalmol**, v. 20, n. 10, p. 985–1024, 1937.

GAJJELA, R. S.; SATISH, R. K.; SAJJAN, G. S.; VARMA, K. M.; RAMBABU, T.; LAKSHMI, B. H. V. Comparative evaluation of chlorhexidine, grape seed extract, riboflavin/chitosan modification on microtensile bond strength of composite resin to dentin after polymerase chain reaction thermocycling: An in vitro study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 120–124, 2017.

GORDON, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; DE FREITAS, S. C.; TAXI, C. M. A. D.; DONANGELO, C. M.; DE ANDRADE MATTIETTO, R.; FRIEDRICH, M.; DA MATTA, V.

M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 256–263, 2012.

GU, L.; SHAN, T.; MA, Y. xuan; TAY, F. R.; NIU, L. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 464–491, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.007>.

HAN, B.; JAUREQUI, J.; TANG, B. W.; NIMNI, M. E. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 65, n. 1, p. 118–124, 2003.

HASSELL, J. R.; BIRK, D. E. The molecular basis of corneal transparency. **Experimental Eye Research**, v. 91, n. 3, p. 326–335, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2010.06.021>.

HAYES, S.; BOOTE, C.; TUFT, S. J.; QUANTOCK, A. J.; MEEK, K. M. A study of corneal thickness, shape and collagen organisation in keratoconus using videokeratography and X-ray scattering techniques. **Experimental Eye Research**, v. 84, n. 3, p. 423–434, 2007.

HE, L.; MU, C.; SHI, J.; ZHANG, Q.; SHI, B.; LIN, W. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 354–359, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012>.

INDURKAR, A.; PANDIT, A.; JAIN, R.; DANDEKAR, P. Plant based cross-linkers for tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 1, p. 76–94, 2021.

KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G. S.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610–617, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.020>.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A. G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 152–157, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.011>.

KILLDAY, K. B.; DAVEY, M. H.; GLINSKI, J. A.; DUAN, P.; VELURI, R.; PRONI, G.; DAUGHERTY, F. J.; TEMPESTA, M. S. Bioactive A-type proanthocyanidins from *Cinnamomum cassia*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 9, p. 1833–1841, 2011.

KLING, S.; REMON, L.; PÉREZ-ESCUADERO, A.; MERAYO-LLOVES, J.; MARCOS, S. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 51, n. 8, p. 3961–3968, 2010.

KOTECHA, A. What Biomechanical Properties of the Cornea Are Relevant for the Clinician?. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, n. 6 SUPPL., p. 109–114, 2007.

KUMAR, S.; KUMARI, R.; MISHRA, S. Pharmacological properties and their medicinal uses of *Cinnamomum*: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 12, p. 1735–1761, 2019.

KURT-CELEBI, A.; COLAK, N.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S.; VELIČKOVSKA, S. K.; ILIEVA, F.; ESATBEYOGLU, T.; AYAZ, F. A. Accumulation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity during Berry Development. **Molecules**, v. 25, n. 3845, p. 1–23, 2020.

KWIK-URIBE, C. Potential health benefits of cocoa flavanols. **The Manufacturing Confectioner**, v. 85, n. 10, p. 43–49, 2005.

LIU, X.; FU, J.; YAO, X. J.; YANG, J.; LIU, L.; XIE, T. G.; JIANG, P. C.; JIANG, Z. H.; ZHU, G. Y. Phenolic Constituents Isolated from the Twigs of *Cinnamomum cassia* and Their Potential Neuroprotective Effects. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 6, p. 1333–1342, 2018.

LIU, T. X.; WANG, Z. Collagen crosslinking of porcine sclera using genipin. **Acta Ophthalmologica**, v. 91, n. 4, p. 253–257, 2013.

MA, J.; WANG, Y.; WEI, P.; JHANJI, V. Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. **Survey of Ophthalmology**, v. 63, n. 6, p. 851–861, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2018.05.004>.

MARTIN, M. Á.; RAMOS, S. Impact of cocoa flavanols on human health. **Food and Chemical Toxicology**, v. 151, n. November 2020, 2021.

MARTÍN, M. Á.; RAMOS, S. Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: a mini-review. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 20–25, 2017.

MATTEOLI, S.; VIRGA, A.; PALADINI, I.; MENCUCCHI, R.; CORVI, A. Investigation into the elastic properties of ex vivo porcine corneas subjected to inflation test after cross-linking treatment. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, v. 14, n. 2, p. e163–e170, 2016.

MELLO, L. M. R. De; MACHADO, C. A. E. Vitivinicultura brasileira : panorama 2021. **Comunicado técnico**, Bento Gonçalves-RS, v. 226, p.17, 2022. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1149674>.

MILES, C. A.; AVERY, N. C.; RODIN, V. V.; BAILEY, A. J. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. **Journal of Molecular Biology**, v. 346, n. 2, p. 551–556, 2005.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>.

MORANDIM-GIANNETTI, A. de A.; CARVALHO, T. S.; DE ANDRADE NETO, J. C.; BERSANETTI, P. A. DSC evaluation of cross-link development induced by laccases in corneas. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 148, n. 1, p. 63–68, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11783-w>.

NABAVI, S. F.; DI LORENZO, A.; IZADI, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 7729–7748, 2015.

NAFEES, S.; AKHTAR, J.; KAUR, J. Indian traditional medicinal plants in ophthalmic diseases. **Ajp**, v. 12, n. 6, p. 566–575, 2022. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.22038/AJP.2022.20345>.

O'BRART, D. P. S. Corneal collagen crosslinking for corneal ectasias: A review. **European Journal of Ophthalmology**, v. 27, n. 3, p. 253–269, 2017.

OLIVEIRA, N. K. S. de; ALMEIDA, M. R. S.; PONTES, F. M. M.; BARCELOS, M. P.; SILVA, G. M.; DE PAULA DA SILVA, C. H. T.; CRUZ, R. A. S.; DA SILVA HAGEMELIM, L. I. Molecular Docking, Physicochemical Properties, Pharmacokinetics and Toxicity of Flavonoids Present in *Euterpe oleracea* Martius. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 17, n. 4, p. 589–617, 2020.

OLIVEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, M. D. S. P.; DAVIDE, L. C.; TORRES, G. A. Karyotype and genome size in *Euterpe* Mart. (Arecaceae) species. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 1, p. 17–25, 2016.

ONEM, E.; YORGANCIOGLU, A.; KARAVANA, H. A.; YILMAZ, O. Comparison of different tanning agents on the stabilization of collagen via differential scanning calorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 129, n. 1, p. 615–622, 2017.

PHANSALKAR, R. S.; NAMA, J.-W.; CHENA, S.-N.; MCALPINEA, J. B.; NAPOLITANO, J. G.; LEMEB, A.; VIDALB, C. M. P.; AGUIARB, T.; RUSSOB, A. K. B.; PAULI, G. F. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. **Fitoterapia**, v. 171, n. 1, p. 169–178, 2015.

PIRES, A. P. **Composição química e atividade antioxidante de folhas de diferentes castas de videira**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Politécnica de Bragança, Bragança 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10198/4872>.

RABINOWITZ, Y. S. Keratoconus. **Survey of Ophthalmology**, v. 42, n. 4, p. 297–319, 1998.

RIBEIRO, M. M. de S.; DOS SANTOS, L. C.; DE NOVAIS, N. S.; VIGANÓ, J.; VEGGI, P. C. An evaluative review on *Stryphnodendron adstringens* extract composition: Current and future perspectives on extraction and application. **Industrial Crops and Products**, v. 187, 2022.

ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; RIZELIO, V. M.; GONÇALVES, A. E. de S. S.; GENOVESE, M. I.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 897–901, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.049>.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; SANTODOMINGO-RUBIDO, J.; WOLFFSOHN, J. S. Keratoconus: A review. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 33, n. 4, p. 157–166, 2010.

RUBERTI, J. W.; ZIESKE, J. D. Prelude to corneal tissue engineering - Gaining control of collagen organization. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 27, n. 5, p. 549–577, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.08.001>.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; DE TOLEDO, C. E. M.; DO SACRAMENTO, L. V. S.; SAKURAGUI, C. M.; DE MELLO, J. C. P. Estudo morfológico comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* - Leguminosae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 362–368, 2007.

SANTHIAGO, M. R. Corneal crosslinking: The standard protocol. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 76, n. 1, p. 43–49, 2017.

SANTODOMINGO-RUBIDO, J.; CARRACEDO, G.; SUZAKI, A.; VILLA-COLLAR, C.; VINCENT, S. J.; WOLFFSOHN, J. S. Keratoconus: An updated review. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 45, n. 3, p. 101559, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clae.2021.101559>.

SANTOS, L. P.; MORAIS, D. R.; SOUZA, N. E.; COTTICA, S. M.; BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1414–1418, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.022>.

SIONKOWSKA, A. Thermal stability of UV-irradiated collagen in bovine lens capsules and in bovine cornea. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 80, n. 2, p. 87–92, 2005.

SLUSAREWICZ, P.; ZHU, K.; HEDMAN, T. Kinetic characterization and comparison of various protein crosslinking reagents for matrix modification. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 4, p. 1175–1181, 2010.

SONG, W.; TANG, Y.; QIAO, J.; LI, H.; RONG, B.; YANG, S.; WU, Y.; YAN, X. The comparative safety of genipin versus UVA-riboflavin crosslinking of rabbit corneas. **Molecular Vision**, v. 23, n. July, p. 504–513, 2017.

SORENSEN, R. L.; BRELJE, T. C. **Organs of special sense**. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://histologyguide.com/slideview/MHS-227a-eye/20-slide-1.html?x=3216&y=37022&z=21.2>. Acesso em: 15 fev. 2024.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M.; PIETRO, R. C. L. R. *Stryphnodendron* species known as “barbatimão”: A comprehensive report. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–25, 2018.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71–75, 2007.

SPOERL, E.; HUHLE, M.; SEILER, T. Induction of cross-links in corneal tissue. **Experimental Eye Research**, v. 66, n. 1, p. 97–103, 1998.

SPOERL, E.; RAISKUP, F. History of corneal cross-linking. In: HAFEZI, Farhad; RANDLEMAN, J. Bradley (org.). **Corneal Crosslinking**. 2a. ed. Thorofare, NJ: Slack Incorporated, 2017. p. 3–7.

SPOERL, E.; WOLLENSAK, G.; SEILER, T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. **Current Eye Research**, v. 29, n. 1, p. 35–40, 2004.

SRIDHAR, M. S. Anatomy of cornea and ocular surface. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 66, n. 2, p. 190–194, 2018.

SUBASINGHE, S. K.; OGBUEHI, K. C.; DIAS, G. J. Current perspectives on corneal collagen crosslinking (CXL). **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 256, n. 8, p. 1363–1384, 2018.

SUNG, H. W.; CHANG, W. H.; MA, C. Y.; LEE, M. H. Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 64, n. 3, p. 427–438, 2003.

TIDU, A.; SCHANNE-KLEIN, M. C.; BORDERIE, V. M. Development, structure, and bioengineering of the human corneal stroma: A review of collagen-based implants. **Experimental Eye Research**, v. 200, 2020.

VELLARA, H. R.; PATEL, D. V. Biomechanical properties of the keratoconic cornea: A review. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 98, n. 1, p. 31–38, 2015.

VIEIRA, L. A.; HÖFLING-LIMA, A. L. Estrutura e função externa do olho e córnea. *In*: HÖFLING-LIMA, Ana Luisa; NISHIWAKI-DANTAS, Maria Cristina; ALVES, Milton Ruiz (org.). **Doenças externas oculares e córnea - Série oftalmologia brasileira**. 3a. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2013. p. 5–12.

VOLATIER, T. L. A.; FIGUEIREDO, F. C.; CONNON, C. J. Keratoconus at a Molecular Level: A Review. **Anatomical Record**, v. 303, n. 6, p. 1680–1688, 2020.

WANG, Y. J.; GUO, J.; CHEN, H.; SHAN, Z. H. Influence of containing moisture on hydrothermal stability of modified collagen thermal characteristics analysis by DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 1, p. 295–300, 2010.

WOLLENSAK, G. Fundamental principles of corneal cross-linking. *In*: HAFEZI, Farhad; RANDLEMAN, J. Bradley (org.). **Corneal Crosslinking**. 2a. ed. Thorofare, NJ: Slack Incorporated, 2017. p. 19–24.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; SEILER, T. Riboflavin/ultraviolet-A-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. **American Journal of Ophthalmology**, v. 135, n. 5, p. 620–627, 2003.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; SEILER, T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin ultraviolet-A-induced cross-linking. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 29, n. 9, p. 1780–1785, 2003.

WOLLENSAK, G.; SPOERL, E.; WILSCH, M.; SEILER, T. Endothelial cell damage after riboflavin-ultraviolet-A treatment in the rabbit. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 29, n. 9, p. 1786–1790, 2003.

WU, X.; LONG, H.; LI, F.; WU, Wenyong; ZHOU, J.; LIU, C.; HOU, J.; WU, Wanying; GUO,

D. Comprehensive feature-based molecular networking and metabolomics approaches to reveal the differences components in *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum verum*. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 20, p. 3810–3821, 2021.

ZARE, M.; MAZLOUMI, M.; FARAJIPOUR, H.; HOSEINI, B.; FALLAH, M.; MAHRJERDI, H.; ABTAHI, M.-A.; ABTAHI, S.-H. Effects of corneal collagen crosslinking on confocal microscopic findings and tear indices in patients with progressive keratoconus. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 7, n. 1, p. 132, 2016.

ZEITOUNE, A. A.; BERSANETTI, P. A.; SCHOR, P.; ERBES, L. A.; CESAR, C. L.; ADUR, J. Comparison of morphological changes of corneal collagen fibers treated with collagen crosslinking agents using second harmonic generation images. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 346–353, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.147>.

ZHAI, W.; CHANG, J.; LIN, K.; WANG, J.; ZHAO, Q.; SUN, X. Crosslinking of decellularized porcine heart valve matrix by procyanidins. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3684–3690, 2006.