UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da atividade estrogênica de extrato de soja
biotransformado por fungo na produção de colágeno**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado(a): Bianca Stocco

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Maria Regina
Torqueti

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Maria José
Vieira Fonseca

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós -Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 23/02/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

RESUMO

STOCCO, B. **Avaliação da atividade estrogênica de extrato de soja biotransformado por fungo na produção de colágeno**. 2015.97f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O hipoestrogenismo decorrente da menopausa acelera o envelhecimento da pele. Apesar de possuir efeitos positivos na pele, dois grandes estudos apontaram para os efeitos adversos da TH (terapêutica hormonal) estroprogestiva. Os fitoestrógenos são utilizados como terapia alternativa para mulheres com contraindicação à TH clássica. Dentre os fitoestrógenos, as isoflavonas daidzeína (D) e genisteína (G) são encontradas em pequenas quantidades na soja e possuem capacidade de promover efeitos benéficos na pele quando administradas por via oral e subcutânea. Entretanto, nenhum estudo investigou se estas isoflavonas podem aumentar o colágeno da pele quando administradas por via tópica, e se este efeito está relacionado com os receptores de estrógeno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações cosméticas contendo extrato de soja biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* e analisar o potencial estrogênico deste extrato na produção de colágeno. Para contemplar nosso objetivo, foram produzidos quatro diferentes tipos de extrato de soja biotransformado, e após definir qual o extrato com maior concentração das isoflavonas (D e G), este extrato (ESBE) foi submetido a testes de citotoxicidade em células L929 (*mouse fibroblast cell line* - clone 929 da cepa L) e HDFa (*Human Dermal Fibroblast, adult*). Na segunda etapa foram desenvolvidas formulações cosméticas do tipo gel, creme e gel-creme incorporadas com ESBE, as quais foram utilizadas na realização de testes de estabilidade preliminar e em ensaio de permeação e retenção cutânea. Finalmente, foi realizado teste de eficácia para avaliar a produção de colágeno após tratamento com ESBE em cultura de fibroblastos humanos primários (HDFa). Os resultados demonstraram que a biotransformação é um processo eficaz para aumentar a concentração de D e G; o ESBE não demonstrou citotoxicidade em células L929 e HDFa; as formulações incorporadas com ESBE demonstraram possuir estabilidade preliminar; a formulação do tipo gel demonstrou ser a melhor opção para incorporação do ESBE visto que facilitou a retenção das isoflavonas na pele sem permitir a permeação de compostos para o líquido receptor; e finalmente, o ESBE é capaz de estimular a produção de colágeno em fibroblastos primários nas concentrações de 59 e 1,33µg/mL. Concluímos que o ESBE estimula a produção de colágeno, principalmente na concentração de 1,33µg/mL. Sugerimos que o mecanismo responsável por este efeito pode envolver a ligação da genisteína aos receptores de estrógeno, entretanto, outros mecanismos de ação das isoflavonas de soja como proteção contra stress oxidativo, indução da expressão de enzimas antioxidantes e a presença de proteínas inibidoras de proteases (BBI e STI) devem ser levadas em consideração.

Palavras-chave: 1.Menopausa, 2.Envelhecimento, 3.Isoflavonas da soja, 4.Biotransformação por fungos, 5. Colágeno.

1. Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Pele

A pele é composta por três camadas denominadas epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é formada por tecido epitelial de origem ectodérmica enquanto a derme é constituída por tecido conjuntivo de origem mesodérmica. A terceira e mais profunda camada da pele, a hipoderme ou camada gordurosa subcutânea, é composta por tecido gorduroso e conjuntivo (BROHEM et al., 2010).

Na epiderme estão localizados os queratinócitos, os quais formam o epitélio estratificado escamoso queratinizado. Muitos tipos celulares especiais estão presentes nesta camada, como os melanócitos, os quais produzem o pigmento melanina; as células de Langerhans, as quais fazem parte do sistema imune e as células de Merkel, representadas por receptores mecânicos. Derme e epiderme são separadas pela matrix extracelular (ECM), conhecida também por lâmina basal, porção mais profunda da camada germinativa, e local onde se inicia a divisão celular dos queratinócitos (BROHEM et al., 2010).

À medida que as divisões celulares ocorrem, os queratinócitos vão sendo substituídos em direção às camadas superficiais da epiderme. Ao atingirem o estrato espinhoso as células se tornam densas, e no estrato granuloso acumulam grânulos lipídicos, os quais são extremamente importantes na manutenção da hidratação da pele. A perda do núcleo nos queratinócitos diferenciados proporciona a estas células uma morfologia diferente, com células mais flácidas contendo somente queratina. O final da diferenciação dos queratinócitos ocorre na camada mais externa da epiderme (estrato córneo), e contém somente queratinócitos mortos e lipídios (principalmente ceramidas e esfingolipídios) (BROHEM et al., 2010).

A derme é composta por duas camadas denominadas camada papilar e camada reticular. A primeira é formada por tecido conjuntivo frouxo enquanto que a segunda camada é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, o qual é rico em colágeno e é responsável por conferir flexibilidade à pele (PROST- SQUARCIONI, 2006). Os fibroblastos são as células mais numerosas presentes no tecido conjuntivo frouxo da derme e são responsáveis por sintetizar colágeno, elastina e outros componentes da matriz extracelular (figura 1). Morfologicamente, a matriz extracelular é composta por muitas proteínas e glicosaminoglicanas, as quais se organizam

formando uma rede. Variações qualitativas e quantitativas nos componentes celulares da derme, epiderme e da matriz extracelular, assim como mudanças na organização destas camadas, são responsáveis por alterações morfológicas, funcionais e patológicas no tecido da pele (WULF et al., 2004).

Figura 1. Componentes e camadas da pele. Fonte: BROHEM et al, **Pigment Cell Melanoma Res**, 2010

O colágeno e a elastina são os responsáveis pelas qualidades estruturais e elásticas da pele. O colágeno representa de 70 a 80% do peso seco da pele humana, sendo o maior componente dermal e representando 30% do conteúdo total de proteínas do corpo humano (BRINCAT, BARON & GALEA, 2005). Embora um grande

número de tipos de colágeno tenha sido descrito até o momento, os mais abundantes e bem descritos são os tipos I, II e III. O tipo I é encontrado em 90% do corpo de um mamífero e juntamente com os tipos II e III são sintetizados por fibroblastos e osteoblastos formando fibras fortes e espessas (WULF et al., 2004).

A síntese do colágeno se inicia no núcleo, onde os genes codificadores das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são ativados e transcritos nos respectivos RNA mensageiros, os quais se deslocam do núcleo para o citoplasma onde são traduzidos em cadeias polipeptídicas imediatamente internalizadas nas cisternas do retículo endoplasmático formando o polissomo. No interior destes retículos as cadeias polipeptídicas sofrem hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina, formando-se a hidroxilisina. Após hidroxilação ocorre o alinhamento das cadeias e formação da molécula de procolágeno, precursora da molécula de colágeno madura. As moléculas de procolágeno são então secretadas dos fibroblastos por meio de vesículas e ao alcançarem a matriz extracelular são digeridas pela enzima procolágeno peptidase, a qual cliva os domínios carboxi e amino terminais presentes no procolágeno. Finalmente o tropocolágeno se associa espontaneamente para formar as fibrilas de colágeno (figura 2). Conforme mencionado, proteases específicas clivam os domínios carboxi e amino terminais do procolágeno, assim procolágeno tipo I e III são moléculas precursoras de colágeno maduro, e geralmente refletem os níveis de colágeno (MORISCOT; CARNEIRO; ABRAHAMSHON, 2004).

Figura 2. Biossíntese do colágeno. Fonte: BORNSTEIN, *Annu. Rev. Biochem*, 1974.

1.2 Menopausa

A menopausa é definida pela Organização Mundial da Saúde como o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica, com declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários, que ocorre naturalmente ou é induzida por cirurgia, quimioterapia ou radiação. A menopausa natural é reconhecida após 12 meses consecutivos sem períodos menstruais que não esteja associada com uma causa fisiológica (ex. lactação) ou

patológica (SPEROFF, 1999; NIH CONFERENCE, 2005). Normalmente a falência ovariana acontece por volta dos 51 anos, com o término tanto da menstruação quanto da ovulação (SANTORO, 2005; NELSON, 2008). Enquanto ambos os hormônios FSH (hormônio folículo estimulante) e (LH) hormônio luteinizante continuam aumentados (mecanismo de *feed back*) por três anos após o início da menopausa (KASE, 2009).

A baixa quantidade de estrógeno circulante leva a maioria das mulheres a desenvolver diferentes sintomas, tais como: sudorese; insônia; palpitações cardíacas; mudanças de humor; ansiedade; depressão; perda da memória e da concentração; irritabilidade e fadiga; ressecamento do epitélio vaginal; perda da libido; dispareunia; envelhecimento da pele, incontinência urinária, disúria, surgimento ou aumento da osteoporose, doenças cardiovasculares e mal de Alzheimer (SPRITZER & REIS, 1998; SANTORO, 2005; NIH CONFERENCE, 2005).

1.3 Menopausa e biologia da pele

O crescimento socioeconômico vem sendo paralelamente acompanhado por cuidados médicos de boa qualidade, proporcionando assim um aumento da expectativa de vida, especialmente para mulheres na pós-menopausa. Neste período, muitas alterações são observadas na pele, as quais afetam a qualidade de vida das mulheres (SPEROFF & FRITZ, 2005).

O envelhecimento da pele está associado com o afinamento da pele, atrofia, ressecamento, aparecimento de rugas e perda da capacidade de cicatrização. Algumas destas mudanças parecem estar associadas ao processo fisiológico de envelhecimento e à exposição solar; outras ocorrem devido à deficiência de estrógeno. Estudos têm demonstrado que os estrógenos proporcionam benefícios importantes e efeitos protetores na fisiologia da pele (THORNTON, 2002, 2005), visto que podem atravessar passivamente a membrana celular e modular a expressão gênica. Este hormônio tem demonstrado acelerar a cicatrização de feridas cutâneas (ASHCROFT & ASHWORTH, 2003) e proporcionar proteção contra o fotoenvelhecimento da pele (WEINSTOCK 1994; TSUKAHARA et al 2001, 2004).

Muitos dos efeitos do estrógeno na pele humana são baseados nas mudanças observadas em mulheres na pós-menopausa. Muitas mulheres relatam um início súbito de envelhecimento da pele vários meses após os sintomas da menopausa começarem a aparecer. O estrógeno pode ser produzido na placenta, nas glândulas

endócrinas (ovários e adrenais) e nos tecidos periféricos como intestino, fígado, tecido adiposo, rins e pele. A síntese de estrógeno por tecidos periféricos, como a epiderme, por exemplo, foi descoberta recentemente devido a estudos onde foi observada a presença de enzimas que metabolizam hormônios esteróides e receptores de estrógeno (ER α e ER β) nos tecidos periféricos (YANASE et al., 2003). Este fenômeno endócrino periférico denominado “intracrinologia” é agora considerado extremamente importante na manutenção da homeostase de tecidos periféricos (SASANO et al., 2008). Entretanto, a produção periférica de estrógeno é muito pequena quando comparada a produção deste hormônio pelos ovários, não sendo suficiente para combater o envelhecimento da pele que se acentua com o início da menopausa.

O hipoestrogenismo, decorrente da menopausa, acelera a deterioração da pele relacionada à idade, o que resulta no afinamento da pele, aumento no número de rugas profundas, aumento no ressecamento da pele e uma diminuição na firmeza e elasticidade da pele (BRINCAT, 2000). Em mulheres na pós-menopausa foi observada uma diminuição de 11,3% na espessura da pele e uma queda de 2% ao ano no conteúdo de colágeno (BRINCAT et al., 1987). A quantidade de colágeno presente na pele pode diminuir em até 30% nos cinco primeiros anos após o início da menopausa (BRINCAT et al 1985; AFFINITO et al 1999).

Diante de todas estas mudanças que ocorrem por volta dos 51 anos de idade, cada vez mais as mulheres procuram por um método seguro para aliviar os sintomas da menopausa e prevenir doenças comuns deste período, como doenças cardiovasculares e osteoporose. Mulheres do mundo todo estão à procura de opções para amenizar os sinais da idade, os quais são extremamente exacerbados com o aparecimento da menopausa, o que diminui a autoestima e consequentemente a qualidade de vida destas mulheres. Uma das alternativas para o alívio destes sintomas é a terapêutica hormonal (TH) (RINGA, 2000).

A TH conta com a prescrição de estrógenos e/ou progesterona sintéticos para diminuição dos sintomas da menopausa (HELFERICH, 2008). Entretanto, dois grandes estudos, o HERS e o WHI, questionaram os efeitos positivos da TH e alertaram para seus efeitos adversos: o aumento da incidência de câncer de mama e endométrio e doenças tromboembólicas em tratamentos prolongados (HURLEY et al.;1998; WHI, 2002), o que gerou questionamentos severos sobre a eficiência da TH, sobretudo porque o câncer de mama, dentre outros tipos de câncer, é a causa mais frequente de morte em mulheres (13% do total) (INCA, 2014)

1.4 TH e Biologia da pele

A Terapêutica hormonal (TH) tem demonstrado aumentar a hidratação epidermal, a elasticidade e a espessura da pele (SATOR et al., 2001), podendo também diminuir o aparecimento de rugas na pele (PHILLIPS et al, 2001). O estrógeno também é responsável por aumentar a síntese de colágeno ao mesmo tempo em que limita a degradação excessiva deste. O envelhecimento da pele diminui com tratamentos que contenham estrógeno, pois este hormônio é responsável por aumentar a síntese de fibras elásticas, como colágeno tipo III e ácido hialurônico (SHU & MAIBACH, 2011).

Trabalhos tem demonstrado que o estrógeno pode influenciar na espessura da pele por estimular a síntese e maturação de colágeno em ratos (SMITH & ALLISON, 1966) e em cobaias fêmeas (HENNEMAN, 1968). Tratamentos com 17 β estradiol resultaram em modificações morfológicas na pele envelhecida, caracterizadas principalmente pelo aumento no número de fibroblastos e glicosaminoglicanas. Estudos mais recentes confirmaram que o uso tópico de estrógeno aumenta a espessura da epiderme (SON et al.,2005; PATRIARCA et al., 2007). A TH também demonstrou melhorar a hidratação da pele durante administração sistêmica e tópica de estrógeno (PIERARD-FRANCHIMONT et al.,1995; SATOR et al., 2001). As aplicações tópicas constituem um método eficiente já que o tamanho molecular pequeno do estrógeno proporciona fácil penetração no estrato córneo (DRAELOS, 2005).

Apesar de todos os benefícios que o estrógeno pode promover na pele, no sistema cardiovascular e nos ossos, existem mulheres para as quais a TH é contraindicada por problemas tromboembólicos ou histórico de câncer em si ou em seus familiares. Por todas essas razões, o desenvolvimento de terapias alternativas que possam trazer benefícios à saúde da mulher sem contraindicações, como o uso oral e tópico de fitoestrógenos, tem sido objeto de interesse (GLAZIER et al., 2001; KASS-ANNESE, 2000).

1.5 Fitoestrógenos (FEs)

Os fitoestrógenos são considerados uma terapia alternativa à TH sintética, por apresentarem potencial efeito estrogênico e serem estruturalmente similares aos estrógenos dos mamíferos e seus metabólitos (WHITTEN, 1997). Seus compostos foram encontrados primeiramente na soja (*Glycine max*) e mais tarde em outras plantas: *Cimicifuga racemosa*, red clover (*Trifolium pratense*), no linho, no centeio e outros (REINLI et al, 1996).

A soja é constituída por ácidos fenólicos, proteínas e flavonoides. O termo fenólico compreende aproximadamente 8000 compostos naturais, os quais possuem pelo menos um componente com estrutura semelhante ao fenol (um anel aromático com pelo menos uma hidroxila (OH) ligada). A concentração de compostos fenólicos no grão de soja maduro varia de 1-3mg/g. Os ácidos fenólicos presentes em maior concentração na soja são ácido siringico, ácido ferúlico e ácido sinápico (KING & YOUNG, 1999).

As proteínas são os maiores constituintes da soja (30 a 50g/100g). Dentre as proteínas da soja, as proteínas conhecidas como β -conglícinina e glicínina representam de 65% a 80 % do total do grão de soja. A soja também contém de 7% a 9% de inibidores de protease, as proteínas STI – *soybean trypsin inhibitor* e *BBI-bowman birk inhibitor*, os quais estão localizados no cotilédone do grão (BIRK, 1985).

Os flavonoides são categorizados em flavonóis, flavonas, flavononas, isoflavonas, catequinas, antocianinas e chalconas. Devido a sua atividade estrogênica, as isoflavonas também são chamadas de fitoestrógenos e sua concentração na soja varia de 1,3 a 3,3 mg/g, dependendo da variedade, ano Cde colheita e localização geográfica da soja (CEDERROTH & NEF, 2009). O grão de soja contém 3 tipos principais de isoflavonas, as quais são encontradas em diferentes formas: (i) glicosiladas (daidzina, genistina e glicitina); (ii) acetilglicosilada (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) e malonilglicosiladas (malonildaizina, malonilgenistina e malonilglicitina); e, (iii) agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína) (figura 3). As formas glicosiladas são as formas mais abundantes presentes na soja, constituindo cerca de 50% a 90% das isoflavonas. No entanto, as formas agliconas daidzeína e genisteína, presentes em pequena quantidade na soja possuem maior atividade biológica (ELDRIDGE, 1982; IZUMI et al., 2000; PYO, LEE & LEE, 2005). As isoflavonas ingeridas na dieta estão na forma glicosilada e são hidrolisadas por

enzimas β -glicosidases presentes na microflora intestinal em isoflavonas agliconas, responsáveis pela atividade biológica (CEDERROTH & NEF, 2009). Diversos autores demonstraram a transformação das formas glicosídicas das isoflavonas para suas formas agliconas, realizada por hidrólise enzimática através da fermentação da soja por microrganismos produtores de β -glicosidases como: *Rhizopus oryzae*, *R. oligosporus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobactéria breve* e fungos do gênero *Aspergillus* (AGUIAR et al., 2003 ;GEORGETTI et al., 2009; LIGGINS et al., 1998).

Figura 3. Estrutura química das isoflavonas. Fonte: adaptado de WAQAS et al. **Acta Pol. Pharm. Drug. Res.**, 2015.

As isoflavonas exercem diversos efeitos no corpo humano, tal como influenciar no crescimento e funcionamento dos tecidos reprodutivos femininos e masculinos, na preservação do esqueleto e do sistema nervoso central e na execução de efeitos cardioprotetores, anti-inflamatórios e anti- carcinogênicos (DE ANDRADE et al., 2015; STOCCO et al., 2015; PAULO et al., 2009). Com todos estes trabalhos apontando para o efeito benéfico das isoflavonas, em dezembro de 2009 a isoflavona de soja foi um dos fitoterápicos aprovados pelo ministério da saúde para ser distribuída pelo

Sistema Único de Saúde (SUS), para reduzir os sintomas da menopausa (BRASIL, 2009).

Na pele, o fitoestrógeno genisteína demonstrou eficiência em amenizar os efeitos provocados pela deficiência de estrógeno quando administrado por via oral. Alguns autores têm observado que a ingestão de 40mg de soja por dia diminui o envelhecimento da pele em mulheres de meia idade (IZUMI et al., 2007; CIRCOSTA et al., 2007). Um estudo realizado por Accorsi-Neto e colaboradores demonstrou que o tratamento por via oral com 100mg por dia de um extrato de soja rico em isoflavonas aumenta a espessura da derme e epiderme. Além deste aumento na espessura da pele, também foi encontrado um aumento no conteúdo de colágeno e fibras elásticas após o tratamento (ACCORSI-NETO et al., 2009). Kotsopoulos e colaboradores conduziram um estudo duplo cego, placebo controlado envolvendo 94 mulheres na pós-menopausa com idade entre 50 e 75 anos. O estudo reportou um aumento na hidratação da pele facial, com uma diminuição significativa do aspecto seco da pele após três meses de tratamento oral com isoflavonas de soja (KOTSPOULOS et al, 2000).

1.6 FEs e Receptores Estrogênicos (REs)

Provavelmente a ação mais bem caracterizada dos FEs está vinculada aos receptores estrogênicos (REs), promovendo efeitos agonistas ou antagonistas, modulando os REs e conseqüentemente a atividade estrogênica (MACKEY & EDEN, 1998; MURKIES et al, 1998; KUIPER et al.; 1998).

Desta forma os FEs podem ser classificados como moduladores seletivos de receptores de estrógeno SERMs (SERMs - *selective estrogen receptor modulator*), assim como tamoxifeno e raloxifeno, sendo que o primeiro tem sido usado na clínica por pacientes com câncer de mama por agir como antagonista estrogênico no tecido mamário, reduzindo a proliferação de células cancerígenas, e como agonista no tecido ósseo e no sistema cardiovascular, prevenindo osteoporose e doenças cardíacas. O raloxifeno também atua como antagonista estrogênico no tecido mamário (STYGAR et al., 2003).

Existem dois tipos de receptores de estrógenos nos quais os FEs podem se ligar, receptores α (RE α) e β (RE β), que se diferem na distribuição tecidual e na afinidade por ligantes. Estes são receptores nucleares que podem agir como fatores

de transcrição para genes reguladores de estrógeno. Os FEs são potentes agonistas do RE β e fracos agonistas do RE α , demonstrando efeitos estrogênicos principalmente em tecidos que expressam basicamente RE β , tais como os ossos, sistema cardiovascular, pele e sistema nervoso central. Os FEs são capazes de interagir com enzimas e receptores, e devido a sua estrutura estável e a baixa massa molecular, podem atravessar as membranas celulares e modular a expressão gênica (IMHOF et al., 2006).

Notavelmente o RE β é mais amplamente distribuído na pele e em suas estruturas do que o RE α (THORNTON et al., 2003), pois é expresso em fibroblastos, queratinócitos e em macrófagos, entretanto, o RE α é expresso em fibroblastos e macrófagos, não sendo encontrado em queratinócitos (ASHCROFT & MILLS, 2002; ASHCROFT et al., 2003; IM et al., 2000).

Pesquisadores demonstraram que a segurança e eficácia proporcionada pela genisteína aglicona em ambientes com baixas concentrações de estrógeno pode ser uma consequência direta da afinidade da genisteína pelo RE β (SQUADRITO et al., 2003; ATTERITANO et al., 2007; MARINI et al., 2007). Um trabalho realizado em 2005 demonstrou que em animais tratados com genisteína, o RE β foi fortemente expresso em células da derme e epiderme, replicando o efeito do estrógeno nestas células. (OHNEMUS et al., 2005). Esta informação é de extrema importância no que se diz respeito ao papel do RE β no processo de cicatrização, e está de acordo com descobertas mais recentes as quais sugerem que o polimorfismo do RE β está relacionado com atraso no processo de cicatrização da pele (ASWORTH et al., 2008).

7. Conclusões

6. Conclusões

7.1 A biotransformação da soja com fungo *Aspergillus awamori* demonstrou ser um método eficaz para aumentar a concentração de daidzeína e genisteína;

7.2 Os extratos produzidos não apresentam potencial citotóxico nas concentrações analisadas nos fibroblastos utilizados neste trabalho (L929 (fibroblasto murino de *Mus musculus*) e HDFa (*Human Dermal Fibroblasts adult*));

7.3 As formulações cosméticas incorporadas com extrato foram estáveis e não apresentam degradação das isoflavonas em um período de 15 dias;

7.4 As isoflavonas daidzeína e genisteína foram encontradas retidas na pele com o uso de formulações gel, creme e gel-creme;

7.5 A formulação gel é a melhor opção para incorporação do extrato de soja biotransformado, pois facilita a retenção das isoflavonas e não permite a penetração dos compostos da formulação para o líquido receptor;

7.6 O extrato de soja biotransformado é capaz de estimular a produção de colágeno em fibroblastos humanos primários de maneira dose – específica;

7.7 Evidências sugerem que um dos mecanismos de ação seja interação da genisteína presente no extrato com RE β , entretanto, não podemos descartar a hipótese que outros mecanismos e outras moléculas possam estimular a produção de colágeno.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. Brazilian Association of the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Industry. **Panorama do setor HPPC**. Disponível em: <https://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-21-08.pdf>. Acesso em 14 de novembro de 2015.

ACCORSI-NETO A, HAIDAR M, SIMÕES R, SIMÕES M, SOARES-JR J, BARACAT E. Effects of isoflavones on the skin of postmenopausal women: a pilot study. **Clinics**. v.64, p.505-510, 2009.

ADDO, S.; YATES, R.A.; LAIGHT, A. A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers. **Br J Cancer**.v.87.p.1354–1359, 2002.

AFFINITO, P.; PALOMBA, S.; SORRENTINO, C.; DI CARLO, C.; BIFULCO, G.; ARIENZO, M.P. et al. Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. **Maturitas**, v.33,p. 239–247, 1999.

AGRAWAL, A.; HANNON, R.A.; CHEUNG, K.L.; EASTELL, R.; ROBERTSON, J.F. Bone turnover markers in postmenopausal breast cancer treated with fulvestrant – A pilot Study. **Breast**, v.18, p. 204–207, 2009.

AGUIAR, C.L.; SUZUKI, C.N.; PAREDES-GUZMÁN, J.F.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; SUZUKI, C.N.; PAREDES-GUZMÁN, J.F.; ALENCAR, S.M.; PARK, Y.K. Transformación de las β -glicosil isoflavonas por fermentación semi-sólida de harina de soja com *Aspergillus oryzae*. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v.4, n.2, p.115-121, 2003.

AMARAL, M.H.A.R. **Estudo do naproxeno em formas de aplicação cutânea**. 1997.159f. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade)- Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 1997.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução. no. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acesso em 10 de maio de 2013.

ASHCROFT, G.S.; ASHWORTH, J.J. Potential role of estrogens in wound healing. **Am J Clin Dermatol**, v. 4, p.737–743, 2003.

ASHCROFT, G.S.; MILLS, S.J. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. **J Clin Invest**, v.110, p.615-624, 2002.

ASHCROFT, G.S.; MILLS, S.J.; LEI, K.; GIBBONS, L.; JEONG, M.J.; TANIGUCHI, M. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. **J Clin Invest**, v.111, p.1309-1318, 2003.

ASHWORTH, J.J.; SMYTH, J.V.; PENDLETON, N.; HORAN, M.; PAYTON, A.; WORTHINGTON, J.; OLLIER, W.E.; ASHCROFT, G.S. Polymorphisms spanning the ON exon and promoter of the estrogen receptor-beta (ERbeta) gene ESR2 are associated with venous ulceration. **Clin. Genet**, v.73,p. 55–61, 2008.

ATMACA, A.; AL-BATRAN, S.E.; WIRTZ, R.M.; WERNER, D.; ZIRLIK, S.; WIEST, G.; ESCHBACH, C.; CLAAS, S.; HARTMANN, A.; FICKER, J.H. The validation of estrogen receptor 1 mRNA expression as a predictor of outcome in patients with metastatic non-small cell lung cancer. **Int J Cancer**, v. 134, p. 2314–2321, 2014.

ATTERITANO, M.; MARINI, H.; MINUTOLI, L.; POLITO, F.; BITTO, A.; ALTAVILLA, D. Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: a two year randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Endocrinol Metabol**, v.92, p.3068–3075, 2007.

BARATA, F.A.E. **A Cosmetologia: princípios básicos**. 1. ed. São Paulo: TecnoPress, 1995.

BIANCO, L.; LIMA, F.V. Estudo de formulações dermatológicas contendo despigmentantes cutâneos para tratamento de hiperpigmentações [internet]. Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL);2007.Disponível em<<http://junic.unisul.br/2007/JUNIC/pdf/0134.pdf>>.Acesso em 10/03/2014.

BIRK Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **Int J Pept Protein Res**, v.25, p.113-13.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays – The Neutral Red (NR) and Tetrazolium MTT Tests. **Toxicology in Vitro**, v.2,n.1,p.1-6, 1988.

BORNSTEIN, P. The biosynthesis of collagen. **Annu. Rev. Biochem.** v,43, p.567-603, 1974.

BORRAS, C.; GAMBINI, J.; GOMEZ-CABRERA, M.C.; SASTRE, J.; PALLARDO, F.V.; MANN, G.E.;VINA, J. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. **FASEB J**,v.20, p. 2136–2138, 2006.

BOTTAI, G.; MANCINA, R.; MURATORI, M.; DI GENNARO, P.; LOTTI, T. 17 β -estradiol protects human skin fibroblasts and keratinocytes against oxidative damage. **J. Eur. Acad. Dermatol**,v. 27, p.1236-1243, 2012.

BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Prog. Lipid Res.** v.42, p.1–36, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1 ed. Brasília, ANVISA, 2004.

- BRASIL, Portaria nº 2.982, de 26 de novembro de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.D.O.U. 01 de dezembro de 2009.
- BRASIL. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Anvisa. Brasília: Anvisa, 2008.
- BRASIL. **Guia para Avaliação da segurança de produtos cosméticos**, ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2 ed, 2012.
- BRINCAT, M. ; VERSI, E. ; MONIZ, C.F.ET AL.. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. **Obstet Gynecol**, v.70, p.123–127, 1987.
- BRINCAT, M.; MONIZ, C.J.;STUDD, J.W.; DARBY, A.; MAGOS, A.; EMBUREY, G.; VERSI, E.Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. **Br J Obstet Gynaecol**, v.92, p.256–259, 1985.
- BRINCAT, M.P. Hormone replacement therapy and the skin. **Maturitas**,v.35, p.107–117, 2000.
- BRINCAT, M.P.; BARON, Y.M.; GALEA, R. Estrogens and the skin. **Climacteric**, v. 8, p.110-123, 2005.
- BROHEM, C.A.;CARDEAL, L.B.S.; TIAGO,M.; SOENGAS,M.S.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, p.35–50, 2010.
- CASSIDY, A., TERESA, D. S., RIMBACH, G. Molecular mechanisms by which dietary isoflavones potentially prevent atherosclerosis. **Expert Rev Mol Med**. v.24, p.1-15, 2003.
- CEDERROTH,C.R.; NEF,S. Soy, phytoestrogens and metabolismo: A review. **Mol Cel Endocrinol**, v.304,p.30-42, 2009.
- CHADHA, G., SATHIGARI, S., PARSONS, D.L., JAYACHANDRA BABU, R.,. In vitro percutaneous absorption of genistein from topical gels through human skin. **Drug Dev Indl Pharm**, v.37, p. 498–505, 2011.
- CHANG, T.S.; DING, H.Y.; TAI, S. S.K.; WU, C.Y. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein by fungi used in the preparation of various fermented soybeans foods. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 71, p.1330-1333, 2007.
- CHEN, K.I.; LO, Y.C.; SU, N.W.; CHOU, C.C.; CHENG, K.C. Enrichment of Two Isoflavone Aglycones in Black Soymilk by Immobilized β -Glucosidase on Solid Carriers. **J Agric Food Chem**. v.60, p.12540–12546, 2012.
- CHUNG, I.M.; SEO, S.H.; AHN, J.K.; KIM, S.H. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. **Food Chem**. v.127, p.960-967,2011.

CIRCOSTA, C.; DE PASQUALE, R.; PALUMBO, D.R.; SAMPIERI, S.; OCCHIUTO, F. Effect of isoflavones from red clover (*Trifolium pretense*) on skin changes induced by ovariectomy in rats. **Phytoth Res**, v.20, p.1096-1099, 2006

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia: aspectos teóricos e práticos**. Associação Farmacêutica de Araraquara, p.14-15, 2010.

DAL BELO, S.E.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.; MARTY, J.P. Skin Penetration of Epigallocatechin-3-Gallate and Quercetin from Green Tea and Ginkgo biloba Extracts Vehiculated in Cosmetic Formulations. **Skin Pharmacol Physiol** v. 22, p.299–304, 2009.

DE ANDRADE, C.M.; BIANCHINI, F.J.; REY, F.M.; FONSECA, M.J.; TOLOI, M.R. Effects of an aglycone-rich biotransformed soybean extract in human endothelial cells. **Climacteric**, v.18, p.651-655, 2015.

DI MAMBRO, V.M.; FONSECA, M.J.V. Assay of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **J Pharm Biomed Anal**, Oxford, v. 37, p. 287-295, 2005.

DI VIRGILIO, A. L.; IWAMI, K.; WATJEN, W.; KAHL, R.; DEGEN, G. H. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. **Toxicol Lett**, v.151, p. 151-162, 2004.

DOEVENDANS, P. A.; SMITS, J. F. M.; DAEMEN, M. J. A. P.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on annexin V. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 549-559, 2000.

DRAELOS, Z.D. Topical and oral estrogens revisited for antiaging purposes. **Fertil Steril**, v. 84, p.291–292, 2005.

DURACHER, L. ; BLASCO, L. ; HUBAUD, J.C. ; VIAN, L. ; MARTI-MESTRES, G. The influence of alcohol, propylene glycol and 1,2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised pig skin. **Int J Pharm**. v. 374, p.39-45, 2009.

ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates. **J Am Chem Soc**, v.183, p.90,1982.

EMBRAPA, Soja em números (Safrá 2014/2015). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em 14 de novembro de 2015.

EMMERSON, E.; CAMPBELL, L.; ASHCROFT, G.S.; HARDMAN, M.J. The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. **Mol Cell Endocrinol**. v.321,p.184–193, 2010.

FERREIRA, A.O. **Guia prático da farmácia magistral**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2002.

FORTES, V.S. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e citotóxica do extrato de soja (*Glycine max*) biotransformada pelo *Aspergillus awamori***. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GEORGETTI, S.R.; VICENTINI, F.T.M.C.; YOKOYAMA, C.Y.; BORIN, M.F.; SPADARO, A.C.C.; FONSECA, M.J.V. Enhanced in vitro and in vivo antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different beta-glucosidase-producing fungi. **J Appl Microbiol**, v.106 ,p. 459-466, 2009.

GLAZIER, M.; GINA, M. B.; BOWMAN, M.. A review of the evidence for use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Ar Int Med**, v. 161, p. 1161-1172, 2001

HELPERICH, W. G.; ANDRADE, J. E.; HOAGLAND, M.S. Phytoestrogens and Breast cancer: a complex story. **Inflammopharmacol**, v.16, p.219-226, 2008.

HENNEMAN, D.H. Effect of estrogen on in vivo and in vitro collagen biosynthesis and maturation in old and young female guinea pigs. **Endocrinol**, v. 8, 3,p. 678–690, 1968.

HUANG, Z.R.; HUNG, C.F.; LIN, Y.K.; FANG, J.Y. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. **Int J Pharm**, v.364, p.36–44, 2008.

HURLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v.280, p.605-613, 1998.

IM, S.; LEE, E.S.; KIM, W.; SONG, J.; KIM, J.; LEE, M. Expression of progesterone receptor in human keratinocytes. **J Korean Med Sci**, v.15, p.647-654, 2000.

IMHOF, M.; GOCAN, F.; REITHMAYR, F.; LIPOVAC, M.; SCHIMITZEK, C.; CHEDRAUI, P.; HUBER, J. Effects of a red clover (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women. **Maturitas**, v.38, p. 41-48, 2006.
INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**, 124p. 2014. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em 24 de novembro de 2015.

ISAAC, V. L.B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G., SALGADO, H.R.N. CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de

fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p.81-86, 2008.

IZUMI, T.; PISKULA, M.K.; OSAWA,S.; OBATA, A.; TOKE,K.; SAITO, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **J Nutr** ,v.130, p.1695-1699,2000.

IZUMI, T.; SAITO, M.; OBATA, A.; MASAYUKI, A.R.; YAMAGUCHI, H.; MATSUYAMA, A. Oral intake of soy isoflavone aglycone improves the aged skin of adult women. **J Nut Sci Vitaminol**, v.53, p.57-62, 2007.

KASE, N. G.. Impact of hormone therapy for women aged 35 to 65 years, from contraception to hormone replacement. **Gender Medicine**, v. 6, p. 37-59, 2009.

KASS-ANNESE, B. Alternatives therapies for menopause. **Clinic Obstet Gynecol.**, v. 43, p. 162-183, 2000.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**, v.99, p.213-218.

KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. **J Agric Food Chem**. v.51, p.7632–7635, 2003.

KOTSOPOULOS,D.; DALAIS ,F.S.; LIANG, Y.L.; MCGRATH, B.P.; TEEDE, H.J. The effects of soy protein containing phytoestrogens on menopausal symptoms in postmenopausal women. **Climacteric**,v.3, p.161-167, 2000.

KOVACS, E. J. Aging, traumatic injury, and estrogen treatment. **Exp Gerontol**, v.4, p.549–555, 2005.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. **Endocrinology**, v.139, p.4252-4263, 1998.

LEVENSON, A.S.; GEHM, B.D.; PEARCE, S.T.; HORIGUCHI,J.; SIMONS,L.A.; WARD, J.E.; JAMESON, J.L.; JORDA,V.C. Resveratrol acts as an estrogen receptor (er) agonist in cancer cells stably transfected with ER. **Int. J. Cancer**, v. 104, p.587–596, 2003.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. **Anal Biochem**,v.264, p. 1-7,1998.

LUO, N.; GUAN, Q.; ZHENG, L.; QU, X.; DAI, H.; CHENG, Z. Estrogen-mediated activation of fibroblasts and its effects on the fibroid cell proliferation. **Transl Res**, v. 163, p. 232–241, 2014.

LUO, Z.; MURRAY, B.S.; ROSS, A.L.; POVEY, M.J.W.; MORGAN, M.R.A.; DAY, A.J. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. **Colloids Surf. B. Biointerfaces** v.92, p.84–90, 2012.

MACKEY, R.; EDEN, J. Phytoestrogens and the menopause. **Climacteric**, v. 4, p. 302-308, 1998.

MAGALHÃES, W.C.P. Ingredientes naturais. **Cosmetics & Toiletries**, v.27, p.26, 2015.

MAHN, K.; BORRAS, C.; KNOCK, G.A.; TAYLOR, P.; KHAN, I.Y.; SUGDEN, D.; POSTON, L.; WARD, J.P.; SHARPE, R.M.; VINA, J.; AARONSON, P.I.; MANN, G.E. Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. **FASEB J**, v.19, p.1755–1757, 2005.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.U.L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo, v. 79, p. 8-11, 1992.

MARINI, H.; MINUTOLI, L.; POLITO, F.; BITTO, A.; ALTAVILLA, D.; ATTERITANO, M. Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. **Annals Int Med**, v.146, p.839–847, 2007

MARINI, H.; POLITO, F.; ALTAVILLA, D.; IRRERA, N.; MINUTOLI, L.; CALÒ, M.; ADAMO, E.B.; VACCARO, M.; F.; BITTO, A. Genistein aglycone improves skin repair in an incisional model of wound healing: a comparison with raloxifene and oestradiol in ovariectomized rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 1185–1194, 2010.

MINGHETTI, P.; CILURZO, F.; CASIRAGHI, A.; MONTANARI, L. Evaluation of ex vivo human skin permeation of genistein and daidzein. **Drug Deliv**, v.13, p.411-415, 2006.

MIURA, T.; YUAN, L.; SUN, B.; FUGI, H.; YOSHIDA, M.; WAKAME, K.; KOSUMA, K. Isoflavone aglycon produced by culture of soybean extracts with Basidiomycetes and its ant-angiogenic activity. **Biosc Biotechnol Biochem**, v. 66, p. 2626–2631, 2002.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; MORAES, A.B.; HAIDAR, M.A.; SOARES, J.M.J.; SIMOES, M.J.; BARACAT, E.C.; PATRIARCA, M.T. The effects of topical isoflavones on postmenopausal skin: double-blind and randomized clinical trial of efficacy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol**, v.46, p.188-192, 2009.

MORISCOT, A.S.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSHON, P.A. **Histologia para fisioterapia e outras áreas da reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1 ed, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.16, p. 55-56, 1983.

MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S, R. Phytoestrogens. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 83, p. 297-303, 1998.

NELSON, H.D.. Menopause. **Lancet**. v. 371, p. 760-770, 2008.

NIH CONFERENCE. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Management of Menopause-Related Symptoms. **Annals of Int. Med.** v. 142, p. 1003-1013, 2005.

ODELL, I.D.; COOK, D. Immunofluorescence Techniques Journal of Investigative. **Dermatol**, v.133, 2013.

OHNEMUS, U.; UENALAN,M.; CONRAD, F.;HANDJISKI, B.; MECKLEMBURG,L.; NAKAMURA,M.; INZUNZA, J.; GUSTAFSSON,J.A.; PAUS,R. Hair cycle control by estrogens: Catagen induction via estrogen receptor (ER) checked by ER β signalling, **Endocrinology**,v.146, p.1214–1225, 2005.

PATRIARCA, M.T.; GOLDMAN K.Z.; DOS SANTOS, J.M. ET AL. Effects of topical estradiol on the facial skin collagen of postmenopausal women under oral hormone therapy: a pilot study. **Eur J Obst Gynecol Reprod Biol**, v.130, p.202–205, 2007.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J. DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1451-1461, 2003.

PHARMASPECIAL. Informativo técnico: Hostacerin SAF®. Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/Lit_HOSTACERIN_SAF.pdf>. Acesso em 26 outubro 2013.

PHILLIPS, T.J.; DEMIRCAY, Z.; SAHU, M. Hormonal effects on skin aging. **Clinics**, v. 17, p.661–672, 2001.

PIERARD-FRANCHIMONT, C. ; LETAWE, C. ; GOFFI, N. V. ET AL. Skin water-holding capacity and transdermal estrogen therapy for menopause: a pilot study. **Maturitas**, v. 22, p.151–154, 1995.

PROST-SQUARCIONI, C. Histology of skin and hair follicle. **Medicine & Science**. v.22, p.131-137, 2006.

PYO,Y.H.; LEE, T.C.;LEE,Y.C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase producing latic acid bactéria. **Food Res Intern**,v.38, p.551-559,2005.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, v. 26, p. 123-148, 1996.

RINGA, V. Menopause and treatments. **Quality of Life Research**, v. 9, p. 695-707, 2000.

ROBERTS, M.S., WALKER, M. Water: the most natural penetration enhancer. In **Pharmaceutical skin penetration enhancement**. ed Marcel Dekker, New York, p 1-30, 1993.

ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.J.; LA CROIX, A.Z.; KOOPERBERG, C.; STE-FANICK, M.L.; JACKSON, R.D.; BERESFORD, S.A.; HOWARD, B.V.; JOHNSON, K.C.; KOTCHEN, J.M.; OCKENE, J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy post-menopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial, **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. v.288, p. 321–333, 2002.

SANTORO, N. The menopausal transition. **Am J Med**, v. 118, p. 1188-1213, 2005.

SASANO, H.; SUZUKI, T.; MIKI, Y.; MORIYA, T. Intracrinology of estrogen and androgens in breast carcinoma. **J Ster Biochem Mol Biol**, v.108, p. 181–185, 2008.

SATOR, P.G.; SCHMIDT, J.B.; SATOR, M.O.; HUBER, J.C.; HÖNIGSMANN, H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: a pilot study. **Maturitas**, v.39, p.43–55, 2001.

SATRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with Tcannexin-V. **J Nuc Med**, v. 44, p.92-97, 2003.

SAUERBRONN, A.V.; FONSECA, A.M.; BAGNOLI, V.R.; SALDIVA, P.H.; PINOTTI, J.A. The effects of systemic hormonal replacement therapy on the skin of postmenopausal women. **Int J Gynaecol Obstet**, v.68, p.35-41, 2000.

SCHMIDT, J.B.; BINDER, M.; DEMSCHIK, G.; BIEGLMAYER, C.; REINER, A. Treatment of skin aging with topical estrogens. **Int J Dermatol**, v.35, p.669-674, 1996.

SHU, Y.Y.; MAIBACH, H.I. Estrogen and skin: therapeutic options. **Am J Clin Dermatol**, v.12, p. 297-311, 2011.

SMITH, Q.T.; ALLISON, D.J. Studies on the uterus, skin and femur of rats treated with 17-beta-oestradiol benzoate for one to twenty-one days. **Acta Endocrinol**, v.53, p.608–610, 1996.

SOLDANO, S.; MONTAGNA, P.; BRIZZOLARA, R.; SULLI, A.; PARODI, A.; SERIOLO, B.; PAOLINO, S.; VILLAGGIO, B.; CUTOLO, M. Effects of estrogens on extracellular matrix synthesis in cultures of human normal and scleroderma skin fibroblasts. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1193, p.25–29, 2010.

SON, E.D.; LEE, J.Y.; LEE, S.; KIM, M.S.; LEE, B.G.; CHANG, I.S. Topical application of 17 beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgf-Beta signaling in aged human skin in vivo. **J Invest Dermatol**, v.124, p.1149-1161, 2005.

SOUZA, VM. **Ativos dermatológicos**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SPEROFF, L. A transição da peri-menopausa. **Reprodução & Climatério**, Ribeirão Preto, v. 14, p. 59-61, 1999.

SPEROFF, L.; FRITZ, M.A. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. **Lippincott Williams & Wilkins**, v.7, p.17-23, 2005.

SPRITZER, P. M.; REIS, F. M. Reposição hormonal no climatério: princípios terapêuticos embasados em evidências. **Reprodução & Climatério**, v. 13, p. 32-41, 1998.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; CRISAFULLI, A.; SAITTA, A.; CUCINOTTA, D.; MORABITO, N. . Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. **Am J Med**, v. 114, p. 470–476, 2003.

STE

STOCCO, B.; TOLEDO, K.; SALVADOR, M.; PAULO, M.; KOYAMA, N.; TOLOI, M.R.T. Dose-dependent effect of Resveratrol on bladder cancer cells: Chemoprevention and oxidative stress. **Maturitas**, v.72, p.72– 78, 2012.

STOCCO, B.; TOLEDO, K.A.; FUMAGALLI, H.F.; BIANCHINI, F.J.; FORTES, V.S.; FONSECA, M.J.V.; TOLOI, M.R.T. Biotransformed Soybean Extract Induces Cell Death of Estrogen-Dependent Breast Cancer Cells by Modulation of Apoptotic Proteins. **Nutr Cancer**, v.67, p. 612-619, 2015.

STYGAR, D.; MURAVITSKAYA, N. ; ERIKSSON, B.. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. **Reprod Biol Endocrinol**, v.1, p.40, 2003.

SUMINO H, ICHIKAWA S, ABE M, ENDO Y, ISHIKAWA O, KURABAYASHI M. Effects of aging, menopause, and hormone replacement therapy on forearm skin elasticity in women. **J Am Geriatr Soc**, v.52, p. 945-949, 2004.

TANG, S.; Jing, HU.; MENG, Q.; DONG, X.; WANG, K.; Yuebin, Q.I.; Chao, C.H.U.; ZHANG, X.; HOU, L. Daidzein Induced Apoptosis via Down-Regulation of Bcl-2/Bax and Triggering of the Mitochondrial Pathway in BGC-823 Cells. **Cell Biochem Biophys**, v.65, p.197–202, 2013.

THORNTON, M.J. The biological actions of estrogens on skin. **Exp. Dermatol**, v11, p.487–502, 2002.

THORNTON, M.J. Oestrogen functions in skin and skin appendages. **Expert Opinion Ther.Targ**, v .9, p.617–629, 2005.

THORNTON, M.J.; TAYLOR, A.H.; MULLIGAN, K.; AL-AZZAWI, F.; LYON, C.C.; O'DRISCOLL, J.; MESSENGER, A.G. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Exp Dermatol**, v.12, p.181–190, 2003.

THRING, T.; HILI, P.; NAUGHTON, D. Anticollagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complement. Altern. Med.** v.9, p.25-27, 2003.

TSUKAHARA, K.; MORIWAKI, S.; OHUCHI A, ET AL. Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. **Photochem Photobiol**, v.73, p.525–31, 2001.

TSUKAHARA,K.; NAKAGAWA, H.; MORIWAKI, S. ET al.. Ovariectomy is sufficient to accelerate spontaneous skin ageing and to stimulate ultravioletirradiation-induced photoageing of murine skin. **Brit J Dermatol**, v.151,p.984–994, 2004.

ULLAH, M.F.; AHMAD, A.; ZUBAIR, H.; KHAN, H.Y.; WANG, Z.; SARKAR, F.H.; HADI, S.M. 2011. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. **Mol Nutr Food Res**. v.55, p. 553-559, 2011.

VAN HEERDE, W. L. ROBERT-OFFERMAN, S.; DUMONT, E.; HOFSTRA. L.; VAN TONDER, J.J., 2011. **Development of an in vitro mechanistic toxicity screening model using cultured hepatocytes**. Doctoral Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.

VARANI, J. ; DAME, M.K. ; RITTIE´ L, ET AL. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. **Am J Pathol**, v.168, p.1861-1868, 2006.

VERDIER-SÉVRAIN, S. ; BONTÉ, F. ; GILCHREST, B. Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. **Exp Dermatol**, v. 15, p. 83–94, 2006.

VEST, J.; PIEZ, K.A. A Kinetic Study of Collagen Biosynthesis.**J Biol Chem**, v.247,p.856-862, 1972.

WAQAS, M.K.; AKHTAR, N.; MUSTAFA, R.; JAMSHAD,M.; KHAN, H.M.S.; MURTAZA, G. Dermatological and cosmeceutical benefits of glycine max (soybean) and its active components. **Acta Pol Pharm Drug Res**, v.72, p.3-11, 2015.

WEINSTOCK, M.A. Epidemiologic investigation of nonmelanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. **J Invest Dermatol**, v.102, p. 6-9, 1999.

WHITTEN, P. L.; KUDO, S.; OKUBO, K. K. Isoflavonoids. Handbook of Plant and Fungal Toxicants, ed. JPF, Boca Raton, p. 117-137, 1997.

WIECHERS, J.W., WATKINSON, A.C., CROSS, S.E, ROBERTS, M.S. Predicting skin penetration of actives from complex cosmetic formulations: an evaluation of inter formulation and inter active effects during formulation optimization for transdermal delivery. **Int J Cosmet Sci**. v.34, p.525-535, 2012.

WOLFF, E.F.; NARAYAN, D.; TAYLOR, H.S. Long-term effects of hormone therapy on skin rigidity and wrinkles. **Fertil Steril**, v.84, p.285-288, 2005.

WULF, H.C.; SANDBY-MOLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**. v.35, p.185-191, 2004.

XIAO, J.X.; HUANG, G.Q.; GENG,X.; QIU,H.W. Soy-derived Isoflavones Inhibit HeLa Cell Growth by Inducing Apoptosis. **Plant Foods Hum. Nutr.** v.66,p.122–128, 2011.

YANASE, T.; SUZUKI, S.; GOTO, K.; NOMURA, M.; OKABE, T.;TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Aromatase in bone: roles of Vitamin D3 and androgens. **J Ster Biochem Mol Biol.** v. 86, p. 393–397, 2003.

ZENG, G.; ZHONG, F.; LI, J.; LUO, S. ; ZHANG, P. Resveratrol-Mediated Reduction of Collagen by Inhibiting Proliferation and Producing Apoptosis in Human Hypertrophic Scar Fibroblasts. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 77, p. 2389-2396 2013.

ZILLICH, O.V.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; HASENKOPF, K.; EISNER, P.; KERSCHER,M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. **Int J Cosmet Sci**, v.35, p.491–501, 2013.