UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extratos de soja biotransformados por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno

Bianca de Arruda Leite

Ribeirão Preto
2021

BIANCA DE ARRUDA LEITE

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DE EXTRATOS DE SOJA BIOTRANSFORMADOS POR FUNGO *ASPERGILLUS AWAMORI* NA PRODUÇÃO DE COLÁGENO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientada: Bianca de Arruda Leite

Orientadora: Profª. Drª. Maria Regina Torqueti

Co-orientadora: Profª. Drª. Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 16/09/20201. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2021

LEITE, B.A.	**Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extratos de soja biotransformados por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno**		MESTRADO FCFRP - USP 2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Leite, Bianca de Arruda

Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extratos de soja biotransformados por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno. Ribeirão Preto, 2021. 118 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Profª drª Torqueti, Maria Regina.

1.Isoflavonas. 2.*Glycine max*. 3.Menopausa. 4.Fermentação sólida. 5. Microrganismo. 6. Pele.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bianca de Arruda Leite

Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extratos de soja biotransformados por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Regina Torqueti
Co-orientadora: Profª. Drª. Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, por todo amor recebido e por sempre creditar em mim.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profª. Drª. Maria Regina Torqueti e à minha co-orientadora Profª. Drª. Maria José Vieira Fonseca, pela oportunidade e por toda compreensão e conhecimento partilhado.

À Universidade de São Paulo, e aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do Mestrado.

Aos técnicos de laboratório Lilian, Jabor, Lu, Luizão e Nathália, que me orientaram e iluminaram o meu caminho. À Paty e Bia, amigas de trabalho do Laboratório de Citologia Clínica, pelos bons momentos e conhecimento compartilhados.

Aos amigos de pesquisa Vitor, Felipe, Gabriel e Nathália, que iniciaram comigo essa vivência acadêmica e que ofereceram suporte e amizade ao longo do processo, em especial ao João que me deu suporte para concluir esse projeto.

À minha professora Eliana Barchi que despertou em mim o sentimento de amor pela ciência.

Aos meus amigos de vida Aline, Anna, Berguinha, Mirella, Maju, Joana e Gui, que sempre estiveram do meu lado e estavam sempre torcendo pela minha felicidade e pelo meu sucesso.

Em especial aos meus pais e irmão, Elaine, Valdinei e Gabriel, que sem vocês nada disso seria possível.

E a todos os meus amigos e familiares não mencionados que também sempre estiveram presentes durante a minha vida, meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"O bater das asas de uma borboleta num extremo do globo terrestre, pode provocar uma tormenta no outro extremo no espaço de tempo de semanas."

Teoria do Caos - Edward Lorenz

RESUMO

LEITE, B. A. **Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extratos de soja biotransformados por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno.** 2021. 118f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Atualmente, tratamentos que atenuem os efeitos do hipoestrogenismo em mulheres na menopausa vêm ganhando visibilidade devido à diminuição do hormônio estrogênio que influência na queda da concentração de colágeno, gerando problemas de regeneração tecidual, de desidratação, de cicatrização e de deficiência do equilíbrio imunológico. Uma terapia de reposição hormonal alternativa à tradicional que apresente menores índices de efeitos colaterais é fundamental. O presente projeto propõe o estudo da utilização de fitoestrogênios (hormônios vegetais encontrados em soja) que possuem ação similar em relação ao hormônio humano b-estradiol, para promoção de novas formulações que amenizem problemas ligados à menopausa. A otimização de potenciais medicinais naturais utilizando extrato de soja biotransformado para o barateamento dos custos de produção e para o aprimoramento da eficácia terapêutica na saúde humana pode ser considerada como uma alternativa promissora aos tratamentos de reposição hormonal tradicional. Foram avaliados extratos de soja transgênica biotransformados (ESBT) pelo fungo Aspergillus awamori, e não biotransformados (ESNBT) para o processo de produção de colágeno. Foi realizado o processamento dos grãos de soja e em seguida realizada a sua biotransformação. A quantificação de Daidzeína e Genisteína presentes nos extratos foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada pelos testes de vermelho neutro (VN) e citometria de fluxo pela marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Posteriormente foi analisada a concentração de colágeno em cultura celular de fibroblastos humanos (HDF-a) por meio da técnica de Imunofluorescência e do ensaio de Western Blotting. Também foi realizada a confecção de lâminas hitológicas de pele humana tratadas com ESBT, para tanto, também foi produzido um veículo (creme) para a sua incorporação e aplicação no tecido. Como resultado, os extratos de soja não apresentaram citotoxidade nas concentrações testadas. Foi possível obter resultados significativos de aumento na concentração de colágeno em cultura de células tratadas com ESBT. As análises de quantificação de colágeno estendidas para o cultivo de pele humana também revelaram aumento considerável no tecido biológico tratado com ESBT em relação ao controle negativo. O presente estudo indica resultados promissores para soja transgênica biotransformada por *Aspergillus awamori*, demonstrando um aumento favorável na concentração de colágeno *in vivo* e *ex vivo*, tendo um grande potencial cosmecêutico. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) com nível de significância adotado de 5%.

Palavras-chave: Isoflavonas, *Glycine max.*, Menopausa, Fermentação em estado sólido, Microrganismos, Pele.

ABSTRACT

LEITE, B. A. **Evaluation and comparison of the estrogenic activity of soybean extracts biotransformed by the *Aspergillus awamori* fungus in collagen production.** 2021. 118p. Dissertation (Master's). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Currently, treatments that attenuate the effects of hypoestrogenism in menopausal are gaining visibility due to the decrease in the estrogen hormone, which influences the drop-in collagen concentration, causing tissue regeneration, dehydration, scarring and impaired immune balance. An alternative to the traditional hormonal alteration therapy that presents lower rates of side effects is essential. This project proposes the study of the use of phytoestrogens (plant hormones found in soybeans) that have a similar action in relation to the human hormone b-estradiol, to promote new formulations that alleviate menopause-related problems. The optimization of natural medicinal potentials using biotransformed soy extract to lower production costs and improve therapeutic efficacy in human health can be considered a promising alternative to traditional hormonal consolidation treatments. Biotransformed (ESBT) and non-biotransformed (ESNBT) transgenic soybean extracts by the fungus *Aspergillus awamori* were adopted for the collagen production process. Soybean grains were processed and then biotransformed. The quantification of Daidzein and Genistein shows the extracts were evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The cytotoxic activity of the extracts was evaluated by neutral red (VN) testes and flow cytometry by labeling with annexin V and propidium iodide. Subsequently, the concentration of collagen in human fibroblast cell culture (HDF-a) was analyzed using the immunofluorescence technique and Western Blotting assay. It was also made a confection of histological slides of human skin treated with ESBT, for that, a vehicle (cream) was also produced for incorporation and application in the tissue. As a result, soy extracts did not dissipate cytotoxicity in those tested. It was possible to obtain a result obtained from an increase in the concentration of collagen in cell cultures treated with ESBT. Collagen quantification analyzes extended to human skin culture also revealed a marked increase in biological tissue treated with ESBT compared to the negative control. The present study indicates promising results for transgenic soybean biotransformed by *Aspergillus awamori*, demonstrating a favorable increase in collagen concentration in vivo and ex vivo, having a great cosmeceutical potential. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) with a significance level of 5%.

Keywords: Isoflavones, *Glycine max*., Menopause, State Solid Fermentation, Microorganisms, Skin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele de uma seção longitudinal de uma superfície do dedão do pé 2
Figura 2. Fibroblastos (HDF-a) 3
Figura 3. Estrutura molecular do colágeno 5
Figura 4. Biossíntese e processamento de colágeno 6
Figura 5. Estrogênios endógenos 9
Figura 6. Estrutura de isoflavonas 12
Figura 7. Variações de isoflavonas 13
Figura 8. Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17-b- Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17-b-estradiol e a isoflavona Genisteína 14
Figura 10. Foto fungo *Aspergillus awamori* 19
Figura 11. *Glycine max* (soja) 21
Figura 11. Produção isoflavonas 23
Figura 12. Medida da quantidade de proteínas toais em função do tempo de incubação 40
Figura 13. Medida da atividade de peptidases em função do tempo de incubação 41
Figura 14. Medida da atividade de b-glicosidases em função do tempo de incubação 43
Figura 15. Medida da atividade de lipases em função do tempo de incubação 44
Figura 16. Perfil dos extratos de soja após inoculação 45
Figura 17. Perfil dos extratos de soja 47
Figura 18. Padrão de isoflavonas Genisteína e Daidzeína 48
Figura 20. Curva padrão isoflavona Genisteína 49
Figura 9. Curva padrão isoflavona Daidzeína 49
Figura 10. Cromatograma de ESBT 50
Figura 11. Cromatograma de ESNBT 5mg/mL 51
Figura 12. Cromatograma do extrato de soja comercial com 0,3gµ/mL 51
Figura 13. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro 56
Figura 26. Gráficos obtidos com o ensaio da exposição da Fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo 58
Figura 27. Expressão do colágeno tipo I em células HDF-a 61
Figura 28. Quantificação do colágeno tipo I em células HDF-a 62
Figura 29. Cultura de células HDF-a na microscopia de fluorescência 65
Figura 30. Modulação de proteínas de colágeno I em cultura de células HDF-a na microscopia de fluorescência 67

Figura 31. Obtenção do veículo (Creme) para incorporação dos extratos 68
Figura 32. Processamento dos fragmentos de pele Humana 70
Figura 33. Fragmentos de pele humana..... 71
Figura 34. Efeito quelante do íon ferro (FRAP) em extratos de pele humana 72
Figura 35. Quantificação de proteínas totais em extratos de pele humana..... 74
Figura 36. Identificação de colágeno 1 em extratos de pele humana 76
Figura 37. Quantificação de colágeno 1 em pele humana..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos avaliando o efeito da isoflavona tópica na pele em mulheres na pós-menopausa. 15
Tabela 2. Composição da formulação cosmética 35
Tabela 3. Esquematização dos fragmentos de pele nas condições de estudo 37
Tabela 4. Valores de pH nos filtrados enzimáticos. 46
Tabela 5. Concentração de Daidzeína e genisteína nos extratos de soja 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APROSOJA	Associação Brasileira de Produtores de Soja
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
E1	Estrona
E2	17b-estradiol
E3	Estriol
E4	Estretrol
EPSPS	Enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase
ER	Receptores de Estrógeno
ERa	Receptores de Estrógeno alfa
ERb	Receptores de Estrógeno beta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFS	Isoflavona sintase
LDL	Colesterol lipoproteína de baixa densidade
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases
OMS	Organização Mundial da Saúde
PHTPP	2-Phenyl-3-(4-hydroxyphenyl)-5,7-bis(trifluoromethyl)-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine, 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]-pyrimidin-3-yl]phenol
QTLs	Locus de características quantitativas
SERMs	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno
SUS	Sistema Único de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

a_w	água livre
%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor que
±	mais ou menos
µg	micrograma
µL	microlitro
g	gramas
G	força G
H_2O	Água
KCl	cloreto de potássio
L	litros
min	minuto
mL	mililitro
ng	nanograma
pH	potencial hidrogeniônico
V	volts

SUMÁRIO

RESUMO I
ABSTRACT II
LISTA DE FIGURAS III
LISTA DE TABELAS V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS VI
LISTA DE SÍMBOLOS VI
1. INTRODUÇÃO 1
1.1 PELE 1
Figura 1. Camadas da pele de uma seção longitudinal de uma superfície do dedão do pé 2
1.2 FIBROBLASTOS 2
Figura 2. Fibroblastos (HDF-a) 3
1.3 COLÁGENO 4
Figura 3. Estrutura molecular do colágeno 5
Figura 4. Biossíntese e processamento de colágeno 6
1.4 MENOPAUSA E AÇÃO NA PELE 6
1.5 ESTRÓGENO E A SUA ATUAÇÃO 8
Figura 5. Estrogênios endógenos 9
1.6 TRH E AÇÃO DA PELE 11
1.7 FITOESTRÓGENOS 12
Figura 6. Estrutura de isoflavonas 12
Figura 7. Variações de isoflavonas 13
Figura 8. Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17-b- Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17-b-estradiol e a isoflavona Genisteína 14
1.8 FITOESTRÓGENOS E RECEPTORES ESTROGÊNICOS (RES) 15
FIGURA 9. RELAÇÃO DO 17-B-ESTRADIOL E DA GENISTEÍNA COM OS RES 17
1.9 BIODISPONIBILIDADE DAS ISOFLAVONAS 18
1.10 O FUNGO *ASPERGILLUS* E B-GLICOSIDASE FÚNGICA 19
Figura 10. Foto fungo *Aspergillus awamori* 19

1.11 SOJA TRANSGÊNICA 21
Figura 11. *Glycine max* (soja) 21
Figura 11. Produção isoflavonas 23
2. OBJETIVOS 25
2.1 OBJETIVO GERAL 25
3. MATERIAL E MÉTODOS 26
3.1 SUPORTE E BASE DE PADRONIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DO PROJETO 26
3.2. PRODUÇÃO DOS EXTRATOS DE SOJA 26
3.2.1. OBTENÇÃO DA FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA 26
3.2.2 ATIVAÇÃO DO *ASPERGILLUS AWAMORI* E OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS 27
3.2.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DA FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA POR ESPOROS DE *ASPERGILLUS AWAMORI* EM CULTURA SEMI-SÓLIDA 27
3.2.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE B-GLICOSIDASES, LIPASES E PROTEASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *ASPERGILLUS AWAMORI* 28
3.2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DA FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA POR ENZIMAS DE *ASPERGILLUS AWAMORI* EM CULTURA SEMI-SÓLIDA 29
3.2.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE SOJA SEM BIOTRANSFORMAÇÃO COMO CONTROLE NEGATIVO 29
3.2.7 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE SOJA COMERCIAL 30
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 30
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE SOJA EM CULTURA CELULAR DE FIBROBLASTOS 30
3.4.1 LINHAGEM CELULAR E CULTIVO 30
3.4.2 TRATAMENTOS 31
3.4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELA TÉCNICA DE VERMELHO NEUTRO EM CULTURA DE CÉLULAS 31
3.4.4 ANÁLISE DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E DA PERMEABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO 32
3.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM CULTURA CELULAR DE FIBROBLASTOS HUMANOS PRIMÁRIOS 33

3.5.1 TRATAMENTO CELULAR (HDF-A) 33
3.5.2 ANÁLISE DO COLÁGENO E RECEPTORES DE ESTRÓGENO PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA 33
3.5.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING 34
3.5.4 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO COSMÉTICA CONTENDO EXTRATOS DE SOJA 35
3.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM ENSAIO *EX VIVO* 36
3.6.1 OBTENÇÃO, ESTABELECIMENTO, MANUTENÇÃO E CULTIVO DE EXPLANTES DE PELE ORGANOTÍPICAS 36
3.6.2 TRATAMENTO DAS PELES 36
3.6.3 HOMOGENEIZAÇÃO DO MATERIAL E OBTENÇÃO DAS ALÍQUOTAS. 37
3.6.4 EFEITO QUELANTE DO ÍON FERRO (FRAP) EM PELE 37
3.6.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS 38
3.6.6 DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO POR COLORAÇÃO DE LÂMINAS EM PICROSSÍRIUS - HEMATOXILINA EM PELE 38
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO *ASPERGILLUS AWAMORI* 39
4.1.1 PROTEÍNAS TOTAIS 39
Figura 12. Medida da quantidade de proteínas toais em função do tempo de incubação 40
4.1.2 ATIVIDADE PEPTIDASES 41
Figura 13. Medida da atividade de peptidases em função do tempo de incubação 41
4.1.3 ATIVIDADE B- GLICOSIDASE 42
Figura 14. Medida da atividade de b-glicosidases em função do tempo de incubação 43
4.1.4 ATIVIDADE LIPASE 43
Figura 15. Medida da atividade de lipases em função do tempo de incubação 44
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE SOJA 45
Figura 16. Perfil dos extratos de soja após inoculação 45
Figura 17. Perfil dos extratos de soja 47
4.3 QUANTIFICAÇÃO DAS ISOFLAVONAS DAIDZEÍNA E GENISTEÍNA NOS EXTRATOS DE SOJA 48
Figura 18. Padrão de isoflavonas Genisteína e Daidzeína 48

Figura 20. Curva padrão isoflavona Genisteína 49
Figura 9. Curva padrão isoflavona Daidzeína 49
Figura 10. Cromatograma de ESBT 50
Figura 11. Cromatograma de ESNBT 5mg/mL 51
Figura 12. Cromatograma do extrato de soja comercial com 0,3gµ/mL 51
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS DE SOJA EM CULTURA CELULAR DE FIBROBLASTOS 54
4.4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELA TÉCNICA DO VERMELHO NEUTRO (VN) 55
Figura 13. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro 56
4.4.2 ANÁLISE DA EXPOSIÇÃO DA FOSFATIDILSERINA E DA PERMEABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO 57
Figura 26. Gráficos obtidos com o ensaio da exposição da Fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo 58
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA DOS EXTRATOS EM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS (HDF-A) 59
4.5.1 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS PELA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING 60
Figura 27. Expressão do colágeno tipo I em células HDF-a 61
Figura 28. Quantificação do colágeno tipo I em células HDF-a 62
4.5.2 ANÁLISE DO COLÁGENO PELA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA 63
Figura 29. Cultura de células HDF-a na microscopia de fluorescência 65
Figura 30. Modulação de proteínas de colágeno I em cultura de células HDF-a na microscopia de fluorescência 67
4.6 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM PELE HUMANA 68
Figura 31. Obtenção do veículo (Creme) para incorporação dos extratos 68
Figura 32. Processamento dos fragmentos de pele Humana 70
Figura 33. Fragmentos de pele humana 71
4.6.1 EFEITO QUELANTE DO ÍON FERRO (FRAP) EM PELE 71
Figura 34. Efeito quelante do íon ferro (FRAP) em extratos de pele humana 72
4.6.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS 73
Figura 35. Quantificação de proteínas totais em extratos de pele humana 74

4.6.3 DETERMINAÇÃO DE COLÁGENO POR COLORAÇÃO DE LÂMINAS EM PICROSSÍRIUS - HEMATOXILINA EM PELE 75
Figura 36. Identificação de colágeno 1 em extratos de pele humana 76
Figura 37. Quantificação de colágeno 1 em pele humana 77
5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS 79
6. REFERÊNCIAS 82
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO FCFRP - USP 95
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE VERSÃO 4 96

1. Introdução

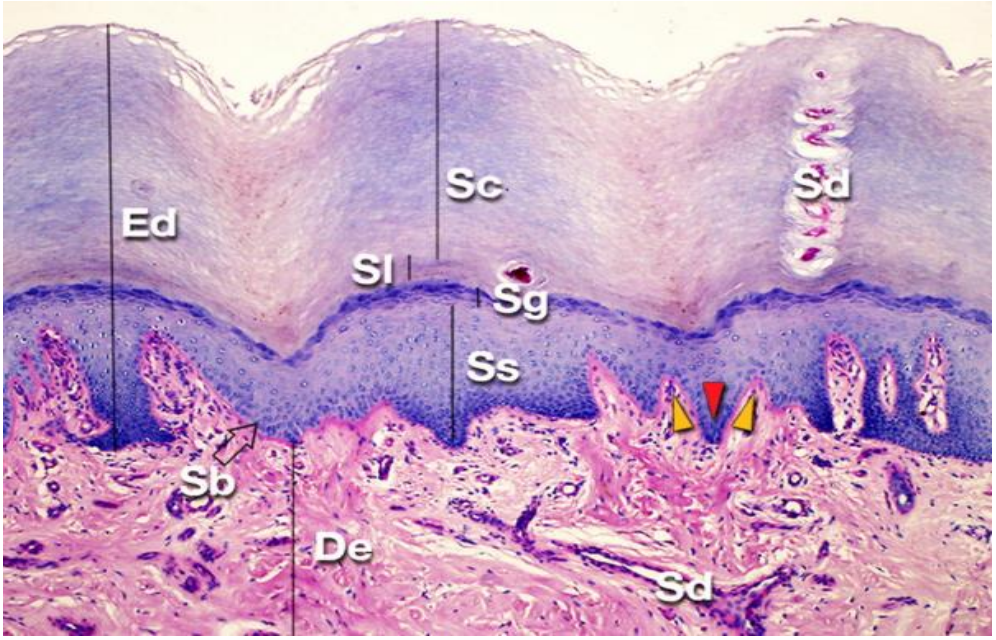
1.1 Pele

A pele é um órgão composto por um agregado de tecidos que funcionam em conjunto, sendo constituída por uma densa malha de fibras colágenas e elásticas (matriz extracelular), produzida pelos fibroblastos cutâneos, as quais garantem consistência física, como textura e elasticidade (YOSIPOVITCH et al., 2019). Histologicamente, esse órgão tem duas camadas principais, denominadas de epiderme e derme, com uma fáscia subcutânea chamada hipoderme, que se encontra profundamente na derme (ARDA, 2014). A epiderme é a camada mais externa do organismo e é formada pelo tecido epitelial de origem ectodérmica. A derme é a segunda camada da pele, mais profunda e espessa que a anterior, ela apresenta vascularização e é formada por componentes do sistema conjuntivo como colágeno e fibras elásticas. A última camada, mais profunda das três, é a hipoderme composta pelo tecido adiposo e conjuntivo (JUNQUEIRA e CARNEIRO et al., 2014).

Na epiderme são encontradas células que formam o epitélio escamoso queratinizado estratificado, sendo as mais abundantes os queratinócitos, responsáveis pela síntese da queratina, e outras não tão abundantes que se intercalam entre os queratinócitos, como os melanócitos, produtores de melanina, as células de Merkel, representadas por receptores mecânicos e as células de Langerhans, que apresentam antígenos e participam do sistema imune derme (BAUMANN, 2016).

A estruturação da epiderme, de forma geral se dá pela constituição de cinco camadas, denominadas de estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lucido e estrato córneo (Figura 1), sequencialmente da parte mais profunda da epiderme em direção à superfície da pele. A interface entre epiderme e derme abrange interdigitações irregulares que garantem sustentação a junção dos dois segmentos, perpendicularmente à superfície. As papilas dérmicas também contribuem para otimizar a superfície de contato entre a epiderme e a derme, que compartilham uma lâmina basal comum e bem definida (ARDA, 2014).

Figura 1. Camadas da pele de uma seção longitudinal de uma superfície do dedão do pé



A figura acima destaca as cinco camadas da epiderme em pele espessa. Ponta de seta vermelha, cristas epidérmicas; pontas de flechas alaranjadas, papilas dérmicas; Ed, epiderme; De, derme; Sb e seta apontando as células, estrato basal; Ss, estrato espinhoso; Sg, estrato granuloso; Sl, estrato lucido; Sc, estrato córneo; Sd, ducto da glândula sudorípara; X6.3, HE. Fonte: Arda (2014).

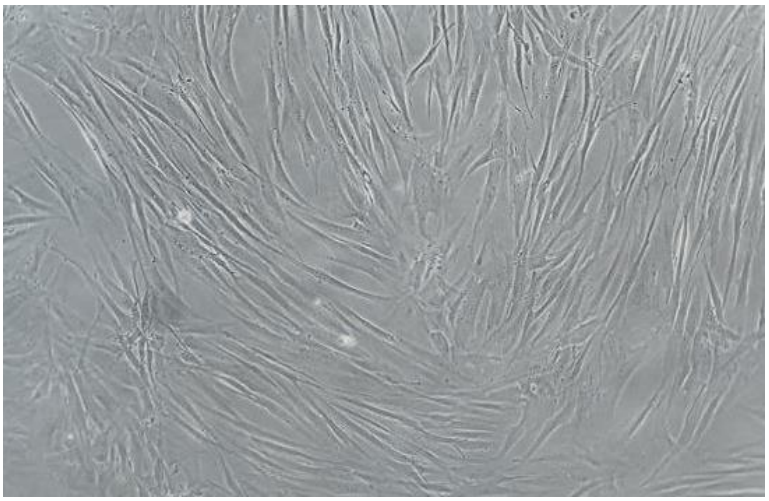
A derme possui duas camadas denominadas de papilar e reticular que são responsáveis por dar suporte e nutrição à epiderme. A camada papilar conecta a derme à epiderme e é constituída por tecido conjuntivo frouxo, promovendo a formação das papilas dérmicas e união das camadas. Já a camada reticular é a mais profunda da derme e é constituída de tecido conjuntivo denso não modelado, portando folículos pilosos, glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, colágeno e elastina (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2014). No tecido conjuntivo frouxo da derme estão localizados os fibroblastos, células numerosas e responsáveis por sintetizar colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteases, além de fibrilas especiais, que são localizadas em segmentos desde a membrana basal da epiderme até a derme (LI, 2011).

1.2 Fibroblastos

Os fibroblastos (Figura 2) originam-se a partir de uma célula mesenquimal indiferenciada, e permanecem durante todo seu ciclo de vida no tecido conjuntivo. A sua estrutura conformacional é caracterizada por prolongamentos citoplasmático e núcleo aparente, e quando ativos são células

maiores que os fibrócitos, também conhecidos como quiescentes ou não ativos. O retículo endoplasmático granuloso e complexo de Golgi dessas células são mais desenvolvidos e também possuem maiores quantidades de mitocôndrias e lipídeos quando ativados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2014). Essas unidades estruturais e funcionais são as responsáveis por manter a arquitetura desses microambientes teciduais, exercendo depósitos e remodelamento os componentes da matriz extracelular, na qual atua como a principal célula envolvida nos processos de cicatrização, onde durante o início da fase proliferativa e no final da inflamatória possuem capacidade de regeneração de tecidos (LI, 2016).

Figura 2. Fibroblastos (HDF-a)



Células de fibroblastos humano ativos em frascos para cultura celular padrão e com tampas com filtro e com áreas de crescimento de 75 cm² com meio RPMI completo, 6 dias após tripsinização com 1.106 células. Objetiva 20X. Fonte: Autor (2020).

Os fibroblastos aparecem no local da lesão e atuam degradando o coágulo de fibrina, produzindo várias metaloproteinases da matriz (MMPs) na qual, posteriormente, haverá uma substituição das mesmas por componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos, laminina, trombospondina, glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e sulfato de heparano (LI, 2011).

Essas células produzem colágeno para reparação tecidual por meio de cascatas bioquímicas após estimulação estrogênica, pela ligação de estimuladores com os Receptores de Estrógeno (RE), localizados em sua membrana citoplasmática, induzindo a produção de fibroblastos e, consequentemente, resultando em maiores concentrações de componentes secretados, revelando um forte envolvimento do RE na manutenção da homeostase da pele (WU et al., 2020).

1.3 Colágeno

O colágeno é a proteína estrutural mais abundante no corpo humano e promove suporte a vários tecidos, como tendões, pele e dentes (colágeno associado a cristais minerais). As fibras de colágeno são encontradas na pele, nos ossos, na cartilagem, nos músculos lisos e na lâmina basal e geralmente são brancas, opacas e facilmente reconhecidas nos tecidos, e por serem caracterizadas como material viscoelástico, possuem alta resistência à tração e baixa extensibilidade. Junto com a elastina, o colágeno é responsável pelas qualidades estruturais e elásticas dos tecidos, sendo as suas isoformas mais comuns as I, II e III, de modo que o tipo I é o mais amplamente distribuído no organismo (SILVA, 2017).

As fibras de colágeno fornecem às células sinais topográficos, bioquímicos e mecânicos que regulam a proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular (LI, 2011). A interação mecanobiológica entre as células e a matriz extracelular do colágeno circundante é essencial para orientar processos fisiológicos, como a cicatrização de feridas e a migração de células imunes, podendo também desencadear processos patológicos (TSCHUMPERLIN, 2013).

A estrutura molecular de colágeno se dá por uma distribuição helicoidal tripla com duas regiões não-helicoidais em cada extremidade da hélice (Figura 3a). Todas as proteínas que possuem uma estrutura baseada em três cadeias polipeptídicas em hélice pertencem a família do colágeno. As três fibrilas polipeptídicas podem ter um diâmetro variável de 10 a 500 nm, um peso molecular aproximado de 285 kDa, e comprimento de 1400 aminoácidos, que terão uma glicina a cada três resíduos, garantindo assim a estrutura helicoidal fibrilar. A estabilização da hélice tripla (Figura 3b) ocorre pelas ligações intramoleculares de hidrogênio entre glicina em cadeias adjacentes (SORUSHANOVA, 2019).

Figura 3. Estrutura molecular do colágeno

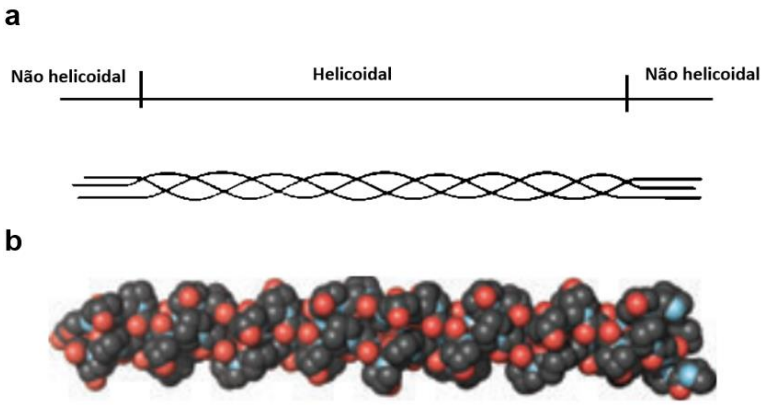
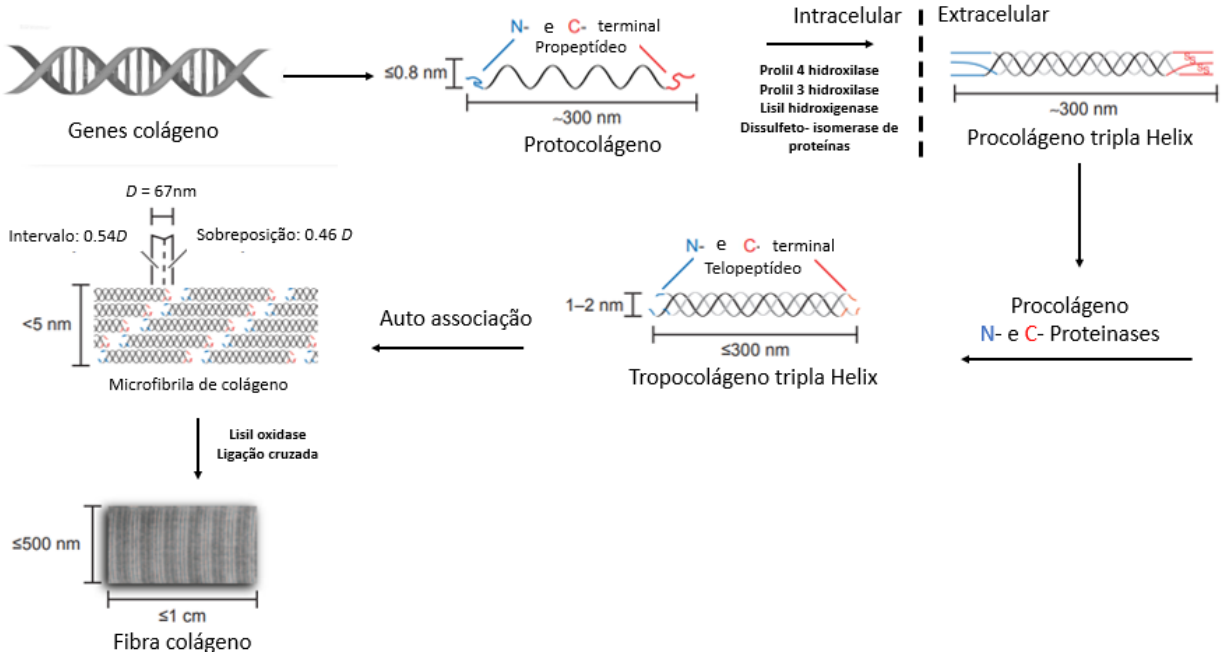


Figura (a) - Esquematização de uma cadeia molecular de um colágeno. Fonte: Adaptada de Sorushanova (2018). Figura (b) - Primeira estrutura cristalina de alta resolução de uma hélice tripla de colágeno, formada por (ProHypGly) 4–(ProHypAla) - (ProHypGly) 5 [Entrada de 1cag do Protein Data Bank (PDB)]. Fonte: Bella (1994).

A síntese de colágeno (Figura 4) é realizada por células do tecido conjuntivo, como os fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, que possuem genes que codificam cadeias α e iniciam a síntese do colágeno no núcleo. Os mesmos são ativados e transcritos nos respectivos RNA mensageiros e se deslocam para o espaço citoplasmático, onde são traduzidos em cadeias polipeptídicas, internalizadas nas cisternas do retículo endoplasmático, formando o polissomo. Essas cadeias sofrem hidroxilação pelos aminoácidos lisina e prolina (WU, 2020).

O alinhamento das cadeias e formação da molécula de procolágeno (precursora da molécula de colágeno madura) ocorrem após hidroxilação, e são secretadas pelas células por meio de vesículas que atingem a matriz extracelular. Com o auxílio da enzima procolágeno proteinase, ocorre a clivação dos domínios carboxi e amino terminais, presentes no procolágeno pela mesma. No final do processo, o tropocolágeno se associa espontaneamente para formar as fibrilas de colágeno. Os procolágenos do tipo I e III são precursores de colágeno maduro, e posteriormente, após todas as transformações, geralmente refletem nos níveis de colágeno correspondentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2014).

Figura 4. Biossíntese e processamento de colágeno



O procolágeno sintetizado intracelularmente e secretado extracelularmente, ocorre a clivagem específica das extensões N- e C-propeptídeo, pelas N- e C-proteinases, respectivamente. Este desencadeia a montagem espontânea do colágeno em fibrilas. Fonte: Adaptada de Shoulders (2009).

A importância biológica do colágeno se dá pela estabilização de força nos tecidos do corpo, criando redes de suporte ao longo das estruturas celulares. Na derme o colágeno é extremamente importante para manter a homeostasia do órgão, sendo que os colágenos dos tipos I e III compõem 90% dessa camada em uma distribuição de 60% a 80% do tipo I e 15% a 20% do tipo III, na qual são extremamente importantes para manter a homeostasia do órgão (SHOULDERS, 2009).

Perturbações na produção e decréscimo das concentrações de colágeno na pele acontecem naturalmente em mulheres no período da menopausa. Esses sintomas são rapidamente perceptíveis, tornando o tecido mais propenso a danos e com regeneração mais deficiente (WILKINSON e HARDMAN, 2017).

1.4 Menopausa e ação na pele

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a menopausa como o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica, com declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários, que ocorrem naturalmente (reconhecida após 12 meses consecutivos sem períodos menstruais que não esteja associada com uma causa

fisiológica) ou é induzida por cirurgia, quimioterapia ou radiação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2014).

Os sintomas do decréscimo de hormônios são variáveis e atingem as mulheres em diferentes intensidades e formas. Entre 60% a 80% das mulheres, durante a menopausa, relatam sintomas vasomotores que causam desconforto e influenciam negativamente sua qualidade de vida. Os relatos vão desde problemas como ansiedade, depressão, mudanças de humor, perda da memória e da concentração, irritabilidade, insônia, incontinência urinária, fadiga, palpitações cardíacas, aumento da osteoporose, envelhecimento da pele, doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer e outros (REID, 2014).

Estudos relacionados com a menopausa, desenvolvidos em 24 países, relatam o aparecimento natural da mesma por volta de 48 anos, e a heterogeneidade presente nos estudos é relacionada com a região geográfica (SCHOENAKER, 2014). Ensaios sobre fertilidade realizados em populações humanas relataram evidêcias de um intervalo constante de 10 anos entre o fim natural da fertilidade e a menopausa. Outro ponto levantado é a diminuição da idade inicial da menarca em vários países, associado às melhorias de saúde geral (DAAN, 2015).

A menopausa ocorre mais cedo entre países da África, América Latina, Ásia e Oriente Médio e mais tardiamente na Europa e na Austrália, seguida pelos EUA. Muitos fatores ambientais, características sociodemográficas, hábitos e estilo de vida podem influenciar no aparecimento natural da menopausa, já que existem evidências relacionando condições problemáticas durante o período fetal e o desenvolvimento infantil associada ao aparecimento natural da menopausa em idades inferiores (SCHOENAKER, 2014).

No Brasil, de acordo com dados disponibilizados na plataforma do DATASUS, em 2020 a população feminina brasileira totalizou mais de 107 milhões de mulheres (50,7% da população total). Cerca de 43 milhões se encontram entre 50 anos ou mais, o que significa que mais de 26% das mulheres no país estão na faixa etária em que ocorrem problemas relacionados com menopausa (DATASUS, 2020).

Uma das implicações relacionadas com a privação de hormônios, decorrente da menopausa, são as alterações na pele, que muitas vezes são atribuídas ao avanço do envelhecimento exógeno, incluindo casos de desidratação, atrofia, rugas e má cicatrização de feridas. Esse quadro está associado com a redução da sua espessura, perda de resistência mecânica, capacidade de cicatrização e regeneração (IRRERA, 2017).

O envelhecimento da pele, ocorre mais acentuadamente nas mulheres na fase de pós menopausa, e está relacionado com uma série de fatores cronológicos, ambientais, genéticos e hormonais (YAZDKHASTI et al., 2019). O estrogênio, hormônio feminino responsável também pela manutenção da pele, entre outras funções, ajuda a manter e restaurar a hidratação do órgão por meio de sistemas de secreção lipídica, por meio da sua regulação e aumento da produção de fatores de crescimento a partir de fibroblastos, induzindo a lipogênese em sebócitos humanos e levando à retenção de umidade. Os níveis de mucopolissacarídeos e ácidos hialurônicos na derme também são influenciados por esse hormônio, aumentando a capacidade de hidratação no órgão (DUARTE et al., 2016).

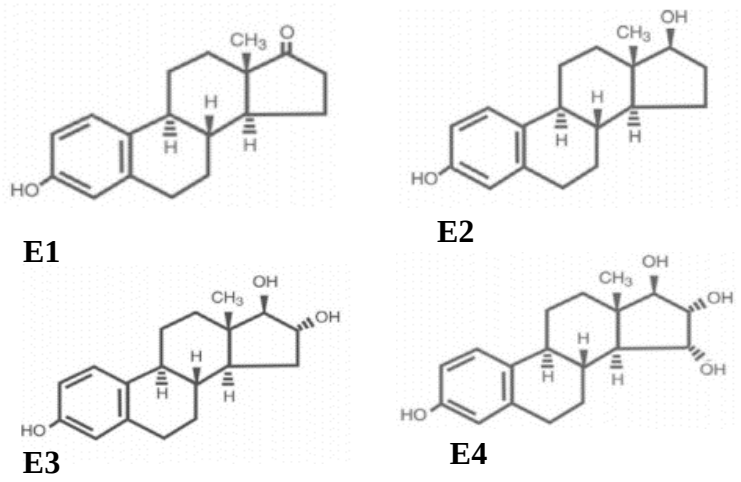
A redução da taxa de deposição de colágeno dérmico se relaciona com a taxa de deterioração da matriz extracelular e a deficiência de estrogênio. Estudos apontam que até 30% do colágeno dérmico pode ser perdido nos primeiros 5 anos após a menopausa, e o mesmo diminui aproximadamente 2,1% ao ano. Da mesma forma, a espessura da pele diminui 1,1% ao ano (ARCHER, 2012).

Estudos na área têm demonstrado que os estrógenos proporcionam importantes benefícios e efeitos protetores na fisiologia da pele (THORNTON, 2005), já que demonstram aceleração no processo de cicatrização de feridas cutâneas e proporcionam proteção contra o fotoenvelhecimento do órgão (ASHCROFT e ASHWORTH, 2003). Alguns dados experimentais ainda revelam que a presença desse hormônio pode proteger as células da pele contra danos oxidativos, tornando o tecido mais resistente à oxidação (BOTTAI et al., 2013).

1.5 Estrógeno e a sua atuação

O hormônio estrogênio é um composto químico orgânico usado como termo genérico para se referir a um grupo de hormônios femininos. Os ovários são os principais órgãos responsáveis pela síntese dos estrógenos, mas também podem ser produzidos nas glândulas supra-renais e no tecido adiposo. Quimicamente, esses compostos são conhecidos como estrona, estradiol, estriol e estretrol (Figura 5) e a sua estrutura geral similar é composta por 17 ligações carbono-carbono dispostas em quatro anéis e 18 carbonos, conhecidos também como esteroides-C18. A diferenciação entre eles é caracterizada por anel benzeno, um grupo hidroxil fenólico e um grupo cetona para a estrona e um, dois e três grupos hidroxils respectivamente para 17 b-estradiol, estriol e estretrol (FUENTES, 2019).

Figura 5. Estrogênios endógenos



Estrona (E1), 17 b-estradiol (E2), estriol (E3) e estretrol (E4). Fonte: Adaptada de Fuente (2019).

Na maioria das vezes o termo estrogênio é comumente usado para se referir ao estradiol ou 17 b-estradiol, devido ao seu papel durante os períodos reprodutivos, já os hormônios 16-hidroxiestradiol (estriol) e 15 a-hidroxiestriol (estretrol) são predominantemente encontrados durante a gravidez, enquanto a estrona é geralmente detectada em níveis mais altos durante a menopausa (SAMAVAT e KURZER, 2015).

O estradiol é secretado principalmente pelas células da granulosa dos folículos ovarianos e pelo corpo lúteo, e o seu principal substrato para a biossíntese é o colesterol alimentar, especificamente o colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL). Por meio da esteroidogênese, o colesterol é convertido nos hormônios esteróides 21-carbono (pregnanos, progestógenos), 19-carbono (androstanos) e 18-carbono (estranos) nas gônadas, córtex adrenal e tecido adiposo e assim pode desempenhar a sua função biológica (FUENTES, 2019).

O estrógeno exerce ação em grande parte da estrutura e das funções dos órgãos do aparelho reprodutor feminino e também da pele, na qual influência o seu desenvolvimento e composição. É necessário níveis adequados para facilitar sua integridade estrutural, capacidade funcional e estimular a proliferação, diferenciação e secreção das células epiteliais, como também o tecido conjuntivo que dependem desses hormônios (IRRENA, 2019).

No processo de cicatrização cutânea, os tecidos se reconstituem pela proliferação do tecido conjuntivo e subsequentemente há a reepitelização e finalmente a remodelação do tecido.

Estrógenos, outros hormônios e citocinas desempenham importante papel na cicatrização de tecidos e da pele (HELFERICH, 2008).

A ligação do hormônio aos receptores desempenha ação hormonal específica, assim como ocorre nos REs (Receptores de Estrógenos). Essa ligação é detectada em muitas células, incluindo as da pele, como os queratinócitos, glândulas sebáceas, glândulas endócrinas, folículos capilares, vasos sanguíneos e fibroblastos. A concentração dos receptores varia também de acordo com o local, estudos reportaram maiores números de receptores de estrogênios encontrados na pele facial do que em relação à pelve ou à mama. Assim, a diminuição dos hormônios sexuais induz uma redução das funções da pele que estão sob controle hormonal (HÜSER, 2018).

Na pele são encontrados predominantemente dois tipos: alfa (REa) e beta (REb) (PELLETIER e REN, 2004). Ambos receptores são proteínas distintas codificadas por genes separados em diferentes cromossomos. O REb está localizado no cromossomo humano 14, enquanto o REa é encontrado no cromossomo 6. A ligação ativa os receptores que atuam como fatores de transcrição, induzindo elementos de resposta ao estrogênio conservado nas regiões reguladoras dos genes-alvo (IRRENA, 2019).

Os estrógenos ao se ligarem com os RE a e b exercem ação como fatores de transcrição nuclear. O seu ligante endógeno mais forte é o 17 b-estradiol (E2), que passa passivelmente através da membrana celular ao se difundir nela. E como já foi mencionado anteriormente, perfis de expressão de REa e ERb variam e são específicos do tecido, sendo RE b mais amplamente distribuído na pele em relação ao RE a. Os níveis de expressão começam a declinar à medida que as mulheres entram em um estado de deficiência de estrogênio (NELSON e BULUN, 2001). Apesar do seu papel homeostático hormonal, pesquisadores relatam que a ativação do REa é o principal fator de câncer de reprodução, o que torna o REb um alvo terapêutico seletivo para uma nova via promissora de intervenções (KUMAR et al., 2016).

Com a ausência de hormônios e consequentemente da sua ação, alternativas para a atenuação dos sintomas foram estudadas. A aplicação da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) com a prescrição de estrógenos e/ou progesterona sintéticos para a diminuição desses sintomas foi amplamente empregada no passado. Porém, estudos indicaram efeitos adversos como o aumento da incidência de câncer de mama e endométrio em tratamentos prolongados, especialmente porque o câncer de mama é a causa mais frequente de morte em mulheres, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma. No Brasil, a estimativa entre os anos 2020-2022 aponta que ocorrerão 66

mil novos cânceres de mama, o que representa uma taxa de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres, gerando uma enorme preocupação e motivação para alcançar novas alternativas de tratamentos (INCA, 2021).

1.6 TRH e ação da pele

Estudos indicam que o estrógeno tem a capacidade de prevenir o declínio de colágeno e de aumentar a retenção de água, aprimorando função da barreira epidérmica. Mulheres na menopausa que realizavam reposição hormonal sintética foram estudadas e foi constatado que o grupo tratado teve aumento da hidratação na pele, em relação ao o grupo sem tratamento. O estrógeno pode aumentar concentrações do ácido mucopolissacarídeo e do ácido hialurônico na pele, e os seus efeitos também se relacionam com o estímulo da vascularização, o que eleva a irrigação superficial, fato não observado em homens (SILVA, 2017)

Foi comprovado que o uso de hormônios sintéticos aumentou o risco de doenças cardíacas, assim como o risco de câncer endometrial. Uma opção para amenizar essa problemática seria a utilização de fontes alternativas, como fitoestrôgenos, os quais apresentam atividade estrogênica fraca com menor atividade hormonal em relação aos hormônios sintéticos utilizados na terapia de reposição hormonal (RZEPECKI, 2019).

No Brasil, em 2014 a Febrasgo (Federação Brasileira de Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia) estimou que quatro milhões de mulheres acima dos 45 anos utilizam a TRH. Dois importantes estudos que influenciaram nesse panorama foram desenvolvidos: o HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, 2000 e 2002) e o WHI (Women’s Health Initiative, 2002), que alertaram para os efeitos adversos da TRH como o aumento da incidência de câncer de mama e endométrio e doenças tromboembólicas em tratamentos prolongados. Em tais estudos, utilizando medicamentos à base de uma combinação de hormônios estrogênio e progesterona, observou-se um leve, mas significativo aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama, tendo sido suspensos nos EUA. Esses estudos foram os primeiros em larga escala e de longa duração a quantificar os riscos e benefícios da TRH convencional, alertando a importância de fontes alternativas para tratamento, como fitoestrógenos (MARJORIBANKS et al., 2017).

Devido aos efeitos colaterais associados ao uso prolongado de estrogênio relacionados com a ocorrência de fatores de risco em algumas mulheres, pesquisas com alternativas terapêuticas foram estimuladas. Alguns estudos usando isoflavonas isoladamente ou em combinação com

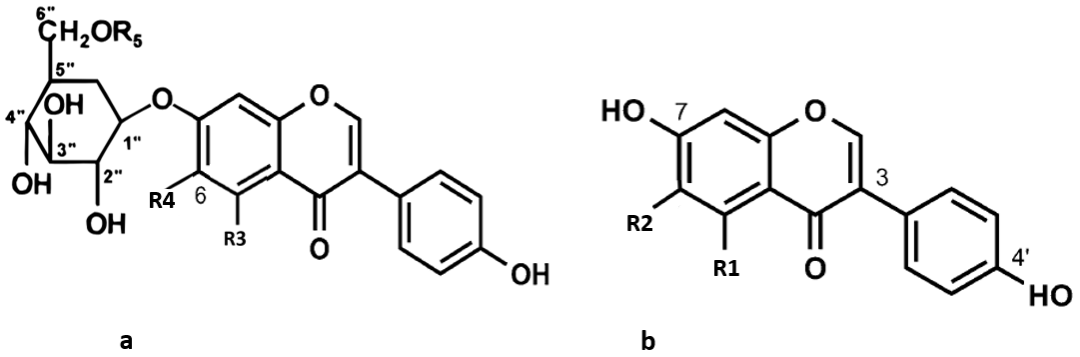
outros agentes mostraram efeitos positivos, especificamente nas alterações cutâneas, na aparência e na composição da pele, típicas da menopausa, juntamente com o aumento da síntese e a diminuição da degradação do colágeno dérmico (SILVA, 2017).

1.7 Fitoestrógenos

Os fitoestrógenos são provenientes do metabolismo secundário de plantas, e possuem estrutura básica fenólica muito semelhante ao do estrógeno 17 b-estradiol e auxiliam na regulação do seu crescimento e as protegem contra o estresse e efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta (KŘÍŽOVÁ et al., 2019).

Os flavonóides são categorizados em flavonóis, flavonas, flavononas, catequinas, antocianinas, chalconas e isoflavonas, com potência de expressão estrogênica. As isoflavonas são isômeros que se diferenciam das demais estruturas dos flavonóides por apresentarem o ciclo benzênico unido ao carbono 3 do heterociclo em vez do carbono 2, como mostra a Figura 6, podendo ser encontradas de forma glicosilada ou aglicona (ANDRES et al., 2015).

Figura 6. Estrutura de isoflavonas

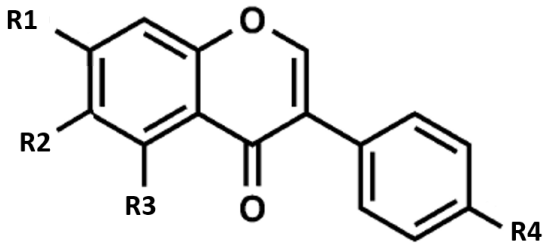


Glicona (a) e Aglicona (b). Fonte: Adaptada de Hüser (2018).

Em seus estudos iniciais, Liu e colaboradores (1999) revelavam a existência de três tipos de isoflavonas na soja, cada uma em quatro formas químicas diferentes, totalizando 12 isômeros. As formas agliconas são chamadas de Daidzeína, Genisteína e Gliciteína (Figura 7). Quando glicosiladas, ou seja, na forma de glicosídeos, são chamadas de Daidzina, Genistina e Glicitina. Existem também as isoflavonas b-glicosídicas conjugadas que podem ser classificadas em acetil glicosídeo e malonil glicosídeo (LIU et al., 1999).

Figura 7. Variações de isoflavonas

Isoflavona	R1	R2	R3	R4
Genistina	O-glicosil	H	OH	OH
Genisteína	OH	H	OH	OH
Daidzina	O-glicosil	H	H	OH
Daidzeína	OH	H	H	OH
Glicitina	O-glicosil	OCH_3	H	OH
Gliciteína	OH	OCH_3	H	OH

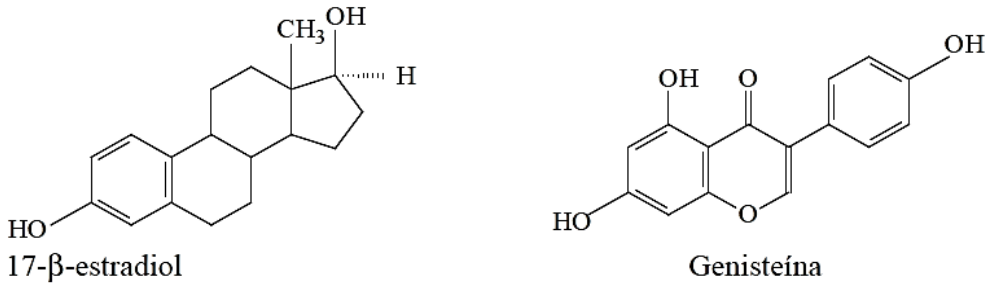


Fontes: Lima (2003).

As formas glicosiladas são as mais presentes na soja, constituindo entre 50% e 90% das isoflavonas. Porém, as formas agliconas Daidzeína e Genisteína, presentes em pequena quantidade na soja são as que possuem atividade biológica de interesse farmacêutico. As isoflavonas ingeridas na dieta estão na forma glicosilada e são hidrolisadas por enzimas b-glicosidases presentes na microflora intestinal, responsáveis pela atividade biológica (CEDERROTH e NEF, 2012). Em dezembro de 2009 a isoflavona da soja foi aprovada pelo ministério da saúde para ser distribuída pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para reduzir os sintomas da menopausa, e em 2008 lançou Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Esses compostos químicos mimetizam funcionalmente e estruturalmente hormônios de mamíferos, e são uma alternativa à terapia hormonal sintética, devido ao seu potencial estrogênico e a sua estrutura. A Genistina, Daidzina e suas respectivas agliconas são consideradas Moduladores Seletivos do Receptor de Estrógeno (SERMs - Selective Estrogen Receptor Modulators), na qual possuem afinidade com os receptores de estrogênio pois suas estruturas (Figura 8) se assemelham ao hormônio feminino 17-b-estradiol (CHAN et al., 2018).

Figura 8. Similaridade nas estruturas químicas



Estrutura do estrógeno fisiológico 17 b-estradiol e da isoflavona Genisteína.
Fonte: Kim et. al. (1998).

As isoflavonas agliconas mais comuns são Daidzeína e Genisteína, encontradas em frutas, vegetais, leguminosas, nozes e em maior quantidade em grãos, principalmente na soja (HÜSER et al., 2018). Wang, Murphy (1994) desenvolveram uma série de trabalhos envolvendo isoflavonas em soja, e determinam que a forma predominante é genistina, que representa 25 a 42% do total de isoflavonóides em cultivares. Muitos trabalhos demonstram que a quantidade de isoflavonas varia entre as gliconas e agliconas em relação às condições ambientais e com diferentes cultivares de soja (WANG e MURPHY, 1994).

Existem outros trabalhos de Wang e Murphy que demonstraram que produtos fermentados de soja apresentam diferença significativa em relação aos não fermentados, como maior número de agliconas. Os autores analisaram o tempeh (alimento à base de soja fermentada), proteína isolada de soja, leite de soja e tofu (alimento produzido a partir da soja) e cada etapa dos processamentos para verificar o procedimento de conversão de isoflavonas e as suas perdas. Resultados promissores revelavam que o aumento das concentrações de Daidzeína e Genisteína em alimentos fermentados foram possivelmente ocasionadas devido à hidrólise enzimática e alcalina, respectivamente (WANG e MURPHY, 1996).

Estudos sobre reposição hormonal utilizando o fitoestrógeno Genisteína revelaram efeitos positivos, pesquisadores observaram que a ingestão de 40 mg de soja por dia diminui o envelhecimento da pele em mulheres de meia idade (CIRCOSTA et al., 2006). ACCORSI NETO (2009) demonstrou que o tratamento por via oral, com 100 mg por dia, de um extrato de soja rico em isoflavonas aumenta a espessura da derme e epiderme e aumenta o conteúdo de colágeno e fibras elásticas (ACCORSI NETO, 2009).

Em 2017, um estudo com a população brasileira sobre o colágeno da pele facial de mulheres na pós menopausa de 45 a 55 anos, foi realizado para comparar os efeitos do estrogênio tópico e da Genisteína nas voluntárias que não estavam em terapia hormonal sistêmica e demonstrou aumento na quantidade de colágeno facial dos tipos I e III no final de ambos os tratamentos, sendo que resultados do grupo estrogênio foram superiores ao grupo Genisteína, porém ambos apresentam resultados positivos (SILVA, 2017).

Outro estudo realizado em 2019 reuniu uma coletânea de dados de trabalhos relacionando os efeitos da aplicação de fitoestrógenos na pele em mulheres na menopausa (Tabela 1). Os resultados apontam dados estatisticamente significativos de características de interesse, como melhores aspectos para o tecido exposto ao tratamento tópico (RZEPECKI, 2019).

Tabela 1. Estudos avaliando o efeito da isoflavona tópica na pele em mulheres na pós-menopausa.

Grupo de estudo	Grupo de tratamento	N	Duração do tratamento	Local da aplicação do tratamento	Resultados de interesse
Bayerl and Keil, 2002	Cremes que contem fitoestrógenos (0.0075% ou 0.015% isoflavona)	234	12 semanas	Pescoço, rosto, braço	-Melhora ressecamento da pele* e rugosidade* - Redução de rugas faciais* e folga da pele*
Moraes et al., 2009	Gel com isoflavonas (Genisteína 4%)	18	24 semanas	Rosto	- Aumento da espessura epidérmica* e número de vasos*, fibroblastos e papilas dérmicas
Patriarca et al., 2013	4% Genisteína gel	15	24 semanas	Rosto	- Aumento na concentração de ácido hialurônico*
Silva et al., 2017	4% Genisteína gel	15	24 semanas	Rosto	- Aumento da produção de colágeno dos tipos I e III

* Significância estatística de pelo menos $p < 0,05$. Fonte: Rzepecki (2019).

1.8 Fitoestrógenos e Receptores Estrogênicos (REs)

O mecanismo de ação dos fitoestrógenos é complexo, a sua ação mais conhecida se dá pela via de interação com os receptores nucleares para estrógeno, isoformas de receptor de estrógeno alfa e receptor de estrógeno beta, desempenhando papeis tanto agonistas como antagonistas em

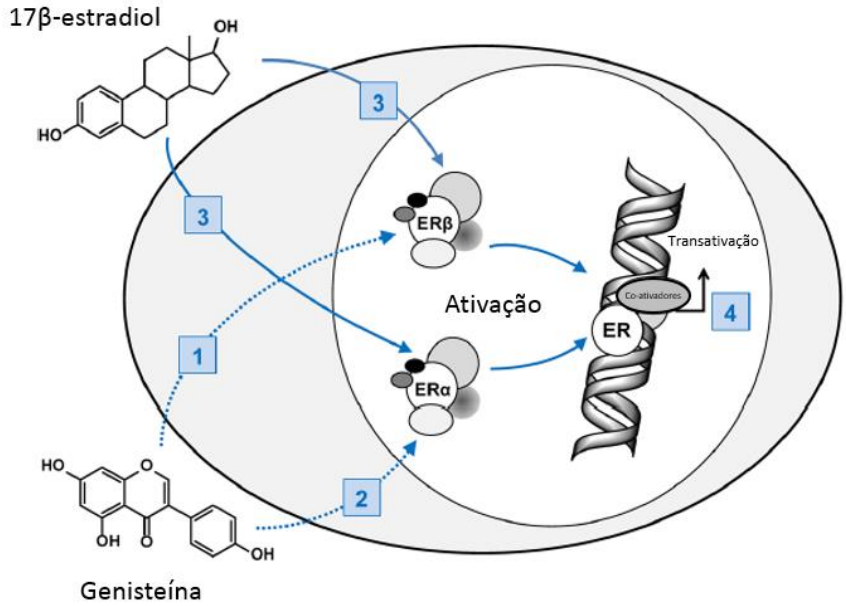
relação à ação dos estrógenos. Comparadas com o 17 b-estradiol, as isoflavonas possuem pouca afinidade pelo REa e alta afinidade pelo REb, apenas um pouco inferior quando comparado ao estrógeno (HÜSER et al., 2018).

Sua ação biológica final depende de múltiplos fatores, tais como a estrutura química do fitoestrógeno, tipo de tecido ou célula, estado estrogênico intrínseco, forma de administração, metabolismo, tempo e nível de exposição. Esses compostos caracterizam-se por especificidade tecidual elevada e atividade dose-dependente (RZEPECKI, 2019).

Ambos os REs se ligam ao estradiol com afinidade semelhante, no entanto, os perfis de expressão de REa e REb são específicos do tecido, com REb mais amplamente distribuído na pele que REa, já que é expresso em fibroblastos, queratinócitos e em macrófagos. Baseados em novos estudos, descobriu-se que a ativação do REa é o principal fator de câncer de reprodução, o que torna o direcionamento seletivo do REb uma nova via promissora para intervenção direcionada (KUMAR et al., 2016).

Como já dito anteriormente, as isoflavonas apresentam semelhanças estruturais com 17b-estradiol e interagem com os dois tipos de receptores de estrógeno, desempenhando ação sobre a estrutura tridimensional dos REs e também desenvolvem interações com cofatores. Devido a esse mecanismo e à especificidade do tecido, as isoflavonas agem como agonistas / antagonistas parciais (Figura 9), semelhantes aos Moduladores seletivos de receptores de estrogênio SERMs (CHAN et al., 2018).

Figura 9. Relação do 17-b-estradiol e da Genisteína com os Res



1 Ligação preferencial com REβ. Ativação do REβ mediado por mecanismos celulares.

2 Ligação como agonista de REα. Ativação do REα clássico mediado por mecanismos celulares.

3 Compete com 17β-estradiol para se ligar aos REs α e β. Atua como um antagonista funcional.

4 Conexão do ligante ao RE afeta a estrutura 3D do Re e as suas interações com Co-ativadores. Efeito seletivo do tecido

Adaptada de Huser et al. (2018)

A afinidade de ligações específicas das isoflavonas aos REa e REb podem ter relevância mecanicista, já que os efeitos estrogênicos mediados pelos mesmos podem ser plausíveis desse ponto de vista. Embora o ligante natural 17b-estradiol tenha afinidade de ligação com REa, as isoflavonas tem preferência para se ligarem ao REb, e a afinidade de ligação ao RE da Genisteína é maior quando comparada com Daidzeína. Nesse mesmo sentido, para se testar a ação estrogênica de isoflavonas é necessário a utilização de algum antagonista de REb para avaliar suas atividades, como 2-Phenyl-3-(4-hydroxyphenyl)-5,7-bis(trifluoromethyl)-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine, 4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]-pyrimidin-3-yl]phenol - PHTPP (SETCHELL e CLERICI, 2010).

As isoflavonas, em especial a Genisteína, possuem papel preventivo nas alterações relacionadas à idade da pele, que são aceleradas pela menopausa, sem os efeitos colaterais estrogênicos prejudiciais aos tecidos reprodutivos devido à maior afinidade pelo REb, encontrados

com mais frequência na pele, nos ossos e no sistema cardiovascular (SILVA, 2017), e baixa afinidade por REa, encontrada no útero e nas mamas (DUARTE et al., 2016). Os fitoestrógenos são capazes de interagir com enzimas e receptores, e devido a sua estrutura estável e a baixa massa molecular, podem atravessar as membranas celulares, já que possuem capacidade seletiva aos tecidos pelos moduladores seletivos do receptor de estrogênio, exercendo ação sobre a expressão gênica (MESSINA, 2014).

Em 2017 um trabalho *in vivo* e *in vitro* demonstrou que a isoflavona Genisteína, ao ligar-se com o receptor de estrogênio b, resultava em um melhor perfil para alterações da pele, como atrofia, enrugamento e má cicatrização de feridas, já que a mesma apresenta uma afinidade de aproximadamente 30 vezes maior para REb que REa (IRRERA, 2017).

1.9 Biodisponibilidade das isoflavonas

A Genisteína aglicona é absorvida pelo intestino e é conjugada com ácido glucurônico durante o transporte através das células epiteliais intestinais. Após o transporte para o fígado, o glucuronídeo é excretado, permitindo novamente a entrada no intestino delgado, fazendo com que a Genisteína seja desconjugada, absorvida e metabolizada pela segunda vez (NINGTYAS et al., 2021).

Estudos sobre a absorção e biodisponibilidade estão sendo desenvolvidos em seres humanos e já demonstraram que a biodisponibilidade das isoflavonas está relacionada com a capacidade da flora intestinal em degradar isoflavona glicosilada, e também com a dose ingerida na dieta. A fermentação intestinal realizada pela microbiota pode ser acentuada pela alta ingestão de carboidratos, acelerando assim o processo de biotransformação das isoflavonas e afetando também a sua concentração no plasma (MUROTA et al., 2018).

Um trabalho realizado com a população ocidental, a fim de verificara a relação entre ingestão e excreção de isoflavonas, revelou que mulheres que consumiam soja na frequência de uma vez por semana apresentaram maiores concentrações na excreção de isoflavonas comparado com as que não consumiam, concluindo dessa forma que a ingestão de produtos à base de soja levou ao aumento do teor de isoflavonas no organismo (HEINONEN et al., 1999).

Xu e colaboradores (1995) concluíram que as isoflavonas glicosiladas não são absorvidas diretamente, devido principalmente ao açúcar unido através da ligação beta. Somente isoflavonas sem a molécula de açúcar (agliconas), são capazes de passar através da parede do intestino. As

isoflavonas glicosiladas (Daidzina e Genistina) devem sofrer a quebra da ligação glicosídica pela enzima b-glicosidase intestinal, afetando a sua biodisponibilidade (MUROTA et al., 2018).

A biodisponibilidade das isoflavonas é extremamente importante para a sua ligação ao REs e a sua ação estrogênica. A modificação das isoflavonas glicosiladas para as agliconas podem ocorrer tanto naturalmente, *in vivo*, pelas enzimas b-glicosidases do nosso organismo, quanto *in vitro*, pelas mesmas enzimas de fonte microbiana, como o fungo *Aspergillus awamori*. As ações na pele dependem da absorção das isoflavonas, tanto cutânea ou oral, e da sua biodisponibilidade, na conformação aglicona, e da sua ligação com REs adequados, e em concentração suficiente para estimular a sua ação (RZEPECKI, 2019).

1.10 O fungo *Aspergillus* e b-glicosidase fúngica

O fungo *Aspergillus awamori* (Figura 10), pertence ao gênero *Aspergillus*, são os segundos isolados mais comuns, sendo também conhecidos como fungos de deterioração de alimentos (SHIMIZU, 2019). Além disso, esses microrganismos são utilizados para a produção de enzimas e substâncias orgânicas por fermentação, possuindo capacidade de produzir b-glucosidases, utilizadas atualmente em processos enzimáticos para o melhoramento de biomassa lignocelulósica (ORIENTE, 2015).

Figura 10. Foto fungo *Aspergillus awamori*

Fonte: Autor (2019).

Essa enzima possui peso molecular em torno de 60 kDa, pH de crescimento em torno de 5,5 e a temperatura ótima para atividades enzimáticas de 50ºC. Atualmente a procura por novas fontes de obtenção de b-glucosidases de maneira sustentável e economicamente viável prioriza o uso de matérias-primas renováveis e processos de baixo custo. A mesma é responsável pela quebra

de ligações glicosídica b-1,4 de celooligossacarídeos, resultando na liberação de glicose, podendo ser produzida por microrganismos ou ser extraída de frutas e leguminosas (NISHIDA, 2018).

Trabalhos publicados por Esaki e colaboradores (1999) revelam que a fermentação da soja com *Aspergillus saitoi* podia converter Daidzina e a Genistina em Daidzeína e Genisteína respectivamente, devido à presença da enzima b-glicosidase. Park e colaboradores (2001) chegaram a mesma conclusão utilizando a enzima produzida por *Aspergillus oryzae* isolada de miso (pasta feita a partir de grãos de soja cozidos).

Outros estudos de Traon-Masson e Pellerin (1998), Peshin e Mathur (1999) e Spagna e colaboradores (2002), também destacaram a produção de enzimas b-glicosidase por *Aspergillus spp*. Na qual esse ultimo purificou a enzima de *A. niger* para converter produtos glicosilados durante o processamento de frutas.

Uma das formas de produção enzimática pelo *A. awamori* é a fermentação em estado sólido, que consiste no cultivo de microrganismos em substratos sólidos úmidos. A menor utilização de água ganhou considerável atenção recentemente devido à algumas vantagens sobre o cultivo submerso. As vantagens desse cultivo remetem à simplicidade das condições de crescimento, baixo consumo de energia e alta produtividade (NISHIDA, 2018).

Considerando essas vantagens, é relevante o desenvolvimento de investigações da produção da enzima b-glicosidase e de seus microrganismos envolvidos, como o *Aspergillus awamori*, já que pesquisas evidenciam que a atividade enzimática da mesma retira moléculas de glicose das isoflavonas glicosiladas, aumentando consideravelmente o teor de isoflavonas agliconas biodisponíveis (MUROTA et al., 2018).

1.11 Soja transgênica

Figura 11. *Glycine max* (soja)

Fonte: Pedro Silvestre/Canal Rural (2020).

A cultura de soja (figura 11) vem se expandindo muito desde as últimas décadas, diversos tipos de soja estão sendo desenvolvidas para obtenção de melhores características de comércio e investimento financeiro. Atualmente 92% da área total de plantio da oleaginosa é de soja geneticamente modificada. Em 2017, esse valor já era de 83 milhões de toneladas, um aumento de quase 300%. A Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, projeta que o Brasil deve semear algo próximo a 36,4 milhões de hectares com soja na safra 2019/2020, 1,7% a mais que as 35,8 milhões de hectares da temporada anterior (CIB, 2017).

A Associação Brasileira de Produtores de Soja (APROSOJA) estima que as exportações de soja brasileira em grãos devam alcançar 77 milhões de toneladas em 2020, 3 toneladas a mais em relação ao ano anterior, as receitas com as vendas externas projetaram o valor de 26,8 bilhões de dólares nesse mercado. A associação estima também em razão do cenário mundial impactado pela pandemia de COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), do câmbio desvalorizado e dos juros internos baixos favorecem melhores negócios para a safra brasileira 2019/2020. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020) apontou para um crescimento de 7,8% na produção da soja, e prevê safra recorde de grãos em 2020.

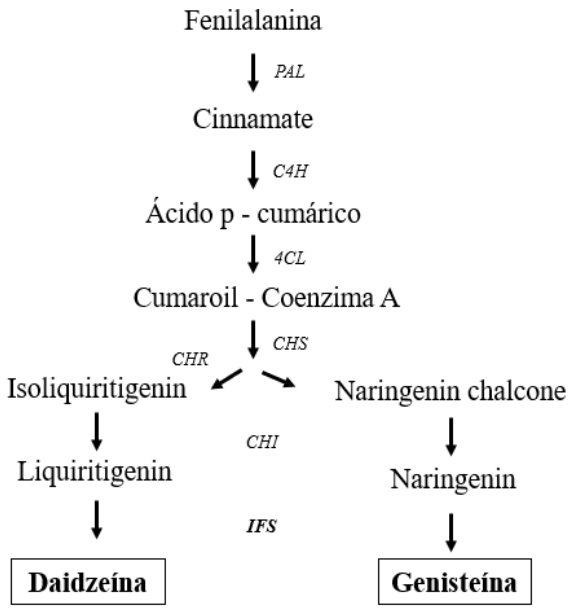
Somado ao mercado financeiro crescente para o plantio de soja, a cultivar também é associada a muitas propriedades à saúde, como na redução de doenças crônicas, doenças cardiovasculares, resistência à insulina / diabetes tipo II, obesidade, certos tipos de câncer,

distúrbios imunológicos e até como terapia alternativa para reposição hormonal convencional para o combate de seu efeito adverso. Muitos compostos funcionais ou bioativos da soja são derivados do processamento, podendo ser intensificados ainda com tecnologias eficazes, como a fermentação microbiana (CHATTERJEE et. al., 2018).

A síntese e a acumulação de isoflavonas é um processo ainda incerto, a sua formação envolve processos complexos influenciados por fatores genéticos e ambientais. Esse processo está relacionado com locus de características quantitativas (QTLs) que possuem menores efeitos e com a epistasia ou interações entre efeitos de alelos de dois ou mais locus genéticos. Esse último efeito pode representar até 50% da variação de uma determinada isoflavona em um ambiente específico. Muitos fatores ambientais podem modular também a produção, como por exemplo ferimentos, nodulações e ataques de patógenos, temperatura, regime hídrico, luz UV (Ultravioleta), nutriente do solo conteúdo e dióxido de carbono (SUBRAMANIAN et al., 2007).

Genisteína, Daidzeína e Gliciteína são sintetizados pela via fenilalanina, e a enzima que diferencia especificamente espécies vegetais produtoras de isoflavona daquelas sem conteúdo de isoflavona é a isoflavona sintase (IFS), que está presente em duas cópias: IFS1 e IFS2 (Figura 12), e que pode diferir em alguns aminoácidos. A expressão do IFS2 aumenta durante os estágios finais do desenvolvimento das sementes e pode ser detectado também se induzidos em resposta a tensões, enquanto os transcritos do IFS1 são mantidos mais constantes (GUTIERREZ-GONZALEZ, 2010).

Figura 12. Produção isoflavonas



Fonte: Adaptado de Gutierrez-Gonzalez, 2010.

Estudos revelam que metabólitos secundários de sojas transgênicas desempenham atividades significantes em distintos campos de estudos. Duke e colaboradores (2003) afirmam que isoflavonas não são reduzidas em sojas transgênicas, e ainda revela que o glifosato não interfere sobre a redução dos níveis de fitoestrógenos na soja resistente ao mesmo. Alezandro e seus colaboradores (2008) também determinaram que não há redução de macronutrientes e de isoflavonas Daidzeína e Genisteína em sojas transgênicas por meio de técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Tsai e colaboradores (2014) afirmam que leite de soja transgênica com ou sem fermentação probiótica também pode melhorar a hipercolesterolemia e reduzir o risco de aterosclerose (TSAI et al., 2014).

As transgenias mais comuns no Brasil são as relacionadas com os genes CP4 EPSPS, introduzido na soja por biobalítica (aceleração de partículas) e confere resistência ao glifosato, como ocorre naturalmente em alguns microrganismos, os quais possuem a enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS). As inserções transgênicas no genoma das plantas de soja são estáveis e possuem herança mendeliana, e a possibilidade de transferência dos transgenes é a mesma de qualquer outra cultivar convencional de soja, e ocorrem somente entre plantas de soja. Outra transgenia muito comum no Brasil foi o melhoramento genético por meio da combinação de

genes da bactéria *B. thuringiensis* para produção da proteína inseticida CryAC, que confere a soja uma resistência aos ataques de lepidópteros (WU et al., 2017).

Nesse contexto atual, garantir que grãos de soja adquiridos em estabelecimentos comerciais, tanto para consumo, quanto para plantação, são cultivares não transgênicas é inconsistente. Avaliar parâmetros em relação à atividade estrogênica e produção de colágeno, no que diz respeito à extratos de cultivares de soja transgênica ou não transgênica é extremamente essencial para a validação do método de produção para obtenção do material biotransformados fidedigno e com potencial de geração de produto significante para a indústria. Embora a utilização de soja tenha sido aplicada a muitos tratamentos de reposição hormonal, pesquisas na literatura não revelam relatos sobre a aplicação da soja biotransformada transgênica for fungo *A. awamori* em estudos de produção de colágeno. Diante do exposto, esse extrato foi avaliado empregando para a determinação da produção de colágeno do tipo 1 em cultura de células humana e em pele humana. Ademais, o extrato produzido foi comparado com outro extrato produzido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016) para avaliar se esse produto seria interessante se utilizado em cosméticos, como uma terapia de reposição hormonal alternativa à tradicional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver processo avaliativo e comparativo de extratos de soja comercial, de extratos de soja comercial, e extratos biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori*, ou não, analisando o potencial estrogênico dos mesmos na indução de colágeno tipo 1.

2.2 Objetivos específicos

a) Produção de extratos de soja biotransformado pelo fungo *A. awamori* e de extrato de soja não biotransformado;

b) Quantificação de Daidzeína e Genisteína nos extratos adquiridos;

c) Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de soja (biotransformados, não biotransformados e do extrato comercial), bem como do extrato de soja comercial em cultura de HDF-a (Fibroblastos Dérmicos Humanos adultos);

d) Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo o extrato de soja biotransformado;

e) Avaliação da produção de colágeno estrogênio-dependente pelos extratos de soja biotransformado e do extrato de soja comercial *in vitro*, em cultura de células primárias (HDF-a).

f) Avaliação da produção de colágeno estrogênio-dependente pelo extrato de soja biotransformado *ex vivo*, em cultura de pele humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Suporte e base de padronização e comparação do projeto

O presente projeto foi desenvolvido tendo como base de comparação e estabelecimento de parâmetros o trabalho intitulado "Avaliação da atividade estrogênica de extrato de soja biotransformado por fungo na produção de colágeno", depositado em 2016 na plataforma virtual da biblioteca digital da USP, de Dissertações e Teses (https://teses.usp.br/index.php?option=com_jumi&fileid=17&Itemid=160&id=77A70D239667&lang=pt-br), desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), na qual foi adotado como matéria prima uma cultivar de soja não transgênica da variedade Codetec 232.

3.2. Produção dos extratos de soja

Todos os testes desse projeto utilizaram extratos de soja (*Glycine max*) devidamente produzidos nas mesmas condições e parâmetros pré-estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa, nas quais foram: Extrato de Soja Biotransformado por Enzimas de Fungo *Aspergillus awamori* (ESBT) e Extrato de Soja Não Biotransformado (ESNBT).

3.2.1. Obtenção da farinha de soja desengordurada

Os grãos de soja (Kodilar - NaturalLife®; lote 231-4; Grupo 1; Classe amarela; Tipo 1) foram comprados em mercado local em Ribeirão Preto, como produto de consumo popular e de fácil acesso, presente na dieta da população. Os grãos foram moídos em moinho de martelo com 160 µm de granulometria. O processo da extração da fração lipídica foi realizado com álcool isopropanol (Dinâmica ®; código: 1339; lote: 92603) na proporção de 1 kg de soja para 2 L de álcool isopropanol (1:2).

A mistura resultante foi submetida à agitação em agitador mecânico (Fisatom; Modelo: 713D; Série: 101063), por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo foi submetido à centrifugação (Eppendorf; Número: 0033988), em 11,5 G na temperatura de 25 ºC, por 10 minutos (BLUM et al., 2009).

A fração sobrenadante foi colhida e armazenada para posterior reciclagem do solvente e a massa foi colocada em banho maria à 60 °C, até a secagem do material. A farinha foi despejada em uma forma de alumínio e deixada *overnight* em capela de exaustão para eliminação de solventes residuais. Posteriormente o material foi armazenado à 10 °C (BLUM et al., 2009).

3.2.2 Ativação do *Aspergillus awamori* e obtenção da suspensão de esporos

O fungo *Aspergillus awamori* (CCT5935) foi adquirido por meio da Instituição André Tosello, e posteriormente repicado em tubos de ensaio, com 39g/Lmeio de Batata Dextrose Agar (BDA, Kasvi), autoclavados e inclinados. O microrganismo foi mantido em estufa à 30 °C, por 7 dias. Após esse período foi realizada a sua inoculação, como descrita na seção 3.2.3.

3.2.3 Biotransformação da Farinha de Soja Desengordurada por esporos de *Aspergillus awamori* em cultura

O protocolo de biotransformação foi baseado em métodos pré-estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa para base de comparação (STOCCO, 2016). As alíquotas de 5 g de farinha de soja desengordurada foram transferidas para frascos *erlenmeyers* de 125 mL tampados e foram autoclavados (Phoenix Modelo Av) por 15 minutos à 121 °C. O material foi deixado em temperatura ambiente *overnight* e foram transportados para o fluxo, sob luz UV por 15 minutos na qual foi efetuada uma pressão, como batidas com a palma da mão no fundo do recipiente para a descompactação e melhor proliferação do fungo. Foram adicionadas 4 mL de água deionizada estéril em cada alíquota e o material foi deixado sob luz UV (Cabina de segurança biológica classe II, VECO, BIOSEG 09) por mais 15 minutos.

Com auxílio de um bastão de metal e com a adição de salina estéril (NaCl 0.9%), os esporos do fungo presente na superfície do meio de cultura em tubo de ensaio foram ressuspendidos e filtrados com gaze estéril.

O número de esporos foi determinado por meio de contagem na câmara de Neubauer. A diluição da suspensão foi realizada de tal modo a se obter 1.10^6 esporos/mL de salina, que sob a farinha de soja desengordurada estéril foi depositado de modo uniforme, e posteriormente mantida em estufa à 30 °C por 120 horas. Foram feitas extrações de enzimas e medição de pH a cada 24 horas para determinação de atividade enzimática durante 5 dias.

Após determinado período de incubação com a suspensão de esporos, adicionou-se 21 mL de água gelada no processo de extração enzimática, na qual foi agitada durante 15 minutos em 150 rpm *shaker* e posteriormente submetida a filtragem com gaze e centrifugação por 10 minutos à 20°C em 11,5 G. O sobrenadante foi recolhido e armazenado no congelador para posterior análise.

3.2.4 Estudo da atividade enzimática de b-glicosidases, lipases e proteases produzidas pelo fungo *Aspergillus awamori*

As atividades das enzimas foram determinadas ao longo de 5 dias, nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, à 30° C no sobrenadante recolhido da etapa anterior, na qual havia sido congelado e aliquotado em *eppendorfs* de 1 mL para análises. O estudo foi realizado nos ensaios de proteínas totais e para enzimas peptidases, b-glicosidases e lipases, produzidas pelo fungo *A. awamori*, a fim de elucidar melhor a ação desses agentes sob o extrato. Durante o estudo foram utilizados 3 *erlenmeyers* por dia (triplicata), com 5 g de extrato, 4 mL de água destilada e 1 mL de salina 0,9% com $1,10^6$ esporos; e um *erlenmeyer* como padrão negativo, na qual houve a inoculação de 1 mL de salina 0,9% e 4 mL de água destilada.

Para determinação de proteína, utilizou-se o ensaio de Bradford (1976), na qual a solução de 100 mg de azul de coomassie G-250 foi dissolvida em 50 mL de etanol 100%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água miliQ qsp 1000 mL, e foi realizada com 1 mL da solução em 20 µL das amostras, deixadas no escuro de 5 a 10 minutos e em seguida lidas em aparelho espectrofotométrico (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices®) à 595 nm.

A determinação da atividade das peptidases foi realizada de acordo com ensaio caseinolítico, com algumas modificações (SARATH; DE LA MOTTE; WAGNER,1996), na qual foi utilizado 100 µL das amostras e 500 µL de caseína (1% em tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 6,5) em banho maria à 40 °C. Após 45 minutos, foi adicionado em todas as amostras, exceto nos brancos, 300 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v). Para o branco de cada controle e triplicata, foi adicionado 300 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v) sob 100 µL da amostra, e posteriormente 500 µL de caseína. Todas as amostras foram centrifugadas à 930 G por 10 minutos à 25 °C e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro com comprimento de luz UV à 280 nm com cubeta de quartzo.

A atividade da enzima b-glicosidase foi medida no filtrado coletado, utilizando o substrato p-NPG (p-nitrophenol-a-D-glucopyranoside), de acordo com método modificado, descrito por Miura e colaboradores. Nas amostras aliquotadas, em 50 µL foram adicionados 200 µL de tampão p-NPG em banho maria à 40 °C por 20 minutos e posteriormente 250 µL de N_aCO_3 (0,5 M) para parar a reação. O branco foi feito a partir de amostra inicial, aliquotada em 50 µL, e adicionado sob ela 250 µL de N_aCO_3 (0,5 M) e posteriormente 200 µL de tampão p-NPG à 45 °C por também 20 minutos. A solução colorimétrica, após ser centrifugada por 10 minutos à 25 °C e 930 G, foi

recolhido o sobrenadante e lido em aparelho espectrofotômetro à 410 nm. Uma curva padrão com 4-Nitrofenol foi preparada para os cálculos de atividade enzimática (MIURA et al., 2002).

Já a atividade das lipases, esta foi também medida em 50 µL no filtrado coletado e 200 µL de substrato formado por 10 mg de goma arábica, 50 µL de Triton X-100, 18 mL Tris-HCl (50 mM, pH 8), 7,7 g p-NPP (p-nitrophenil-fosfato) e 2 mL de isopropanol em banho maria à 40 °C por 20 minutos. Para parar a reação foi usado 250 µL de uma solução saturada de tetraclorato de sódio. O branco foi realizado a partir da amostra inicial, aliquotada em 50 µL, adicionada à 250 µL de solução saturada de tetraclorato de sódio e posteriormente à 200 µL de substrato de lipase à 45 °C por também 20 minutos. A solução colorimétrica foi centrifugada por 10 minutos, à 25 °C e 930 G, foi recolhido o sobrenadante e lido em aparelho espectrofotômetro à 410 nm (LEAL, 2000).

3.2.5 Biotransformação da farinha de soja desengordurada por enzimas de *Aspergillus awamori* em cultura semi-sólida

Foi escolhido o filtrado enzimático correspondente ao melhor resultado de atividade enzimática de b-glicosidases, e em melhor tempo de exposição dos esporos, na qual foi inoculado em uma nova massa de soja (5 g), em *erlenmeyer* de 125 mL, o volume correspondente à 1000 unidades de atividade enzimática e incubado por 120 minutos à 30 °C em *shaker* a fim de todo o volume entrar em movimentação 150 rpm. Os compostos foram extraídos com etanol 80%, utilizando etanol 100% até a obtenção de volume alcoólico total de 80%. A suspensão aquosa foi centrifugada, e o seu sobrenadante filtrado a vácuo em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm, para esterilização. O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador e posteriormente liofilizado e congelado em abrigo da luz.

3.2.6 Obtenção do extrato de soja sem biotransformação como controle negativo

Para a fabricação do extrato de soja não biotransformado, utilizado neste estudo como controle, foram adotados todos os procedimentos utilizados para obtenção do Extrato de Soja Biotransformado (ESBT), exceto para o volume de 1 mL da suspensão de esporos, na qual foi substituído pelo mesmo volume de salina estéril. Os dois extratos hidroetanólicos foram caracterizados por medida das quantidades de Genisteína e Daidzeína, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

3.2.7 Obtenção de extrato de soja comercial

O extrato de soja comercialmente disponível no mercado foi adquirido da empresa Purifarma. Trata-se de um extrato de soja seco, contendo 41,06% de isoflavonas: Dadzina 1,02%, Glicitina 0,31%, Genistina 1,69%, Daidzeína 37,67%, Gliciteína 0,11% e Genisteína 0,26%.

3.3 Quantificação de Daidzeína e Genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a obtenção das quantificações de Daidzeína e Genisteína existentes em ESBT, ESNBT e extrato de soja comercial, foram feitas análises por meio de CLAE. Os extratos de soja foram ressuspendidos em metanol 80%, nas concentrações de 5 mg/mL para extratos biotransformado e sem biotransformação; e 0,015 mg/mL de extrato comercial, e posteriormente filtrados em 0,22 µm.

As análises foram executadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com uma bomba, modelo LC-10AT, e um detector UV-visível, modelo SPD-10A. As análises foram conduzidas em coluna de fase reversa BDS Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm) da Thermo Scientific, acoplada a uma pré-coluna. A eluição foi conduzida em gradiente, e a fase móvel empregada foi composta de 1% de ácido acético em acetonitrila (solvente A) e 1% de ácido acético em água (solvente B). Em seguida à injeção de 20 µL de amostra, o solvente A foi aumentado de 0% até 35% em 90 minutos, finalizando o gradiente. A vazão empregada foi de 1 mL/min e a detecção no UV foi realizada em 280 nm (FORTES, 2011).

Para avaliação da linearidade do método cromatográfico, foram preparadas várias soluções em triplicata dos padrões de Daidzeína e Genisteína (Sigma®, St Louis, MO, USA). Os padrões foram diluídos em metanol 80% nas concentrações de 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 9,0 µg/mL.

3.4 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de soja em cultura celular de fibroblastos

3.4.1 Linhagem celular e cultivo

As culturas de células primárias de fibroblasto humano (HDF-a - Human Dermal Fibroblasts adult) foram adquiridas da empresa Life Technologies (Invitrogen-Cat. Nº. C0135C) e foram cultivadas em frascos de cultivo de 75 cm^2 em meio RPMI 1640 (R6504 - Sigma-Aldrich®)

suplementado de 10% de soro fetal bovino inativado (F6765 - Sigma-Aldrich®), 1% de glutamina (G7513 - Sigma-Aldrich®), 1% de antibiótico/antimicótico (A5955 - Sigma-Aldrich®) e mantidas em estufa contendo 5% de gás carbônico (CO^2) e temperatura de 37 ºC. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até as culturas atingirem 80 a 100% de confluência. As células foram tripsinizadas das garrafas, utilizando solução de tripsina/EDTA 0,2%/0,02% (59418C - Sigma Aldrich®), e coradas com corante supra-vital azul de tripan 0,1% e as células viáveis foram contadas sob microscopia em câmara de Neubauer e plaqueadas para os experimentos).

3.4.2 Tratamentos

Após o plaqueamento e ao atingirem confluência, as células foram submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de ESBT, ESNBT e extrato de soja comercial. Os três tratamentos foram submetidos aos mesmos parâmetros de diluição das amostras em PBS 1X e filtragem em 0,22 µm.

Nos ensaios de citotoxicidade, as células foram tratadas com 500; 100; 50; 10; 1; e 0,1µg/mL de ESBT, ESNBT e extrato de soja comercial. Os extratos de soja foram solubilizados da seguinte forma:

a) ESBT: 10 mg diluídos em 10 mL de meio de cultura RPMI sem estrógeno;

b) ESNBT: 10 mg diluídos em 10 mL meio de cultura RPMI sem estrógeno;

c) Extrato de soja comercial: 10 mg diluídos em 10 mL meio de cultura RPMI sem estrógeno;

A partir das soluções *a*, *b* e *c* foram obtidas as soluções de trabalho. O controle negativo foi o tratamento de células com meio de cultivo RPMI sem estrógeno e o controle positivo com solução de Triton 2% em meio de cultura RPMI sem estrógeno.

3.4.3 Análise da viabilidade celular pela técnica de Vermelho Neutro em cultura de células

A citotoxicidade dos ESBT, ESNBT e extrato de soja comercial foi analisada em células de culturas primárias de fibroblastos humanos (HDF-a) pela técnica de vermelho neutro (VN). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e após adquirirem confluência foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos, conforme descrito no item 3.4.2, durante 24 horas, e após esse período de incubação com os extratos, foi adicionado 20 0µL de VN (50 µg/mL) em meio

RPMI sem estrógeno em cada poço. Após três horas, o corante foi removido e as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% (v/v) e $CaCl_2$ 1% (p/v), e em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol 50% com ácido acético 1% (v/v). A leitura da absorbância foi realizada após 20 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices®) a 540 nm. A viabilidade celular das linhagens celulares foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\%\ \text{Viabilidade Celular} = \frac{[(\text{DO tratamento}) - (\text{DO branco})]}{[(\text{DO controle}) - (\text{DO branco})]}\ \text{x}\ 100$$

3.4.4 Análise da exposição de fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo

Esta técnica foi realizada com o objetivo de confirmar os resultados encontrados no ensaio de análise da viabilidade celular pela técnica de VN, que serviu como triagem para determinarmos quais concentrações dos extratos seriam utilizadas na análise da exposição de fosfatidilserina e da permeabilidade celular (Anexina V-FITC/PI iodeto de propídeo), visto que esta é uma técnica de alto custo e que demanda a utilização de uma grande quantidade de células e a disponibilidade de utilização do aparelho de análise (Citômetro FACSCanto - software DIVA - Becton Dickinson, CA, EUA). Neste ensaio, as células foram cultivadas com o respectivo meio de cultura (37 °C, 5% CO_2), em placas de 12 poços ($1x10^5$ células/poço), durante 24 horas. Após este período, os fibroblastos foram submetidos aos tratamentos com as concentrações de extrato previamente determinadas, mediante resultados obtidos no ensaio de VN. Foram utilizadas as concentrações de 500 e 100 µg/mL para os ESBE e ESNB, e para o extrato comercial. Após os tratamentos, o sobrenadante foi colhido e as células foram lavadas com PBS 1X e removidas dos poços com uma solução tripsina 1X (Gibco BRL, Life Technologies, Garithesburb, MD). Após se desprenderem do fundo do poço, elas foram submetidas à centrifugação à 1000 G à temperatura ambiente, por 5 minutos. O *pellet* celular foi incubado com 100 µL tampão de ligação (10 mM HEPES - pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl2, 1,8 mM CaCl2) e com 1 µg/mL de Anexina-V FITC (Roche Applied Science) para análise da exposição de fosfatidilserina na membrana celular por 20 minutos. Finalmente foram adicionados 200 µL de tampão de ligação e 4 µL de iodeto de propídeo (100µg/mL-Sigma Aldrich) para análise da permeabilidade celular. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo.

3.5 Análise da produção de colágeno em cultura celular de fibroblastos humanos primários

3.5.1 Tratamento celular (HDF-a)

Para os próximos ensaios descritos neste trabalho (Western Blotting e Imunofluorescência), os tratamentos das células foram realizados de acordo com resultados obtidos nos ensaios anteriores. Após adquirirem confluência, as células HDF-a foram plaqueadas com meio de cultura contendo 10% de soro bovino fetal durante 24 horas. Após este período, o meio foi substituído por outro meio RPMI sem estrógeno com tratamento de 1,33 µg/mL, na qual corresponde à 2,27 ng/mL de Genisteína.

3.5.2 Análise do colágeno e receptores de estrógeno pela técnica de Imunofluorescência

Inicialmente foi realizada a limpeza de lamínulas de vidro (KNITTEL) de 13 mm por 24 horas de molho em ácido clorídrico 6 N. Elas foram lavadas com H_2O, mergulhadas em etanol 70% e deixar de molho em etanol 100% P.A. Posteriormente, em fluxo laminar, foram flambadas e alocadas em placa de 24 poços, que após a montagem foram deixadas exposta na luz UV por 15 minutos.

Após essa etapa, as células foram plaqueadas ($5{,}10^4$ células/poço) com meio de cultura RPMI (500 µL totais) sobre as lamínulas, por 24 horas, e então foram adicionados os tratamentos, que também ficaram em contato com as células por 24 horas. A lavagem com PBS 1X foi realizada e as células foram fixadas com 500 µL de formaldeído 2% em PBS 1X. A placa ficou incubada por 20 minutos a 37 °C e posteriormente foi realizada 3 lavagens com PBS 1X. As mesmas foram permeabilizar por 10 minutos com 50 µL de Triton X-100 a 0,3% em PBS 1X e bloqueados os sítios livres do formaldeído com 500 µL de PBS 1X + Glicina 0,25 M por 5 minutos. Também foi realizado o bloqueio, por 45 minutos, com 500 µL de 1% de BSA (A7906 – Sigma) + 5 µg/mL anticorpo IgG Rabitt em PBS 1X e incubadas com anticorpo primário anti-colágeno tipo 1 (Chondrex - 7086) por 1 hora a temperatura ambiente (diluído em 1% BSA em PBS 1X) e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com alexa 488 ant. Rat (A21206, molecular probes) 1:350, e DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole) 1:125 por 1 hora (diluído em 1% BSA em PBS 1X). Foram realizadas 5 lavagens por 5 minutos em PBS 1X. As lamínulas foram

retiradas dos poços com cuidado e enxaguadas rapidamente em água milli-Q e montadas com 10 µL em meio de montagem (10 µg de parafenileno de amina em 50 µL DMSO, 1mL de PBS 10X e 9 mL de glicerol 100%) sob lâmina, nas quais foram permeabilizadas com esmalte colorido e a sua leitura realizada no microscópio Leica Microsystems (Leica DM 1000 Led). A análise de detecção de colágeno do tipo I é perceptível pela marcação de coloração verde presente no citoplasma das células da linhagem HDF-a com o corante Alexa 488. Os núcleos das células foram corados com corante azul fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para controle do ensaio. A investigação do papel estrogênico na produção de colágeno do tipo I se deu pela aplicação do b-bloqueador PHTPP combinado com o ESBT, na qual foi adicionaldo 1 horas antes do acréscimo do ESBT, e mantido em combinação por 24 horas de exposição. Também foi utilizado o PHTPP sozinho, para fim de controle do experimento. Os resultados foram obtidos po meio da quantificação de pixels pela marcação do corante Alexa 488 e pela normalização, também pela contagem de pixels do corante DAPI, com o auxílio do softwere ImageJ®.

3.5.3 Análise da produção de colágeno em fibroblastos primários pela técnica de Western blotting

Neste ensaio as células foram plaqueadas em placas de 6 poços ($1x10^6$ células/poço) e vinte e quatro horas após receberem diferentes tratamentos (item 3.5.1), as células foram tripsinizadas, centrifugadas e lisadas com tampão de lise de fosfoproteínas (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA (sal) 1 mM e Igepal CA 630 1% v/v) com 1% de inibidor de protease e 10 % de inibidor de fosfatase para obtenção do extrato proteico). A quantificação de proteínas do extrato proteico foi realizada pelo kit Pierce ™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher), pela detecção baseada em absorvância da solução.

O extrato proteico (25 µg) foi ressuspendido em tampão de amostra (100 mMol Tris-HCl, 5% b-mercaptoetanol, 4% dodecilsulfato de sódio e 20% de glicerol) e incubado por 5 à 100 ºC, centrifugadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Em seguida as amostras foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose de 0,22 µm (GE Healthcare) e incubadas com o anticorpo primário (1:1000) anti-prócolágeno I (Abcam antibodies, ab34710/ Lot: GR159090-1) *overnight*. No dia seguinte as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:10000) anti-rabbit (Jackson Immuno Research, Code: 711-035-152/ Lot: 104907) e a imunodetecção das proteínas de interesse foram visualizadas por quimiolumonescência com o uso

do sistema ECL (GE Healthcare) e fotodocumentador ChemiDoc (Biorad ChemiDoc XRS + System with Image Lab™ Software). Também se utilizou anticorpo primário (1:5000) anti-tubulina a/b (Cell Signaling Technology, Code: 2148S/ Lot: 0005) como controle para normatizar a quantificação da produção de colágeno perante os diferentes tratamentos com o software ImageJ®.

3.5.4 Desenvolvimento de formulação cosmética contendo extratos de soja

A formulação escolhida foi preparada baseada em resultados de estabilidade, características organolépticas, pH, temperatura, centrifugação e perda de água. Todos esses testes foram realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), na qual foi determinado que a formulação do tipo creme seria a ideal para atuar como veículo dos extratos de soja (ESBE e ESNBT). Os mesmos extratos foram solubilizados em solução de propilenoglicol e água (50:50), enquanto que o extrato comercial foi solubilizado em propilenoglicol (1:1). As formulações preparadas são galênicas simples, variando o mínimo possível em seus componentes, pois a análise dos efeitos do ESBT é o principal objetivo deste trabalho.

A formulação de creme foi preparada pelo método de inversão de fases, sendo as fases aquosa e oleosa aquecidas separadamente até 80 °C e, em seguida, misturadas manualmente. Foram preparadas formulações placebo (veículo) para cada formulação. A composição da formulação está descrita na tabela 2. As formulações foram armazenadas em potes de PVC opacos brancos, com capacidade para 50 g, para posterior realização dos testes.

Tabela 2. Composição da formulação cosmética

Componentes	(em %)
Acido esteárico TP®[a]	20%
Propilparabeno	0,02%
Metilparabeno	0,18%
Propilenoglicol	10%
Trietanolamina	1%
Extratos de soja	3%
Água deionizada	65,8%

[a]Ácido octadecanóico tripla pressão

3.6 Análise da produção de colágeno em ensaio *ex vivo*

3.6.1 Obtenção, estabelecimento, manutenção e cultivo de explantes de pele organotípicas

Neste ensaio foi utilizado pele humana, proveniente de doações de cirurgias médicas de abdominoplastias (Of. CEP/FCFRP nº. 017/2021). O material teve a gordura subcutânea superficial removida e posteriormente deixado *overnight* em PBS 1X com penicilina (500 U/mL), estreptomicina (500 µg/mL), fungizona (25 µg/mL) e gentamicina (250 µg/mL). Após esse período, toda camada de hipoderme restante foi removida e então foi cortado o material com o auxílio de um *punch* para que pudesse se obter uma área 2 cm^2. As peças cortadas foram descontaminadas por uma hora em meio DMEM contendo penicilina (500 U/mL), estreptomicina (500 µg/mL), fungizona (25 µg/mL) e gentamicina (250 µg/mL). As peles foram cultivadas em uma solução de 1:1 de DMEM sem fenol red com Ham's F-12, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de l-glutamina, 5 µg/mL de insulina e 10-11 de triiodotironina suplementado com soro fetal bovino (5 %), piruvato (1 mM) glutamina (8 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), fungizona (2,5 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL). A derme ficou submersa no meio de cultura com a sustentação de *grids*, enquanto que a epiderme foi mantida em contato com o ar. O critério de inclusão para esse projeto foram mulheres sem tratamento de reposição hormonal, com idade superior a cinquenta anos, não fumante e não usuária de medicamentos, por pelo menos um mês antes da cirurgia de retirada de pele. Após a aplicação da formulação, a pele foi limpa com auxílio de pinça e bisturi e estocada a -80 ºC.

3.6.2 Tratamento das peles

A formulação de creme, descrita acima, foi utilizada na forma de veículo para a incorporação de 3% de ESBT e 3% ESNBT. Além disso, o creme foi utilizado sem a adição de extratos como placebo (controle de veículo), e como controle negativo do estudo foi utilizado fragmentos de pele, na qual ficaram isentas de creme.

Após as peles serem cortadas em fragmentos de 2 cm^2, as formulações de creme com os extratos e o placebo foram passadas no material de forma uniforme e a permanecer em contato com a epiderme 2 mg de creme por cm^2. Foram utilizadas triplicatas de cada uma das condições propostas, analisadas em três diferentes tempos (0 dias, 15 dias e 30 dias), como segue

esquematizado no planejamento da tabela 3. O meio de cultura foi trocado de 48 horas em 48 horas, da mesma forma que foi passado o creme nos materiais, retirando o excesso remanescente do período anterior, com o auxílio de material autoclavado.

Tabela 3. Esquematização dos fragmentos de pele nas condições de estudo

Tempo	Pele sem veículo	Pele com placebo	Pele com creme de ESBT	Pele com creme de ESNBT
0 dias	3 fragmentos*	3 fragmentos	3 fragmentos	3 fragmentos
15 dias	3 fragmentos	3 fragmentos	3 fragmentos	3 fragmentos
30 dias	3 fragmentos	3 fragmentos	3 fragmentos	3 fragmentos

*Fragmentos de 2 cm^2 de pele humana

Após o período de exposição, uma fração foi mantida em nitrogênio líquido para análises antioxidantes e de proteínas totais, enquanto outra fração foi deixada em formol 10% com tampão fosfato de sódio por 4 horas, e em seguida transferido para uma solução de etanol 70% para confecção de lâminas histológicas para identificação e quantificação de colágeno.

3.6.3 Homogeneização do material e obtenção das alíquotas.

No momento da utilização, as amostras de pele foram descongeladas e picotadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), contendo EDTA (1 mM), PMSF (1 mM), pepstatina (1 μg/mL) e leupeptina (1μg/mL), na proporção de 200 mg de pele para 2 mL do tampão. Após esse processo, o material foi homogeneizado em Turrax® e a suspensão centrifugada a 9,5 G por 30 minutos a 5 ºC. O sobrenadante foi aliquotado e estocado no nitrogênio líquido até a utilização para as análises de Efeito quelante do íon ferro (FRAP) e quantificação de proteínas totais.

3.6.4 FRAP em pele

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro foi medida a habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+}/tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+}, de intensa cor azul na absorção máxima a 593 nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, por meio da mistura de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e de $FeCl_3$ (20 mM) em solução aquosa em uma proporção de 10:1:1. Uma alíquota de 30 μl da solução de extrato de pele

foi adicionado a 150 µl do reagente FRAP e incubado a 37 °C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi obtida por meio da curva padrão de trolox.

3.6.5 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelos reagentes Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Número do catálogo: 23225), na qual as amostras foram retiradas do -80 °C e centrifugadas à 4 ºC por 20 min à 10000 G. As amostras foram diluídas 5X e foi adicionado o regente de trabalho 50:1, conforme indicado no catálogo do kit utilizado. A amostras foram quantificadas em triplicata, na qual se adicionou 10 µL das mesmas com mais 200 µL da solução de trabalho em placas de 96 poços de ELISA. Essa mistura foi mantida por 30 minutos em ambiente escuro à 37 °C. Após esse período a absorbância foi lida em 562 nm em leitor de placa ELISA. Os resultados foram obtidos ao plotar uma curva de BSA com 9 pontos, submetida às mesmas condições das amostras.

3.6.6 Determinação de colágeno por coloração de lâminas em picrossírius - Hematoxilina em pele

O colágeno e a morfologia da pele foram determinados por ensaios de coloração, usando hematoxilina/eosina. Primeiramente, as lâminas contendo as secções de pele foram fixadas com tolueno e coradas com hematoxilina e eosina. O colágeno e a morfologia das amostras foram determinados por microscopia de luz polarizada, usando o módulo automeasure da Zeiss Axiovision imaging system. A identificação e quantificação de colágeno foi determinada em 6 campos diferentes da epiderme de cada secção estudada com o software ImageJ®.

3.7. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 6.0® (GraphPad Software, USA), Image J® (Image J Software, USA) e Image Lab® (Image Lab software, USA). Os resultados foram expressados como média ± e desvio padrão e média ± SEM (Standard Error of the Mean). Após verificar a homocedasticidade pela variância das amostras e distribuição normal das mesmas envolvidas neste estudo, pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Dois grupos foram analisados usando o teste t-Student, enquanto três ou mais grupos foram comparados de dois em dois usando a

combinação das análises ANOVA com Tukey e Dunnett post-hoc. A significância estatística foi indicada quando $p<0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade enzimática do *Aspergillus awamori*

Estudos sobre parâmetros que influenciam no processo de biotransformação pela inoculação de microrganismos em extratos vegetais têm se tornado extremamente necessários. A elucidação da composição do extrato de soja biotransformado e a sua atividade biológica, pela ação do fungo *A. awamori*, ainda não está totalmente esclarecida.

Uma investigação sobre as principais enzimas envolvidas no processo fermentativo foi elaborada para esse trabalho. Além da enzima b-glicosidase, outros compostos proteicos que poderiam estar envolvidos na fermentação tiveram a sua atividade enzimática medida antes do processo de inoculação.

Segundo estudos publicados (TOKUDOME et al., 2012), a concentração média de colágeno em cultura de fibroblastos é influenciada após 8 horas de sua adição, quando submetido a tratamento com peptídeos de soja, já que os mesmos possuem capacidade de aumentar o colágeno tipo I. Esses compostos podem ser obtidos por meio de hidrólises proteicas, impulsionados por enzimas liberadas pelo microrganismo inoculado. A obtenção do perfil das atividades enzimáticas das principais enzimas no momento da inoculação é necessária para especulações a respeito da presença de peptídeos de soja no extrato biotransformado.

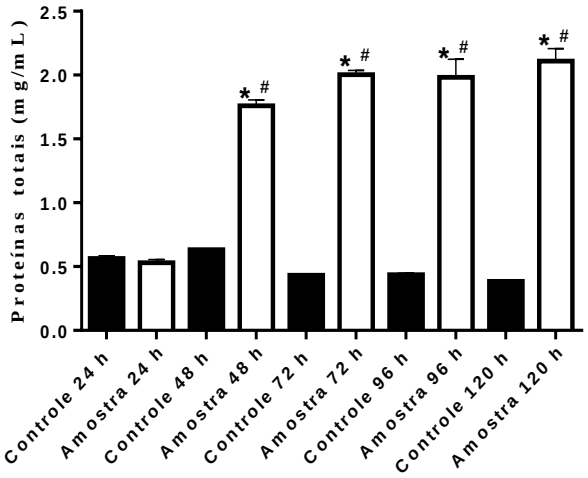
4.1.1 Proteínas totais

Foi realizada a quantificação de proteínas totais (Figura 13) em ESBT (Extrato de Soja Biotransformado): amostras 24, 48, 72, 96 e 120 horas) e ESNBT (Extrato de Soja Não Biotransformado): controles 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O gráfico apresenta os valores coletados por meio de atividades enzimáticas de proteínas totais. Dentre as amostras analisadas, nota-se que a média das amostras em 24 horas com inoculação do microrganismo *A. awamori* foi a única que não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao extrato sem inoculo submetido às mesmas condições, com 0,53 mg de proteínas por mL do filtrado enzimático antes de ser colocado no substrato de soja para que ocorresse a biotransformação.

Todas as outras amostras apresentaram constituição de proteínas estatisticamente superiores em relação aos próprios controles (extrato de soja não inoculado e submetido as mesmas condições em relação aos inoculados) e também em relação às amostras inoculadas por 24 horas, na qual apresentaram atividade próxima a 2 mg de proteínas por mL do filtrado enzimático.

Nesse trabalho a inoculação do agente *A. awamori* induziu o processo fermentativo, aumentando estatisticamente a composição nutricional de proteínas de soja. Outros estudos (MORISHITA, 2014; ZHANG, 2018) corroboram com os dados, já que demonstram também valores nutricionais de proteínas de soja fermentada em alimentos tradicionais superiores em relação aos alimentos que não foram submetidos a esse processo, e justificam os resultados pela ação de microrganismos durante a manutenção de processos biológicos vitais à espécie.

Figura 13. Medida da quantidade de proteínas totais em função do tempo de incubação



Os resultados foram produzidos por *A. awamori* em extratos de soja, expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. *p<0,05 vs Controle das amostras correspondente ao tempo em questão. # p<0,05 vs Média da Amostra de 24 h.

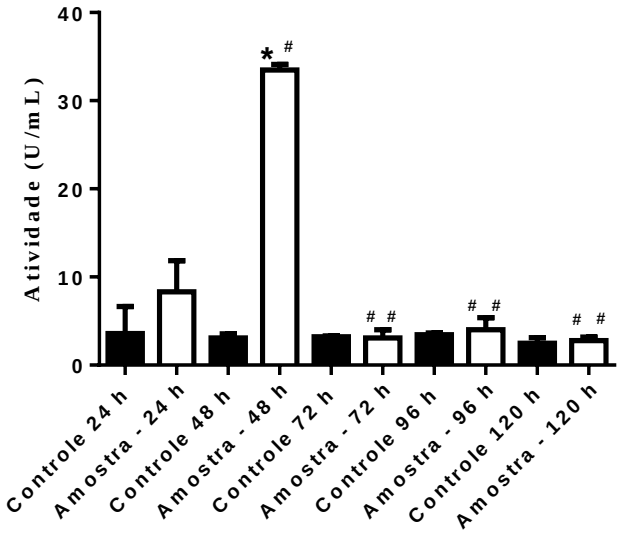
Todas as amostras a partir de período de 48 horas de exposição revelaram constituição de proteínas superior em relação às 24 horas iniciais. As principais enzimas envolvidas no processo de biotransformação são constituídas por composições proteicas, dessa forma, a avaliação da concentração das mesmas é de relevante interesse no estudo das b-glicosidases envolvidas na transformação de isoflavonas gliconas em agliconas (AALBERS, 2019).

4.1.2 Atividade peptidases

Na figura 14 foi obtido o perfil das atividades enzimáticas das peptidases. As amostras inoculadas com 48 horas de exposição foram as únicas que se revelaram superiores em comparação com o seu próprio controle negativo (Controle 48 h). Todas as outras amostras mostraram diferença quando comparadas com a média dos extratos expostos ao *A. awamori* por 24 horas. As amostras de 72, 96 e 120 horas revelaram um perfil de concentração de atividade enzimática inferior, enquanto a média das amostras de 48 horas se mostrou estatisticamente inversa.

Estudos anteriores (SANJUKTA e RAI, 2016; ZHANG, 2018) também destacam o papel de conversão de componentes alimentares por ação enzimática, derivando peptídeos bioativos pós a fermentação da soja por microrganismos. Em um trabalho de Kim e colaboradores (2017), foi possível verificar a produção de peptídeos com atividade entre 0,63 e 6,06 U/g massa seca inicial, de 18 cepas de *Aspergillus* por meio de fermentação em estado sólido em flocos de soja triturados com 72 horas a 30 °C, com 50% de umidade. Convertendo os resultados do nosso estudo, a obtenção de peptídeos originados no mesmo período (72 horas) foi de 8,4 U/g massa seca inicial (média: 2,5 U/mL, original de 21 mL do filtrado enzimático em 5 g de farinha de soja desengordurada), corroborando com resultados encontrados no trabalho citado (KIM et al., 2017).

Figura 14. Medida da atividade de peptidases em função do tempo de incubação



Os resultados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. *p<0,05 vs controle de viabilidade correspondente ao tempo em questão. # p<0,05 vs média da amostra de 24h. ## p<0,001 vs média da amostra de 24h.

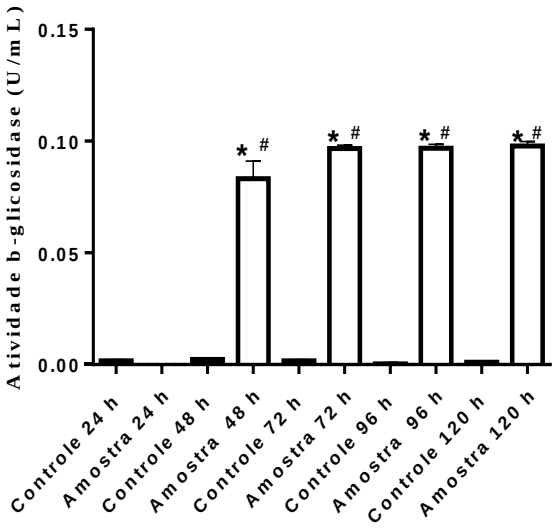
Muito peptídeos podem se acentuar durante reações de hidrólise de proteínas por proteinases. A relação entre constituição total de proteínas, quantificação de atividade de proteinases e peptidases é de considerável relevância para elucidação de parâmetros que podem estar exercendo influência sobre o biocomposto produzido no final do processo fermentativo (ZHANG, 2018).

4.1.3 Atividade b- glicosidase

A Figura 15 apresenta os valores coletados por meio de atividades enzimáticas de b-glicosidase em farinha de soja desengordurada. Muitos estudos (ABDELLA, 2018; HSIAO, 2018; HIRAMATSU, 2020) vêm validando a conversão de isoflavonas glicosiladas em agliconas de soja em produtos fermentados por essa enzima. Dentre as amostras analisadas, nota-se que as amostras em 24 horas, com inoculação do microrganismo *A. awamori*, foi a única que não apresentou diferença significativa em relação ao extrato sem inóculo submetido às mesmas condições, com aproximadamente 0 atividade enzimática (U) por mL do filtrado enzimático, antes de ser colocado no substrato de soja para que se ocorra a biotransformação. Lima (2003) também obteve um resultado similar a esse estudo, em que comparou atividade de b-glicosidases em diferentes extratos vegetais, reportando que a atividade média da enzima de soja foi de 0,02 U/mL em menos de 24 horas, enquanto que em outros vegetais (lentilha, milho e ervilha) apresentaram metade desse resultado.

Todas as outras amostras apresentaram atividades enzimáticas superiores em relação os próprios controles (extrato de soja não inoculado e submetido as mesmas condições em relação aos inoculados) e também quando comparadas com as amostras inoculadas por 24 horas, na qual apresentaram atividade entre 0,083 a 0,097 U/mL do filtrado enzimático. No trabalho de Lee (2019), foi possível detectar um aumento de 75% da atividade de enzimas b-glicosidases entre o início da fermentação em soja e o estágio de 72 horas da mesma. Entre a composição inicial de 72 horas e final de 144 horas o aumento observado foi de 59% da atividade da b-glicosidase.

Figura 15. Medida da atividade de b-glicosidases em função do tempo de incubação



Os resultados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. *p<0,05 vs controle de viabilidade correspondente ao tempo em questão. # p<0,05 vs média da amostra de 24h.

Em trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016) na qual também estamos usando como ferramenta para padronização de métodos, foi possível desenvolver um plano de trabalho baseado na presença dessa enzima na junção extrato soja + inoculado de *A. awamori* e da sua atividade catalítica de quebra de açúcar de moléculas glicosiladas. É necessário quantificar a atividade enzimática para o estabelecimento das mesmas condições anteriores e posteriormente a checagem dos resultados desse projeto.

A amostra escolhida para extração de enzimas b-glicosidases com maior atividade enzimática em menor tempo de exposição ao *A. awamori* foi de 48 horas. Todos os filtrados enzimáticos com mais de 48 horas de fermentação apresentaram atividade superior ao filtrado com 24 horas, porém é necessário observar que a otimização de um processo se dá pela praticidade, economia e potencialização dos resultados. Dessa forma, ao apresentar diferença entre o filtrado de 48 horas e o seu controle negativo, ele representa um perfil indicado para o processo, visando a otimização do projeto e a potencialização dos recursos envolvidos.

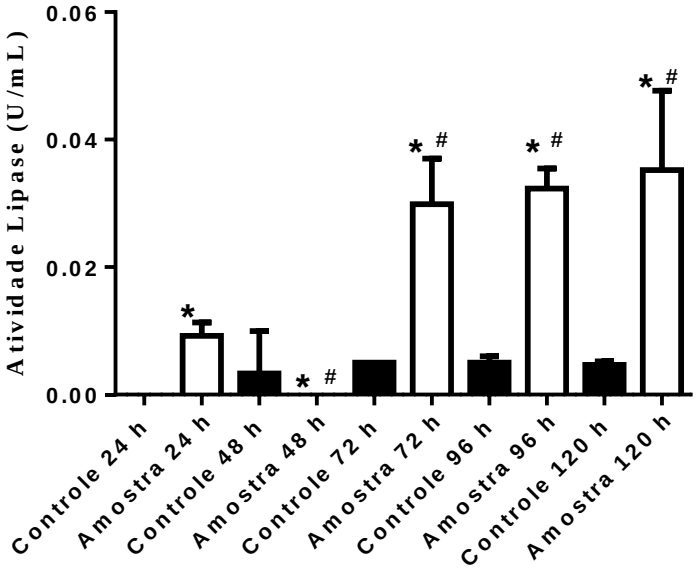
4.1.4 Atividade lipase

Na Figura 16 é possível observar o perfil das atividades enzimáticas de lipases. Todas as médias das amostras inoculadas se diferenciam em relação aos seus controles negativos, sendo que

as amostras de 48 horas apresentaram atividade inferior ao seu controle e as amostras de 72, 96 e 120 horas superior. As amostras de 48, 72, 96 e 120 horas apresentaram diferença em relação as amostras expostas o inóculo por 24 horas.

Muitos trabalhos demonstraram melhores atividades de lipases de soja em óleo (ZHENG, 2016; SOUZA, 2019), porém no nosso estudo o extrato de soja foi desengordurado a fim de evitar degradação do bioativo de interesse por interferência de outras enzimas adicionais, como a lipase. No trabalho de Souza (2019), enzimas apresentaram atividade enzimática em torno de 11, 67 U/mL em menos de 24 horas, comprovando a eficiência da eliminação da maior parte da fração lipídica do nosso estudo.

Figura 16. Medida da atividade de lipases em função do tempo de incubação



Os resultados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. *p<0,05 vs controle de viabilidade correspondente ao tempo em questão. # p<0,05 vs média da amostra de 24h.

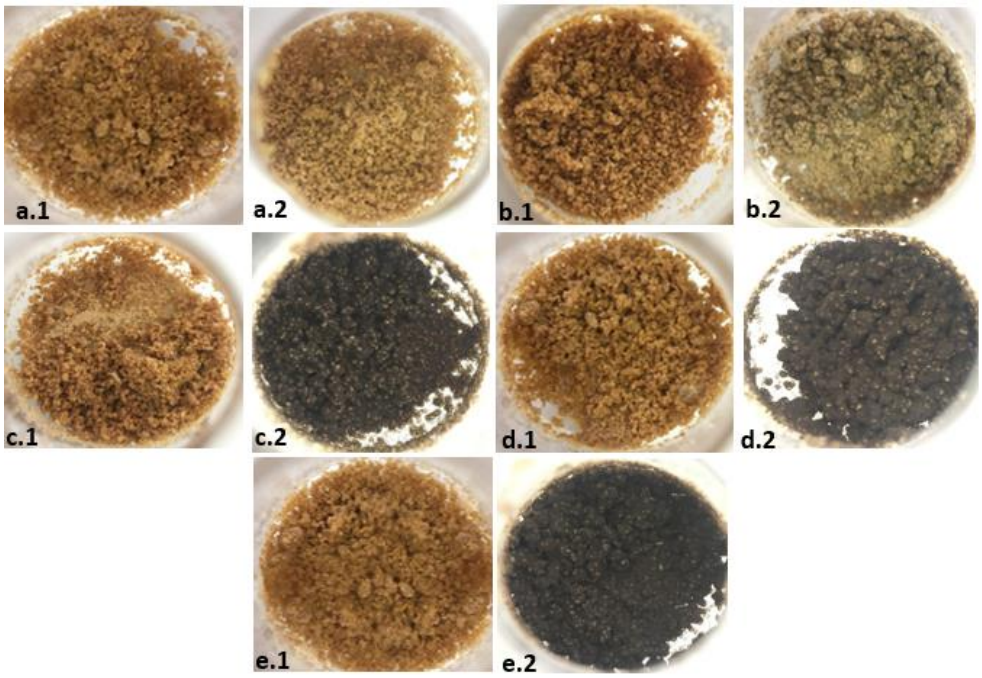
A diferença das atividades lipídicas entre os controles e as amostras são de extrema importância. A amostra escolhida para extração de enzimas e, consequentemente, biotransformação de um novo extrato de soja foi a amostra de tempo de 48 horas. A mesma apresenta atividade lipídica inferior ao próprio controle e a amostra de 24 horas, o que é de grande relevância para a inoculação, já que o controle de parâmetros que possam interferir no processo enzimático pode modificar o resultado final e as concentrações do biocomposto desejado, por meio

de reações cruzadas. Dessa forma, o perfil encontrado nas amostras de 48 horas se torna o indicado para o processo, visando a minimização de danos secundário ao objetivo final do estudo.

4.2 Obtenção dos extratos de soja

Para a realização do projeto seguiu-se protocolos pré-estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa. Foram observadas mudanças organolépticas e químicas das amostras (Figura 17). O pH do filtrado enzimático foi aferido antes da inoculação (Tabela 4) e foram obtidos três diferentes extratos vegetais, na imagem a seguir (Figura 18) apresentado o perfil dos compostos utilizados em todos os ensaios realizados neste trabalho.

Figura 17. Perfil dos extratos de soja após inoculação



A imagem acima destaca os cinco tempos de exposição ao microrganismo *A. awamori*. **a.1**, Controle negativo com 24 horas; **a.2**, Extrato de soja com 24 horas de incubação com o fungo; **b.1**, Controle negativo com 48 horas; **b.2**, Extrato de soja com 48 horas de incubação com o fungo; **c.1**, Controle negativo com 72 horas; **c.2**, Extrato de soja com 72 horas de incubação com o fungo; **d.1**, Controle negativo com 92 horas; **d.2**, Extrato de soja com 92 horas de incubação com o fungo; **e.1**, Controle negativo com 120 horas; **e.2**, Extrato de soja com 120 horas de incubação com o fungo.

O pH (Tabela 4) dos filtrados enzimáticos foi obtido de modo a se especificar a acidez ou basicidade do filtrado enzimático e a sua variação conforme o tempo. Os resultados obtidos no controle negativo das amostras não expressam diferença entre si em relação ao tempo. Em relação

às amostras, houve variação de pH, na qual o filtrado enzimático com 24 horas de exposição apresenta semelhança estatística entre os filtrados enzimáticos de 96 horas e 120 horas, porém se diferencia dos filtrados de 72 e 96 horas. Os filtrados enzimáticos com 96 e 120 horas possuem similaridade estatística com os filtrados de 24, 48 e 72 horas.

Tabela 4. Valores de pH nos filtrados enzimáticos.

Tempo (horas)	pH Controle*	pH Amostras*
24	6,330±0,010[a]	6,033±0,029[a*]
48	6,350±0,024[a]	5,377±0,208[b]
72	6,250±0,011[a]	5,717±0,085[b]
96	6,340±0,012[a]	6,093±0,253[ab]
120	6,260±0,001[a]	5,940±0,053[ab]

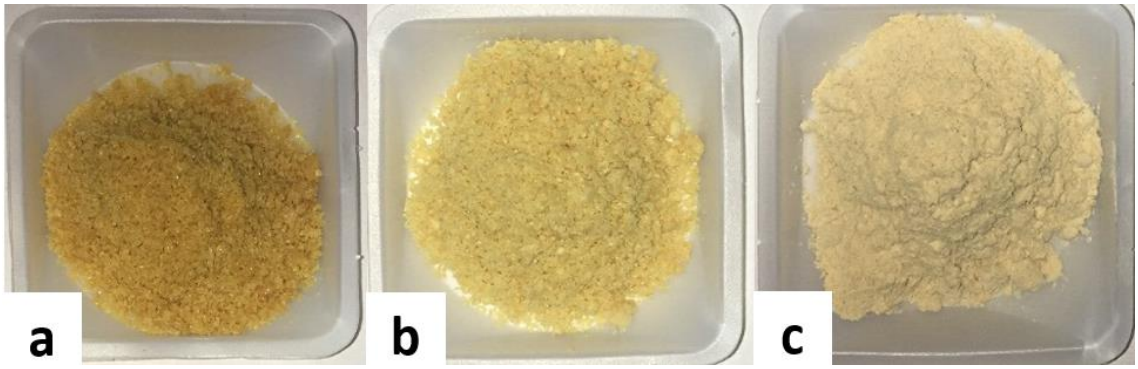
* Resultados expressos por média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As letras iguais na mesma coluna não diferiram significativamente entre si nos testes de Anova e Tukey (nível de significância da análise quando p <0,05).

Se tratando de uma fermentação semi-sólida, muitos fatores dificultam o controle do pH no substrato. Os pHs foram obtidos e aferidos no momento da extração das enzimas e foram modulados pela ação do microrganismo inoculado, que demonstram regulação genética do sistema que atua por meio de uma família conservada de fatores de transcrição Pac C / Rim101 para controlar a expressão de um subconjunto de genes regulados pelo pH. Esse sistema é muito encontrado no gênero dos fungos *Aspergillus* (BIGNELL, 2005). As medições nas amostras apresentaram similaridade estatística dos pHs nos tempos iniciais e finais do processo, demonstrando a ativação desse mecanismo para homeostasia microbiana.

Segundo a literatura, a atividade enzimática de b-glicosidase capaz promover a biodisponibilidade de isoflavonas agliconas possui pH ótimo entre 5 e 6. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que durante o período de 48 horas o pH das amostras estava dentro dos limites indicados como eficiente para que possa ocorrer a biotransformação. Uma semipurificação é observada nesse contexto, o pH nesse intervalo específico potencializa a ação da enzima e condiciona a produção do composto desejado, garantindo maior concentração de produto e limitando outros intermediários que poderiam surgir fora dessa faixa, tornando o processo mais seletivo e purificado (RAZA, 2020).

O ESNBT (Figura 18 a) foi obtido com rendimento de 6,3%, enquanto que o extrato biotransformado (Figura 18 b) possui rendimento de 5,1%, e o ultimo extrato mostrado na Figura 18.c é o comercial, adquirido em farmácias de manipulação.

Figura 18. Perfil dos extratos de soja



(a) Extrato de soja biotransformado por enzima; (b) Extrato de soja não biotransformado; (c) Extrato de soja comercial.

Ambos os extratos (a e b) levaram, em média, de 15 a 25 dias para serem fabricados dentro das condições de nossos laboratórios. Sugere-se que em escala industrial, este processo poderia levar de 10 a 12 dias. Os extratos obtidos foram rotaevaporados e liofilizados para obtenção do composto na forma de pó, a fim de livrar a amostra da porção alcoólica, e assim impedir a morte da cultura de fibroblastos, a diminuição da fração de água livre também amplia a viabilidade da amostra e a sua vida de prateleira.

Segundo Pleading e colaboradores (2019), é necessário para otimizar o armazenamento de alimentos que os mesmos portem menos de 15% do teor de umidade água, diminuindo a atividade de água livre (a_w) usada por microrganismos para suprir as suas atividades vitais. Com menores porções de umidade há a prevenção de vários microrganismos que podem estar presentes no meio. Quando cereais com altas taxas de umidade são armazenados antes da secagem, existe o risco de crescimento de mofo, o que pode ser aumentado em temperaturas mais altas. Os cereais devem ser secos da maneira a causar o menor dano possível aos grãos ou produtos derivados dos mesmos. Os nossos extratos submetidos ao liofilizador supre as demandas de baixas concentrações de umidade, potencializando o processo de produção, conforme a literatura sugere.

Em trabalho anteriormente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), foram obtidos rendimentos similares em relação aos ESBT (4%) e aos ESNBT (5,6%). Esses

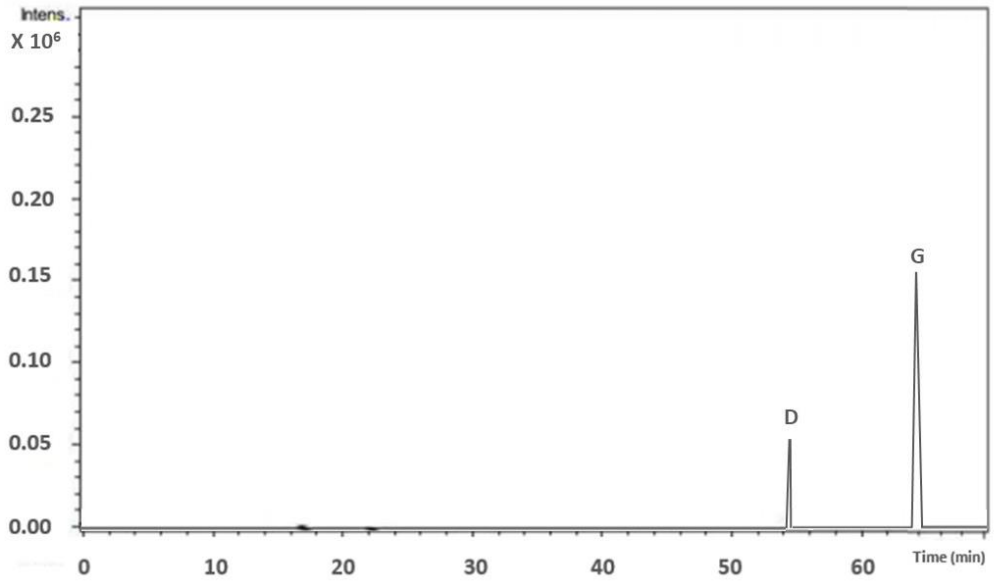
resultados reforçam a padronização do processo, já que os protocolos foram executados da mesma maneira, mudando apenas o material em análise.

4.3 Quantificação das isoflavonas Daidzeína e Genisteína nos extratos de soja

Após a obtenção do melhor filtrado enzimático (48 horas) e inoculação em um novo extrato de soja desengordurado para obtenção do ESBT e ESNBT, os mesmos foram submetidos à quantificação das isoflavonas Daidzeína e Genisteína por meio do processo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As isoflavonas do extrato comercial também foram quantificadas a fim de comparação entre processos laboratoriais e industriais.

A Figura 19 a seguir apresenta picos referentes à presença de Daidzeína e Genisteína, respectivamente, no tempo de retenção aproximadamente entre 54,7 e 64,1 minutos, após injeção dos padrões com 99% de pureza (Sigma®).

Figura 19. Padrão de isoflavonas Genisteína e Daidzeína

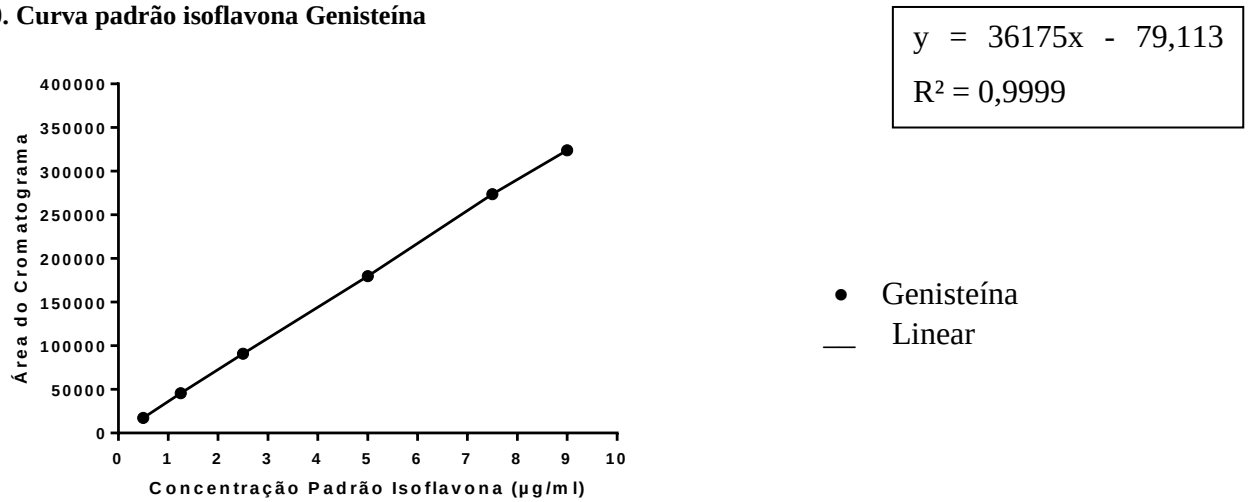


Cromatograma dos padrões (54,723 minutos de retenção em minutos) Daidzeína (D) e (64,125 minutos de retenção em minutos) Genisteína (G), com detecção em 280 nm, injetados na concentração de 5µg/mL.

Para a obtenção dos coeficientes de correlação linear (R^2), foi-se obtida uma curva analítica (figuras 20 e 21) nas quais as concentrações dos padrões industriais de Daidzeína e Genisteína foram 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 9,0 µg/mL plotadas no eixo das abscissas (x) versus altura dos picos no eixo das ordenadas (y). A linearidade do método analítico foi avaliada utilizando-se os

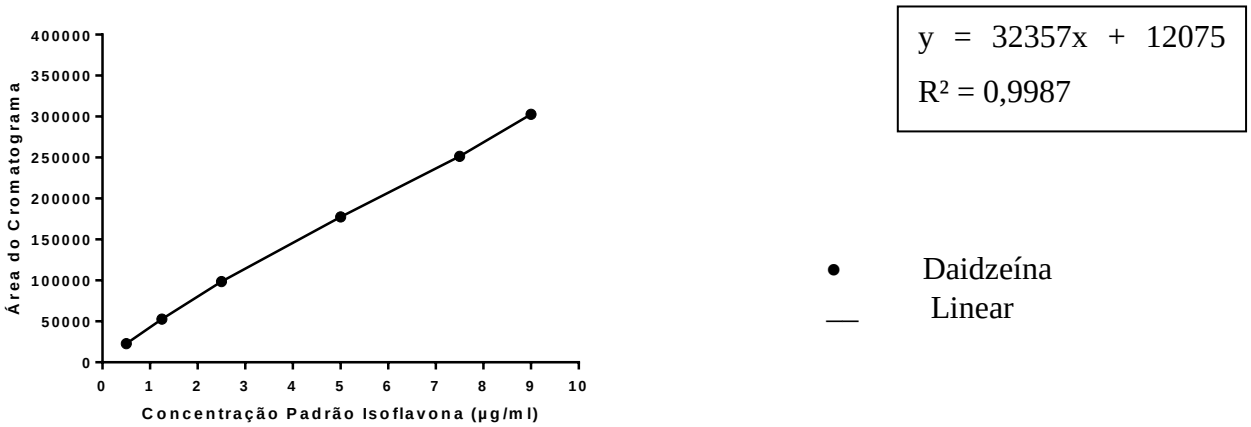
coeficientes R^2 das curvas de calibração, pela correlação das alturas dos picos de Daidzeína e Genisteína em relação as concentrações das soluções dos extratos de soja. Os coeficientes de linearidade com valores obtidos de R^2 foram 0,9999 para Genisteína e 0,9987 para Daidzeína, e segundo padrões analíticos, valores $R^2 \geq 0,99$ são suficientes para assegurar a confiabilidade dos dados de forma adequados (ANVISA, 2003).

Figura 20. Curva padrão isoflavona Genisteína



Equação da reta obtida por meio de variações de concentrações de Genisteína em metanol 80%.

Figura 21. Curva padrão isoflavona Daidzeína



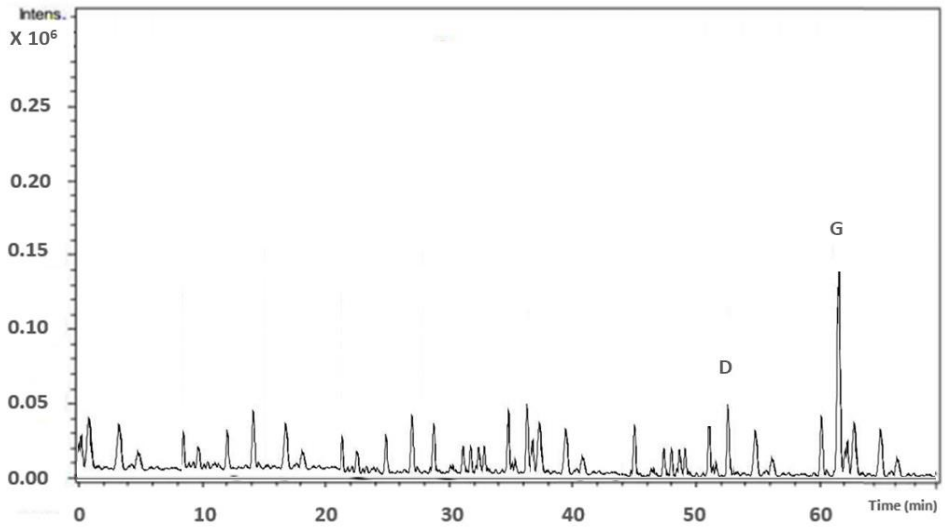
Equação da reta obtida por meio de variações de concentrações de Genisteína em metanol 80%.

A identificação dos picos relativos à Daidzeína e Genisteína nos extratos de soja foi efetuada por comparação entre os tempos de retenção dos picos encontrados nos padrões das

isoflavonas (Figura 19). Foram injetadas soluções de 5 mg/mL (Figuras 22 e 23) de cada extrato de soja, visto que o volume injetado foi de 20 µL. O extrato comercial foi injetado na concentração de 15 µg/mL de amostra (Figura 24), por possuir maior concentração de isoflavonas.

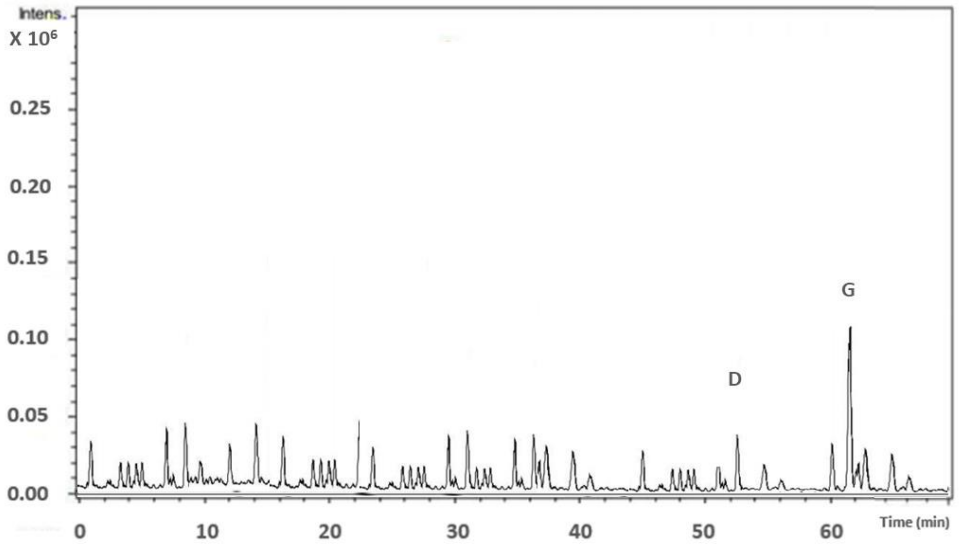
Nas Figuras abaixo (Figuras 22, 23 e 24), podemos observar o perfil cromatográfico de cada extrato com destaque para os picos de Daidzeína e Genisteína (**D** e **G**).

Figura 22. Cromatograma de Extrato de Soja Biotransformado (ESBT)



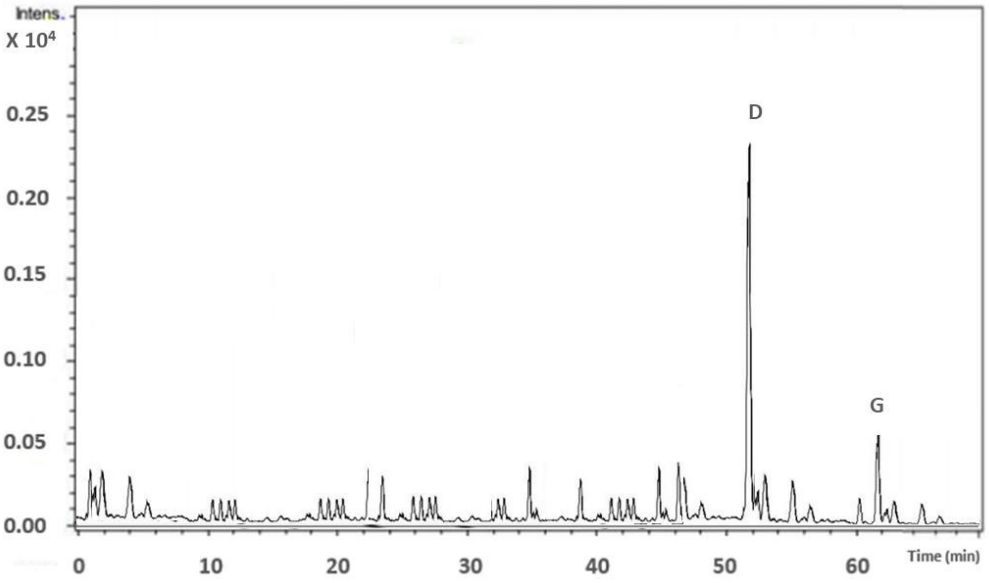
Cromatograma da análise do ESBT, com detecção em 280 nm. Daidzeína (D) e Genisteína (G), injetado na concentração de 5µg/mL.

Figura 1. Cromatograma de Extrato de Soja Não Biotransformado



Cromatograma da análise do ESNBT, com detecção em 280 nm. Daidzeína (D) e Genisteína (G), injetado na concentração de 5 µg/mL.

Figura 24. Cromatograma do extrato de soja comercial



Cromatograma de extrato de soja comercial, com detecção em 280 nm. Daidzeína (D) e Genisteína (G), injetado na concentração de 3 µg/mL.

As Figuras demonstram que o extrato de soja não biotransformado possui menor concentração das isoflavonas Daidzeína e Genisteína (Figura 23), já que as amostras inoculadas por filtrado enzimático possuem concentração adequada de enzimas b-glicosidases, liberando compostos livres, sem a presença da molécula de glicose em sua estrutura. A atividade enzimática dessa enzima justifica o perfil observado por promover hidrólise das ligações b-glicosídicas das formas glicosiladas das isoflavonas. Estudos HÜSER (2018), destacam a importância da hidrólise enzimática para os fitormônio e a potencialização de suas muitas propriedades naturais terapêuticas da soja.

Os picos do extrato de soja comercial visualmente apresentam discrepância entre os dois compostos identificados (**G** e **D**) pois estão em proporções diferentes, 37,67% do composto total do extrato é constituído de Daidzeína e 0,26% de Genisteína, dessa forma o composto Daidzeína, não só visualmente, parece maior que o pico de Genisteína, como também se encontra quimicamente relacionado com essa proporção.

Alguns outros estudos (CHEN, 2015; KULKARNI, 2017; HSIAO, 2018) ainda indicaram medidas para potencializar a atividade de b-glicosidases em alimentos à base de soja, como o aquecimento do extrato a 90 °C por 1 hora, manipulação de estrutura cristalina do mutante nucleófilo TnBgl1A-E349G e estudos para revelar resíduos interagindo com substrato, ou ainda exposição do composto à ambientes extremamente ácido (aumento de 40,76% da concentração de compostos agliconas), nas quais todos tiveram resultados satisfatórios.

Avaliar a possibilidade de converter isoflavonas presentes em extrato de soja utilizando sistema contendo enzima b-glicosidase é de extrema importância, Chen et al. (2016) estudou o estabelecimento de um sistema catalítico para enriquecer agliconas de isoflavona no leite de soja preto, possibilitando a imobilização da enzima. Eles perceberam que a quantidade de isoflavonas glicosiladas (Daidzína e Genistína) diminui enquanto que a concentração de isoflavonas agliconas (Daidzeína e Genisteína) aumenta, o conteúdo de aglicona no total de isoflavonas foi enriquecido em 67% em 30 minutos.

Com a equação da reta obtida nas curvas padrões de Daidzeína e Genisteína (Figuras 20 e 21), foi possível quantificar as isoflavonas nos extratos de soja conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Concentração de Daidzeína e Genisteína nos extratos de soja

Extratos	Genisteína		Daidzeína	
(5 mg/mL)	(mg/g)*	µg/mL	(mg/g)*	µg/mL
Biotransformado	1,77±0,01[a]**	8,86±0,01[a]	1,26±0,02[a]	6,30±0,01[a]
Não Biotransformado	1,41±0,02[b]	7,09±0,01[b]	0,81±0,02[b]	4,05±0,01[b]
Comercial	0,14±0,01[c]	96,42±0,01[c]	8,44±0,02[c]	5626,36±0,01[c]

Os extratos de soja foram diluídos em 80% de metanol nas concentrações de 5 mg/mL, exceto o extrato comercial, no qual foi utilizado na concentração de 0,015 mg/mL, sendo que o extrato estava na concentração de 0,26% Genisteína e 37,67% Daidzeína. * mg de isoflavonas/grama de extrato seco. ** Resultados expressos por média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As letras iguais na mesma coluna não diferiram significativamente entre si nos testes de Anova e Tukey (nível de significância da análise quando $p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, os ESBT e ESNBT apresentam uma constituição de Genisteína e Daidzeína diferente entre si, tanto para porção de massa de isoflavonas/massa do extrato seco, quanto para massa de isoflavonas/volume da diluição.

As comparações dos ESBT e ESNBT em relação ao extrato comercial apontam diferenças motivadas pela composição das isoflavonas totais, na qual 26% corresponde a Genisteína e 37,67% Daidzeína. Estudos desenvolvidos em amostras de sangue coletadas da veia portal em ratos Wistar apontam concentração máxima, após consumo de extrato de soja, de 2,68 µg/mL para genisteína e de 0,4 µg/mL de extrato de soja no plasma dos animais (STEENSMA et al., 2006). Segundo o guia de orientação do extrato comercial, aconselha-se o uso oral nas dosagens de 40 a 160 mg ao dia, divididos em 2 tomadas para a metabolização ideal dos compostos.

Foi usado como instrumento de comparação os resultados anteriormente obtidos de nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), na qual foi possível observar Genisteína 1,678 mg de isoflavonas/grama de extrato seco e 8,39 µg isoflavona/mL; Daidzeína 1,462 mg de isoflavonas/grama de extrato seco e 7,31 µg isoflavona/mL submetido ao mesmo processo de biotransformação, utilizando apenas o material vegetal diferente. Nesse projeto a nossa biotransformação resultou em uma constituição de Genisteína (µg/mL) superior estatisticamente em 5,27%, comparado com o trabalho de Stocco para extratos biotransformados.

O filtrado enzimático com b-glicosidase induz a hidrólise para transformar a forma glicosilada das isoflavonas da soja, Daidzina e Genistina, em formas agliconas, Daidzeína e Genisteína. Nesse estudo o processo foi similar em relação ao trabalho de Stocco (2016), adotando os mesmos protocolos, reagentes e condições (HÜSER, 2018).

Outra hipótese para o perfil elucidado acima é a própria constituição do extrato, nesse material existe um *pool* de enzimas e compostos químicos instáveis que podem alterar constituintes nutricionais do material em estudo. Como anteriormente foi trabalhado com uma cultivar de soja diferente da atual, era esperado que a estabilidade e as interações químicas dos vegetais variassem, já que tanto a síntese e a acumulação de isoflavonas e de outras moléculas ainda é um processo incerto, visto que que as biossínteses são influenciadas por fatores genéticos e ambientais (SUBRAMANIAN et al., 2007).

Vale salientar que em trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa da Prof.ª Dr.ª Maria José Vieira Fonseca (GEORGETTI et al., 2009), nas quais foram realizados ensaios para avaliar as características dos extratos de soja biotransformados por três espécies diferentes (*awamori, niveus e niger*) do gênero *Aspergillus*, foi revelado que o *A. awamori* consegue interagir com outros polifenóis, além da Genisteína, conferindo aos extratos biotransformados maior potencial antioxidante, o que nos levou a trabalhar com o fungo *A. awamori* nesse estudo.

4.4 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos de soja em cultura celular de fibroblastos

Para avaliar a segurança dos extratos de soja, foram realizadas duas técnicas diferentes para o estudo, a análise da viabilidade celular pela técnica do Vermelho Neutro (VN) e análise da exposição da Fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo. Trabalhou-se com a cultura Fibroblastos Dérmicos Humanos (HDF-a) para completar os testes.

A escolha das concentrações dos tratamentos para realizar os ensaios de citotoxicidade foi baseada em estudos realizados em 2006, no qual se avaliou a biodisponibilidade de extrato de soja, Daidzeína e Dadzina em ratos Wistar após a ingestão por via oral de 15 mg/kg de cada composto. Após 15 minutos foi observada a concentração máxima de Genisteína (1,5 µg/mL), enquanto que a concentração máxima do extrato de soja (0,14 µg/mL) foi observada pós 5 horas da administração. A concentração plasmática (24 horas) foi analisada e foi constatado concentração de 2,68 µg/mL para Genisteína e 0,4 µg/mL de extrato de soja no plasma dos animais (STEENSMA et al., 2006). Baseado nesses dados, as concentrações de 500; 100; 50; 10; 5; 1; 0,5 e 0,1 µg/mL foram escolhidas para os testes de citotoxicidade. As concentrações em análise são extraordinariamente maiores do que as concentrações de extrato de soja observadas no sangue de animais após a ingestão via oral, e certamente, ao utilizar em cosmético incorporado com 3% de

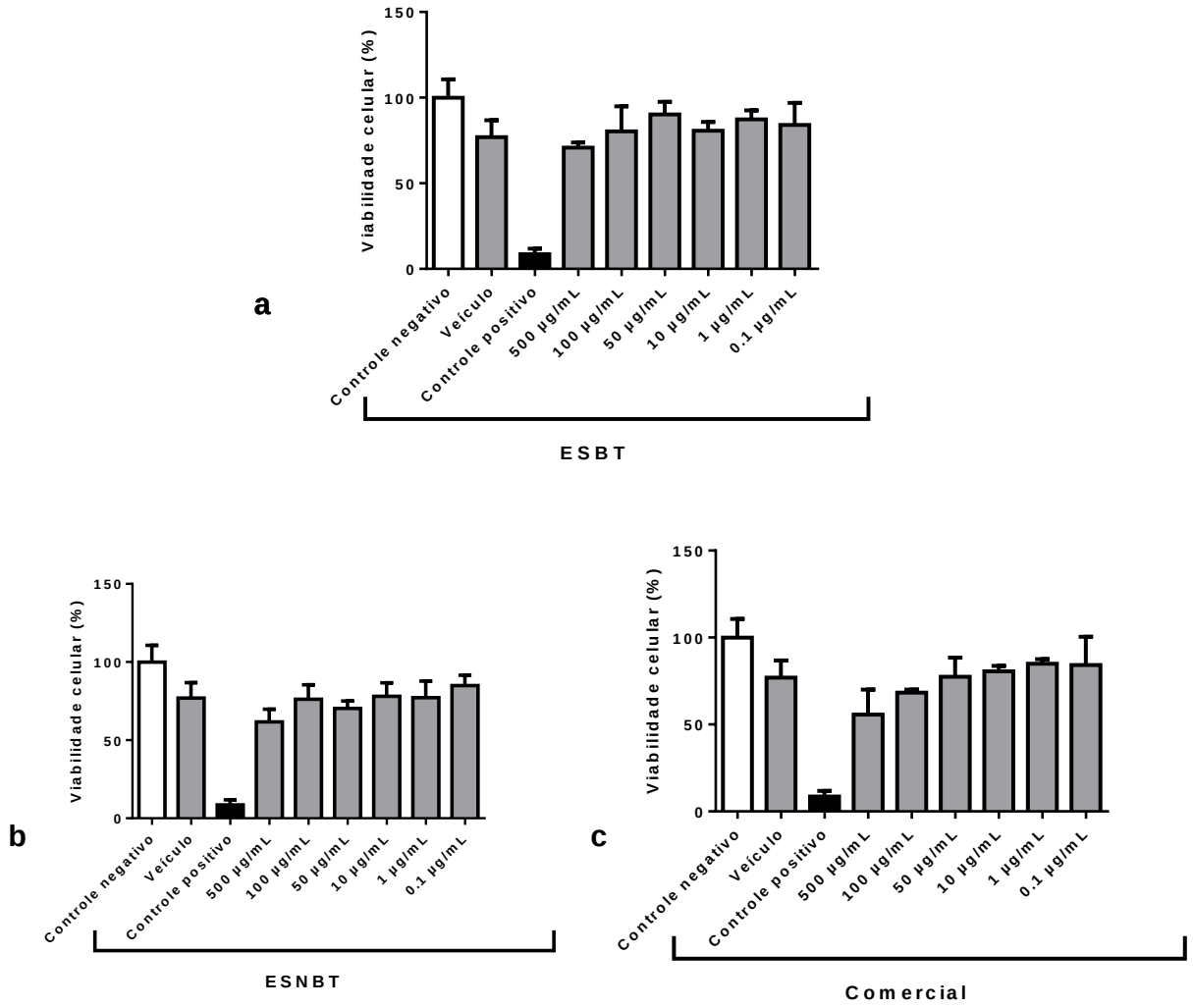
extrato de soja, a quantidade de isoflavonas retida na pele não ultrapassaria as concentrações acima mencionadas.

Essas concentrações também foram testadas em um trabalho anteriormente realizado por nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), e de acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que as concentrações não apresentaram nenhum comprometimento citotóxico sobre as células HDF-a e de L929 (fibroblasto murino de *Mus musculus*). Para prosseguir para as próximas etapas desse estudo, foi necessário verificar se o extrato obtido nesse projeto também não produziria nenhum sinal de citotoxidade prejudicial sobre as células HDF-a.

4.4.1 Análise da viabilidade celular pela técnica do Vermelho Neutro (VN)

A técnica do VN foi utilizada para analisar a viabilidade da cultura de células HDF-a após o tratamento com os ESBT, ESNBT e extrato comercial. O procedimento caracteriza-se pela incorporação do corante vermelho neutro nos lisossomos das células viáveis não injuriadas. À medida que as células começam a morrer, sua capacidade de incorporar o corante diminui (ATES, 2017). Devido à ação antioxidante que as isoflavonas da soja possuem, foi adotado o teste de VN como avaliador de viabilidade celular. Nos ensaios realizados nas células (Figura 25), nenhum dos extratos testados ocasionaram diminuição significativa na viabilidade. O controle negativo adotado se baseou em meio de cultura sem estrógeno e o controle positivo utilizado foi Triton 2% para todas as leituras.

Figura 3. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro



Os resultados foram expressos como média ± SEM de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata com células HDF-a tratadas por 24h com diferentes concentrações de Extrato de Soja Biotransformado (a), Extrato de Soja Não Biotransformado (b) e Extrato de Soja Comercial (c). * $p<0,05$ Controle negativo vs média das amostras em 24h.

Neste trabalho foi possível demonstrar que os ESBT e ESNBT não alteram a viabilidade das células HDF-a, da mesma forma que o extrato comercial de isoflavonas 40% também não demonstrou diferença em relação ao controle negativo. A maior concentração de extrato de soja utilizada (500 µg/mL), a qual possui 42 µg de Genisteína manteve a viabilidade da cultura de células, assim como também os três de extrato de soja em diferentes concentrações, mencionados em estudos recentemente por nosso grupo (STOCCO, 2016).

Após a realização do ensaio de citotoxicidade pela técnica de VN que não demonstrou alteração na viabilidade celular, os dados foram utilizados para triagem na realização do próximo teste descrito na sequência. Um estudo de ŠUŠANÍKOVÁ e colaboradores (2019), foi demonstrado que 0,45 mg/mL de extrato de Genisteína em cultura de fibroblastos (NIH-3T3) não acarreta efeitos citotóxicos. Di Virgílio (2004) detectou em células V79 que a Genisteína induz IC (50) em ensaios de VN com 0,02 mg/mL, enquanto a Daidzeína induziu um aumento entre 0,0062 e 0,025 mg/mL (ŠUŠANÍKOVÁ et al., 2019).

4.4.2 Análise da exposição da Fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo

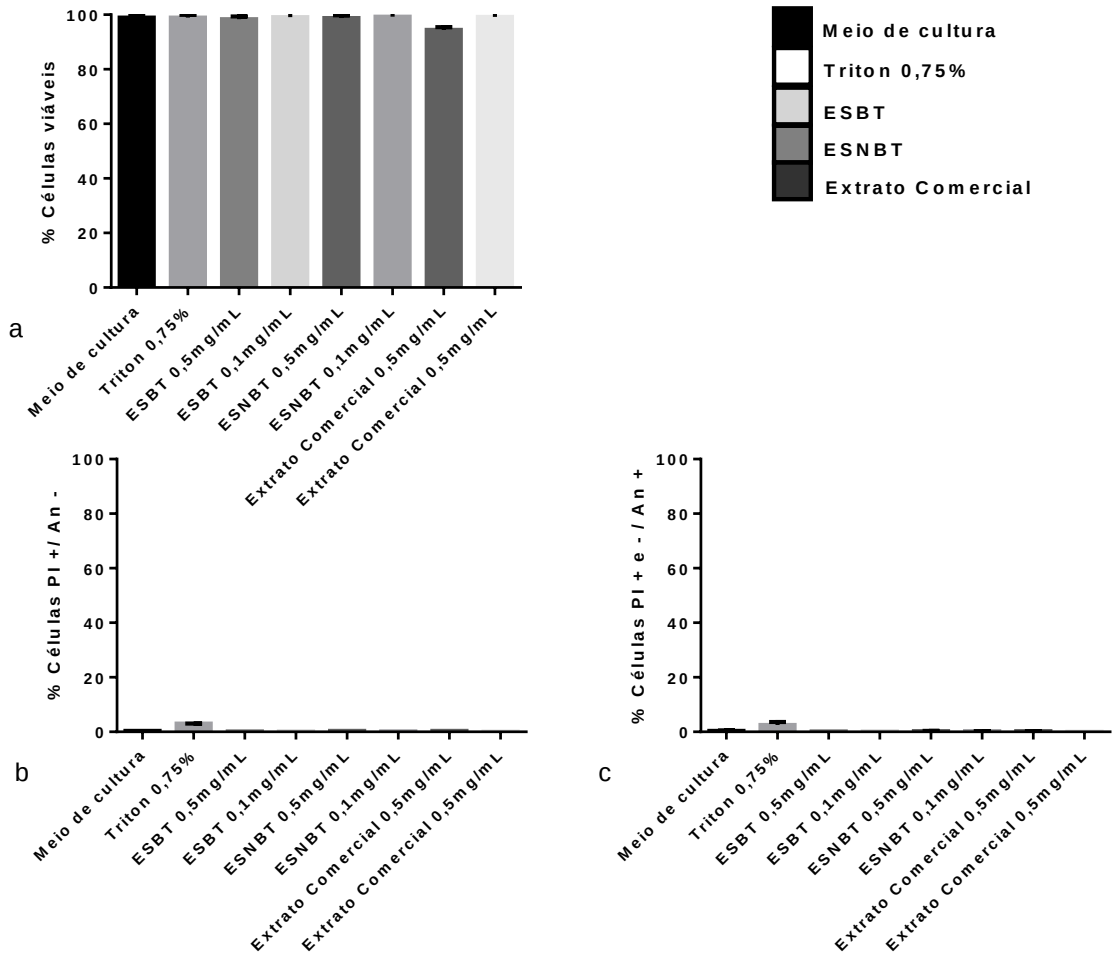
Como a maioria das anexinas, a anexina-V se liga às membranas que expõem fosfolipídios carregados negativamente (fosfatidilserinas externalizadas), devido às suas cargas negativas na presença de íons cálcio (LIN et al., 2020). Estudos demonstraram que a anexina-V exerce papel de proteína extrínseca de membrana plasmática, ativando uma cascata enzimática de sinalização sem precisar penetrar no sistema. Evidências de apoptose nesse sistema de marcação são sinalizadas no momento de translocação da fosfatidilserinas da face interna, na qual ela está presente, para a face externa da membrana celular, somada com a ligação de anexina-V (MOCHIZUKI, 2003).

A anexina-V marcada com fluorescência pode ser usada para detectar as fosfatidilserinas expostas na parte externa das células apoptóticas, dessa forma, também se pode corar células necróticas, já que há a presença de membranas rompidas que permitem que a anexina V acesse toda a parte da membrana plasmática. Pode-se também realizar distinção entre células apoptóticas das células necróticas, por co-coloração com iodeto de propídio (PI), diferentemente das células apoptóticas na qual ele é ausente (CROWLE et al., 2016)

Para esse ensaio, as células foram tratadas com 500 e 100 µg/mL ESBT e ESNBT; e de extrato comercial. Estas concentrações foram definidas com base nos resultados obtidos no ensaio de VN.

Na Figura 26 podemos observar que as concentrações de ESBT, ESNBT e de extrato comercial, previamente determinadas pelo ensaio de VN, não ocasionam morte celular nas células HDF-a. As demonstram que nenhum dos extratos testados foi responsável por favorecer a morte por necrose (PI+ e An-) ou apoptose (PI+ ou – e An+), respectivamente.

Figura 26. Gráficos obtidos com o ensaio da exposição da Fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo



Células da linhagem HDF-a foram tratadas por 24 horas com 500 e 100 µg/mL dos extratos de soja biotransformado e não biotransformado (ESBT e ESNBT, respectivamente) e do extrato Comercial. Os gráficos demonstram a porcentagem de células vivas (a), em processo de necrose (b), em apoptose (c). * $p < 0,05$. Estes resultados são referentes a um n=3 experimentos, onde cada experimento foi realizado com um n= 6 tratamentos.

Concomitante ao ensaio acima, Teixeira e colaboradores (2019) demonstraram que as isoflavonas de soja melhoram a expectativa de vida ovariana em ratas de meia-idade, devido a sua ação como agente antioxidante e antiapoptótico, ao se alimentar os animais com extrato de soja à 150 mg/kg (TEIXEIRA et al., 2019). Em outro estudo de Yusof e colaboradores (2019), foi demonstrado que o NESTE (soja fermentada, enriquecida com nutriente fermentado anaeróbio) não mostrou toxicidade aguda (sem LD 50) até 5000 mg/kg de peso corporal (YUSOF et al., 2019).

Esses estudos corroboram com os resultados dos extratos de análise (soja biotransformada transgênica), já que quando submetida ao processo enzimático de glicosilação de isoflavonas e modificações químicas de outras estruturas presente, podem revelar um papel tanto apoptótico quanto antiapoptótico, sendo modulado pela concentração da aplicação, tanto por meio de ingestão *in vivo* quanto por adição *in vitro*.

Um trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (BEZERRA et al., 2021) demonstrou que extratos de soja não transgênica biotransformado pelo filtrado enzimático do fungo *Aspergillus awamori* não apresentavam atividade citotóxica em cultura de células HDF-a pelos ensaios de VN e de exposição da Fosfatidilserina e da permeabilidade celular por citometria de fluxo, corroborando com os resultados apresentados até o momento (BEZERRA et al., 2021).

Os resultados obtidos neste ensaio para analisar morte celular por necrose ou apoptose estão também de acordo com os resultados verificados nos ensaios de VN. As maiores concentrações de ESBT, ESNBT e extrato comercial não foram capazes de reduzir ou aumentar significativamente a viabilidade celular de fibroblastos humanos. Dessa forma, todos os ensaios realizados com o objetivo de verificar a citotoxicidade dos extratos de soja (item 4.4) demonstram que os mesmos não possuem potencial citotóxico e podem ser adicionados de forma segura em produtos cosméticos.

4.5 Avaliação da atividade estrogênica dos extratos em cultura de células primárias (HDF-a)

Para a identificação da atividade estrogênica, foram elaborados estudos sobre a influência da produção de colágeno em fibroblastos humanos tratados com fitormônios Daidzeína e Genisteína, presentes nos ESBT. Alguns autores (TOKUDOME et al., 2012; SILVA, 2017; IRRERA, 2017; RZEPECKI, 2019) têm demonstrado que alternativas à terapia de reposição hormonal (TRH) com essas isoflavonas apresentam resultados significativos na pele e pode melhorar a hidratação, elasticidade e aumentar a densidade de fibras colágenas.

Nos experimentos descritos a seguir, as células foram plaqueadas em meio de cultura (RPMI), contendo 10% de soro bovino fetal, e após atingirem a confluência foram submetidas ao tratamento, na qual o meio de cultura foi substituído por meio RPMI sem estrógeno para que o hormônio do meio não interferisse nos resultados, visto que a proposta do projeto era avaliar a

atividade estrogênica do extrato. As células foram expostas ao tratamento por 24 horas e então foi realizada a análise.

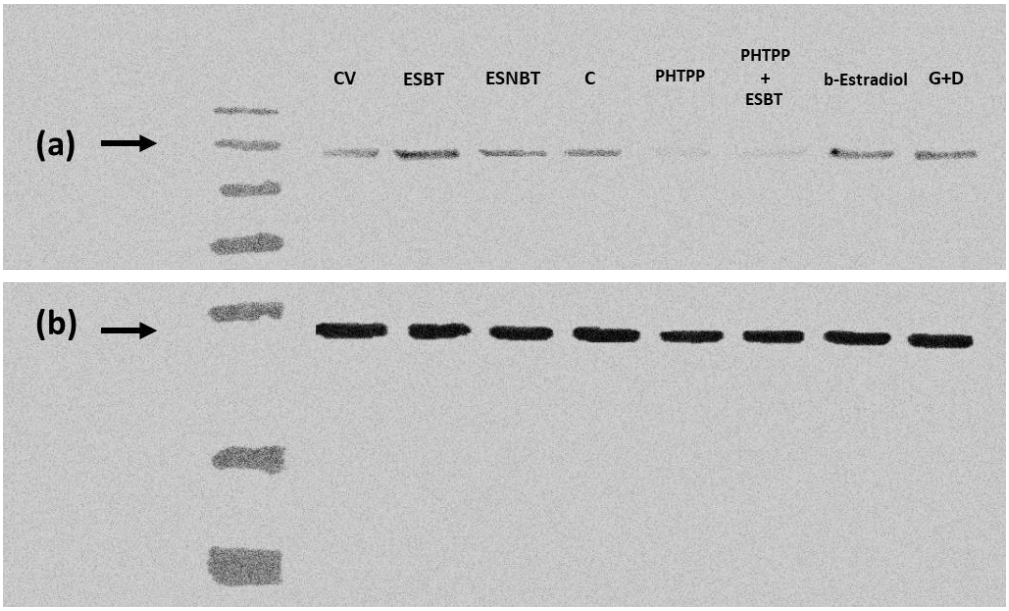
Estudos apontam para o desenvolvimento de moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMS) que estimulam a promoção dos benefícios do estrógeno, minimizando os efeitos colaterais que ocorrem com a interação do hormônio com o receptor. Como já dito anteriormente, a Genisteína é um fitoestrógeno considerado SERM natural, capaz de exercer efeitos benéficos na pele sem promover efeitos colaterais na mama e no tecido uterino, sendo os resultados seguintes extremamente necessários para elucidação desse mecanismo (SAHA, 2019).

4.5.1 Análise da produção de colágeno em fibroblastos primários pela técnica de Western Blotting

Para verificar se o extrato de soja biotransformado transgênico é capaz de estimular a produção de colágeno tipo I em cultura de células nas mesmas concentrações na qual esse trabalho foi baseado, a cultura de fibroblastos foi tratada com ESBT, na qual corresponde à concentração de 2,27 ng/mL de genisteína na amostra. A escolha desta concentração foi baseada no ensaio de permeação e retenção descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016) e em dados da literatura. Além disso, as células da linhagem HDF-a também foram tratadas com ESNBT na mesma concentração do ESBT, e o extrato de soja comercial à 0,023 µg/mL. Outros parâmetros foram analisados, como os tratamentos de Daidzeína + Genisteína (1,9 ng/mL + 2,27 ng/mL), b-estradiol (50 ng/mL), PHTPP (1 µM) e PHTPP (1 µM) + ESBT (2,27 ng/mL de genisteína).

A Figura a 27 demonstra um aumento na expressão do colágeno nas células tratadas com extrato de ESBT, em comparação com os demais tratamentos. A proteína constitutiva tubulina (controle de carregamento) mantém o mesmo nível de expressão para os diferentes tratamentos, o que demonstra que os tratamentos são realmente capazes de modular a expressão do pró-colágeno.

Figura 27. Expressão do colágeno tipo I em células HDF-a



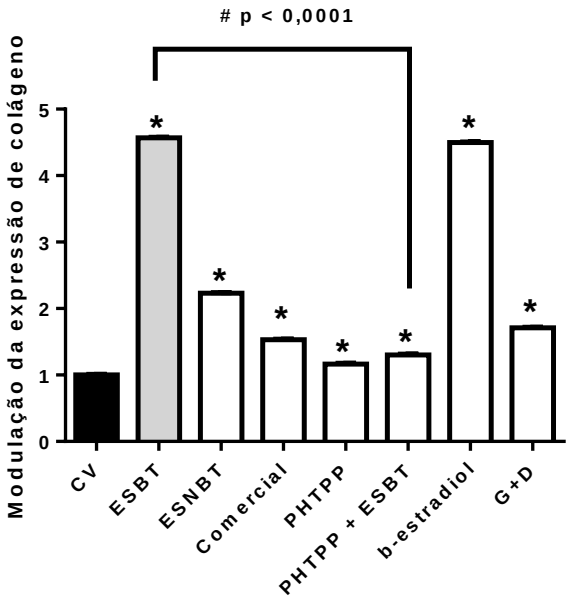
Expressão do Colágeno I em células da linhagem HDF-a após 24 horas de tratamento, com meio de cultura CV = controle de vida; ESBT = extrato de soja biotransformado por fungo; ESNBT = extrato de soja sem biotransformação; C = extrato de soja comercial; PHTPP = Bloqueador; PHTPP+ESBT = bloqueador + extrato de soja biotransformado; b-Estradiol = b-estradiol; D+G = Daidzeína + Genisteína. (a) Expressão de proteína colágeno tipo 1; (b) Expressão de proteína b-tubulina;

Neste ensaio, as células tratadas somente com meio de cultura promovem menor expressão da proteína de colágeno tipo I em relação às células tratadas com ESBT. Este perfil pode ser explicado devido às células do controle de vida serem tratadas com baixa concentração de soro bovino fetal (0,5%), provocando um decréscimo na presença de estrógeno, e assim inibindo a estimulação da produção pelos receptores hormonais ou demais mecanismos. Conforme já foi evidenciado pela literatura, ambientes com menores taxas de estrógeno podem diminuir a expressão de colágeno (DWORATZEK et al., 2019).

A concentração de ESBT contém 2,27 ng/mL de genisteína, concentração ótima para interação com o REb conforme relatado na literatura (KUIPER et al., 1998). Análises realizadas no programa Image J® demonstraram que os controles positivos utilizados neste ensaio (b-estradiol e Daidzeína + Genisteína) provocaram aumento na expressão do colágeno I (Figura 28). Dworatzek e colaboradores (2019) avaliaram o efeito do estradiol em fibroblastos cardíacos, tanto em mulheres quanto em homens, em modelos de roedores e humanos. Eles concluíram que a regulação do colágeno, induzida por estrógeno, também foi detectada tanto em seres humanos quanto em roedores, indicando que essa regulação é conservada em todas as espécies (DWORATZEK et al., 2019). Já Liu e colaboradores (2019) estudaram a produção de colágeno pelos fitormônios, na qual

realizaram um levantamento bibliográfico dos efeitos benéficos da reconstituição tecidual pelo acréscimo de constituintes da MEC, incluindo a proteína de colágeno do tipo I (LIU et al., 2019).

Figura 28. Quantificação do colágeno tipo I em células HDF-a



Colágeno-I quantificado em Células HDF-a tratadas com meio de cultura; ESBT (1,33 µg / mL); ESNBT (1,33 µg / mL); Extrato comercial (0,023 µg / mL); PHTPP (1µM); PHTPP (1µM) + ESBT (1,33 µg / mL); b-estradiol (50 ng / mL), Daidzen + Genisteína (D + G) (1,90 ng / mL +2,27 ng / mL), por 24 h. Dados representam a média ± SEM de três experiências independentes. * p <0,05 vs controle negativo (ANOVA).

O extrato comercial adquirido em uma farmácia popular demonstrou uma constituição de expressão de colágeno superior em relação ao controle negativo. Esse fato pode ser atribuído ao princípio da expressão da proteína perante o estímulo de isoflavonas presentes na sua constituição. O tratamento que envolveu o produto comercial de fácil aquisição foi utilizado de maneira que a concentração de genisteína fosse igual a concentração encontrada no ESBT utilizado para tratar as células. Estes resultados nos levam a sugerir que, apesar do extrato de soja conter diversas proteínas e moléculas ainda desconhecidas, o efeito deste extrato transgênico biotransformado na expressão do colágeno pode ser em grande parte atribuído às isoflavonas Daidzeína e Genisteína presentes no extrato, principalmente a Genisteína.

Neste trabalho o beta-bloqueador foi utilizado como controle negativo e com a intenção de verificar a relação da expressão de receptores de estrógeno com o aumento da produção de colágeno. O PHTPP é um antagonista seletivo de receptor de estrógeno beta e estudos

demonstraram seu efeito antiestrogênico em células T47D de câncer de mama positivas para RE (ZHAO et al., 2014). Um estudo publicado por Mitrengová e colaboradores (2018) demonstrou que a Genisteína é uma molécula promissora que modula o crescimento tumoral e a cicatrização de feridas, podendo promover diversos efeitos benéficos na pele, sendo os mesmos dependentes dos receptores de estrógeno (MITRENGOVÁ et al., 2018). Outro estudo relatou a interação da Genisteína com o REb como um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos deste fitoestrógeno, principalmente nas camadas da derme (HÜSER et al., 2006).

Um trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (BEZERRA et al., 2021) demonstrou que extrato de soja não transgênica biotransformado pelo filtrado enzimático do fungo *Aspergillus awamori* revelou aumento substancial na quantidade de colágeno-I na matriz intracelular de células HDF-a em comparação ao extrato de soja não biotransformado pelo método de Western Blotting, na qual a modulação da expressão de colágeno do tipo 1 para o extrato biotransformado é encontrado em torno de 2, enquanto que no presente projeto se aproxima de 4,5.

Nesse estudo, o PHTPP também exerceu ação anti-estrogênica, visto que as células tratadas com PHTPP + ESBT promoveram menor expressão do colágeno em comparação com as células tratadas somente com ESBT. Desta forma, baseado em dados encontrados na literatura e dos resultados nessa seção, sugerimos que o PHTPP funcione como antagonista dos receptores de estrógeno beta em fibroblastos. A expressão do ESBT provoca um aumento na constituição de colágeno possivelmente por ser mediado via receptor de estrogênio beta. No entanto, devido à ação diferencial na cultura de célula de G+D, é possível propor que outras moléculas contidas no ESBT possam atuar também no REb e na produção eficaz de colágeno. Em contrapartida, existem outras estruturas químicas sem afinidade com RE que podem também interferir no perfil da concentração de colágeneo no tecido, sendo assim necessária uma cuidadosa análise dos constituintes gerais do extrato para um estudo mais otimizado.

4.5.2 Análise do colágeno pela técnica de Imunofluorescência

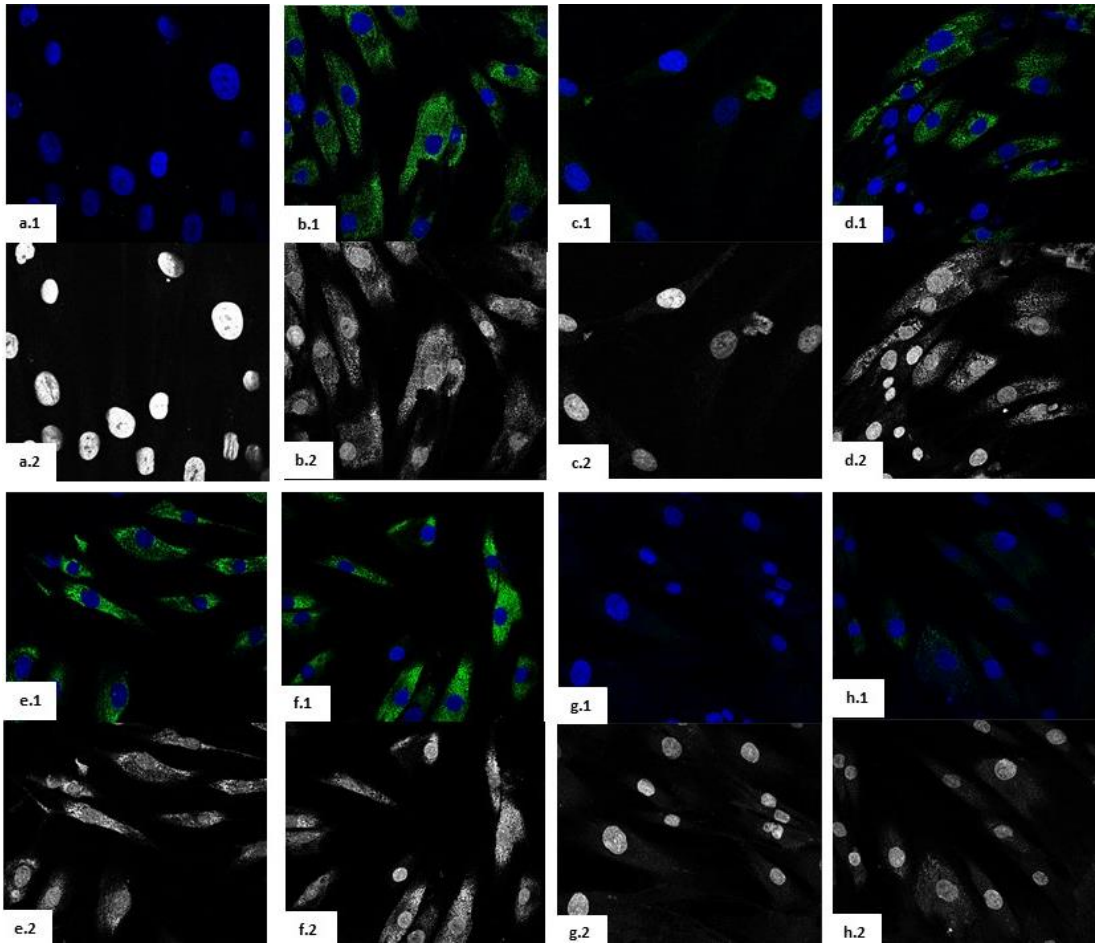
Na Figura 29 as células foram tratadas com extrato de soja nas concentrações de 0,001 mg/mL, 0,002 mg/mL e 0,1 mg/mL de extrato biotransformado, respectivamente à $1{,}044.10^{-3}$, $2{,}088.10^{-3}$ e 0,104 µg de isoflavonas Genisteína, já o extrato não biotransformado foi adicionado às células na concentração de 0,1 mg/mL (Figura 29, c.1 e c.2). Os tratamentos foram expostos por 24 horas, posteriormente foi realizado o ensaio.

Na revelação não foi possível detectar visivelmente a presença de marcadores nas concentrações de 0,001 mg/mL, 0,002 mg/mL do ESBT, portanto só foi apresentado os resultados dos tratamentos com 0,1 mg/mL (Figura 29, b.1 e b.2) de extrato biotransformado (0,104 µg de Genisteína).

Pode-se observar a marcação presente no citoplasma das células da linhagem HDF-a (coloração em verde) na Figura b.1, o pontilhado verde se distribui dentro do citoplasma, também representado na Figura b.2. Os controles negativos **a** (cultura de células apenas com meio de cultura) e **c** (cultura de células tratadas com ESNBT) não apresentam os pontilhamentos. O núcleo das células foi corado com corante azul fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Os controles positivos **e** (células tratadas com b-Estradiol à 50 ng/mL) e **f** (células tratadas com Genisteína à 2,27 ng/mL e Daidzeína à 1,9 ng/mL) apresentaram visivelmente a presença dos marcadores DAPI e Alexa 488, responsáveis por detectar respectivamente núcleo e fragmentos de Colágeno do tipo I. Ao se utilizar os controles de Genisteína e Daídzeína, purificadas, na cultura de células e, consecutivamente, obtidos resultados significativos, pode-se observar que a ação na produção de colágeno pode ter influência das isoflavonas encontradas no ESBT.

Neste mesmo ensaio também foi realizado estudo com o bloqueador de receptor de estrógeno do tipo beta (PHTPP), na qual não foi possível visualizar a marcação do corante Alexa 488, tanto nas Figuras **g** quanto nas **h,** nas quais representam, respectivamente células tratadas apenas com PHTPP na concentração de 1 µM (Figuras g) e células tratadas com o combinado de PHTPP na concentração de 1 µM e, posteriormente a 1 hora, com ESBT 0,1 mg/mL (Figuras g).

Figura 29. Cultura de células HDF-a na microscopia de fluorescência



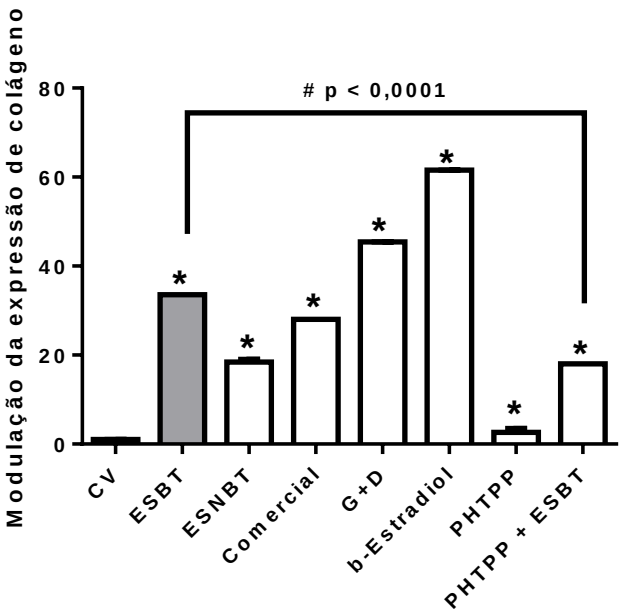
Microscopia de fluorescência em fibroblastos humanos primários (HDF-a) marcados com anticorpo anti pró-colágeno tipo I (verde) e DAPI (azul). Imagens representadas nas mesmas condições de análise, sendo as mesmas acima (.1) mostrando, em verde, o corante para detecção da proteína de interesse e, em azul, o corante DAPI para detecção do núcleo da célula. O negativo das imagens (.2) está localizada na linha à baixo, correspondente a cada representação visual. (a.1) e (a.2) Células apenas com meio de cultura; (b.1) e (b.2) Células tratadas com extrato de soja biotransformado; (c.1) e (c.2), Células tratadas com extrato de soja não biotransformado; (c.1) e (c.2), Células tratadas com extrato de soja não biotransformado; (d.1) e (d.2) Células tratadas com extrato de soja Comercial; (e.1) e (e.2) Células tratadas com Genisteína + Daidzeína; (f.1) e (f.2) Células tratadas com b-estradiol; (g.1) e (g.2) Células tratadas com PHTPP; (h.1) e (h.2) Células tratadas com PHTPP + extrato de soja biotransformado; aumento 40x.

Nessa técnica, a resposta qualitativa é vista em muitos campos da dermatologia para identificação de existência e da localização de estruturas celulares e as possíveis patologias e seus sistemas envolvidos, possibilitando também quantificar numericamente a intensidade de fluorescência obtida de cada condição do nosso estudo (NANASHIMA, 2018). Entretanto a baixa intensidade de fluorescência nas células tratadas com ESNBT (Figura 29 c) é perceptível a olho nu, o que nos sugere uma menor produção de colágeno para estes tratamentos, enquanto o contrário ocorre nos tratamentos com ESBT (Figura 29 b**)**.

Estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016) revelaram o mesmo perfil para as células tratadas com os extratos. A diferença entre a emissão luminosa para o extrato biotransformado em relação ao não biotransformado pelo agente *A. awamori* atestam protocolos pré-estabelecidos e o sistema de biotransformação. No estudo anterior, a droga utilizada como bloqueadora de atividade estrogênica (do tipo alfa e beta) foi o fulvestrant, porém a mesma estimulou a expressão do colágeno. Nesse estudo, foi proposto utilizar um bloqueador de receptor de beta-estrogênio 2-Phenyl-3-(4-hydroxyphenyl)-5,7-bis(trifluoromethyl)-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine,4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol PHTPP), para verificar se a promoção da produção de colágeno se dá realmente pela via receptor-conector, já que os fitormônios, em especial a Genisteína, se ligam à receptores b. Diversos autores já relataram a interação da genisteína com o REb como um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos deste fitoestrogênio, principalmente nas camadas da derme (RZEPECKI, 2019).

Para uma análise mais apurada, os dados qualitativos acima foram convertidos em dados quantitativos utilizando o software ImageJ®. Os resultados estão expressos na Figura 30 abaixo. O colágeno I foi identificado por imunofluorescência, a emissão luminosa foi convertida em pixels e quantificada. A expressão de proteínas na matriz intracelular foi obtida pela comparação entre as células tratadas apenas com meio de cultura (controle negativo) e os outros parâmetros: ESBT (1,33 μg/mL), ESNBT (1,33 μg/mL), Extrato Comercial (0,023 μg/mL), Daidzeina + Genisteína (D + G) (1,90 ng/mL +2,27 ng/mL), b-estradiol (50 ng/mL), Bloqueador PHTPP (1 μM), Bloqueador PHTPP (1 μM) + ESBT (1,33 μg / mL), por 24 horas.

Figura 30. Modulação de proteínas de colágeno I em cultura de células HDF-a na microscopia de fluorescência



Colágeno-I: Quantificação de proteínas em células HDF-a tratadas com ESBT (1,33 µg/mL), ESNBT (1,33 µg/mL), Extrato Comercial (0,023 µg/mL), Daidzeina + Genisteína (D + G) (1,90 ng/mL +2,27 ng/mL), b-estradiol (50 ng/mL), Bloqueador PHTPP (1 µM), Bloqueador PHTPP (1 µM) + ESBT (1,33 µg/mL), por 24 horas. Dados representam a média ± SEM de três experiências independentes. * p <0,05 vs controle negativo; (ANOVA e Tukey teste posthoc).

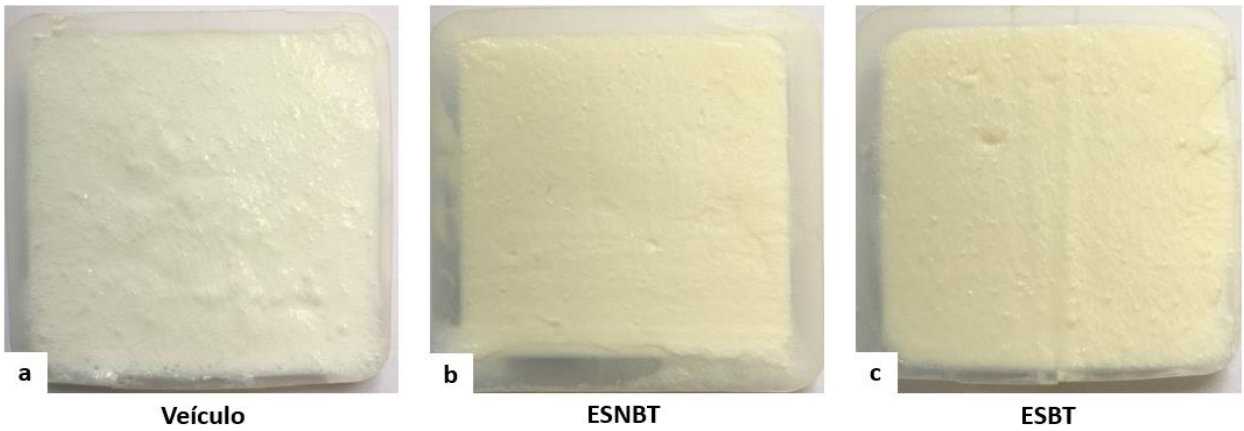
Os resultados revelam que houve aumento da expressão de colágeno em relação ao controle negativo e entre todos os tratamentos. O ESBT na concentração de 1,33 µg/mL foi capaz de aumentar o colágeno I em uma concentração duas vezes maior em relação ao ESNBT. Além disso, o extrato comercial, Daidzeína + Genisteína e o b-Estradiol, foram usados como controle positivo. Houve também diferença entre o ESBT e o PHTPP+ESBT, na qual o primeiro exibiu um perfil de maior concentração de colágeno, esse dado releva a estimulação pelo ESBT da constituição de colágeno pela via REb, já que quando utilizado combinado com o bloqueador teve sua resposta dimunuída em relação a sua utilização sem essa combinação.

O trabalho utilizado como base nessa dissertação (STOCCO, 2016), utilizando extrato de soja biotransformado não transgênico revelou resultados condizentes com os apresentados nessa seção em relação a expressão significativa de colágeno do tipo 1 em cultura de células. O ESBT transgênico em análise foi capaz induzir a produção de colágeno em relação ao controle negativo e superiormente em relação ao ESNBT.

4.6 Análise da produção de colágeno em pele humana

A formulação do tipo creme foi escolhida para o trabalho em razão de estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), na qual foi demonstrada a capacidade de facilitar a permeação das isoflavonas para o líquido receptor, visto que em sua formulação o ácido carboxílico presente na extremidade do ácido esteárico apresenta estreita relação com os constituintes da pele, facilitando a permeação de compostos (CORRÊA, 2010). Na Figura 31 a seguir, pode-se observar que os compostos ESNBT e ESBT foram incorporados ao veículo (a) e assim finalizados para a aplicação (b, c).

Figura 31. Obtenção do veículo (creme) para incorporação dos extratos



A figura representa (a) o creme desenvolvido para o estudo; (b) extrato de soja não biotransformado incorporado ao creme; (c) extrato de soja biotransformado incorporado ao creme;

Enfatizando anteriormente, o desenvolvimento do creme foi baseado em testes preliminares, garantindo estabilidade em relação à temperatura, pressão, perda de água e composição química. Como visto na Figura 31, o aspecto dos mesmos se assemelhou a uma emulsão O/A, com elevado poder de permeação. A parte graxa deste produto (ácido esteárico) reage com a trietanolamina formando o estearato de trietanolamina, atuante como agente emulsivo. A adição de conservantes parabenos (nipagin e nipazol) foi justificada devido à necessidade de prevenir o desenvolvimento de microrganismos, já que os conservantes de ação fungicida são extremamente necessários, devido à alta susceptibilidade à invasão de microrganismos, característica comum em cremes O/A. Segundo Matwiejczuk e colaboradores (2020), o uso de um único cosmético contendo parabenos não deve representar um perigo para a saúde humana, sendo

necessário cautela ao se utilizar concentrações excessivas de preparações cosméticas contendo esses compostos.

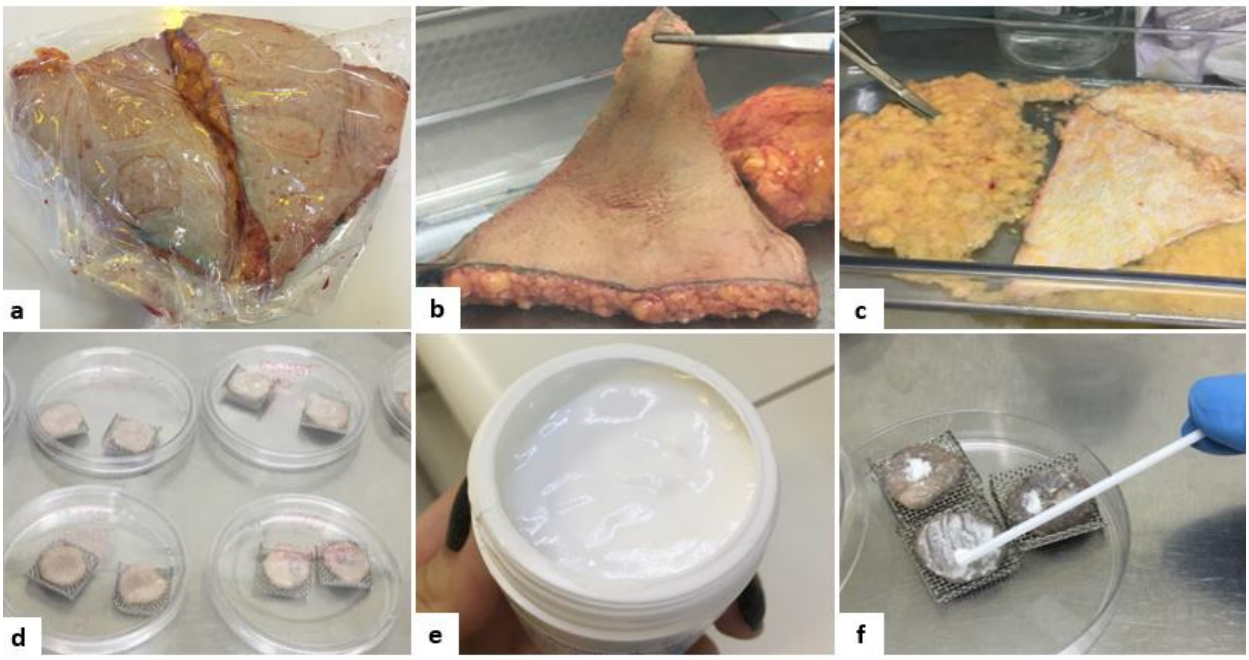
As três formulações desenvolvidas tiverem a mesma concentração (10%) de propilenoglicol, usado em formulações como um co-solvente e /ou para aumentar a permeação do fármaco através da pele a partir de preparações tópicas. Este umectante é capaz de modificar a quantidade de lipídios nas camadas mais profundas, alterando a ordem da estrutura da bicamada para uma estrutura lipídica mais desordenada, favorecendo a penetração e sua ação sinérgica com demais compostos químicos que possuem propriedades promotoras de absorção (CARRER et al., 2020).

Para a realização da próxima etapa do estudo, correspondente à identificação de colágeno tipo 1 em pele humana, pela aplicação do composto em estudo, foi utilizado o modelo de cultura de explante de pele organotípica humana (hOSEC), relatado como um método alternativo promissor para avaliar o perfil de distribuição cutânea de fármacos e cosméticos. Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016), demonstraram a eficácia de permeação de extratos de soja biotransformados em formulações do tipo creme, utilizando como matriz de permeação tecido animal, conduzindo o estudo atual para a etapa de aplicação de extratos e identificação de colágeno em cultura de tecido humano.

Os modelos animais são considerados o "padrão ouro" para determinações de potenciais de produção de biocomposto e estudos de identificação de risco. No entanto, as regulamentações governamentais e as considerações éticas limitam o uso de animais para tais fins. Devido ao exposto e a inespecificidade de ligações por receptores não humanos de estrógeno do tipo beta em tecido animal, responsáveis pela estimulação de produção de colágeno e reconstituição tecidual, que pode gerar resultados falso-positivos comprometendo a veracidade dos dados, o modelo hOSEC é o indicado para a investigação.

Na Figura 32 é possível identificar as etapas de processamento da pele humana (a), submetida às etapas de limpeza (b,c) e ao acondicionamento no sistema de cultura (d) e posteriormente à aplicação do veículo (e) como os compostos em análise (f).

Figura 32. Processamento dos fragmentos de pele humana



O fragmento de pele (a, b) foi separado do tecido adiposo (c) e os explantes foram cortados (2 cm^2) e cultivados em *grids* de aço inox dentro de placas de 90 X 15 mm em contato com meio de cultura (d), mantidos à 37 ºC em estufa com 5% CO_2, para que fosse possível a adição (e,f) do material em estudo.

Segundo Leite e colaboradores (2021), apesar das limitações atuais do modelo hOSEC, a precisão das previsões feitas compara-se favoravelmente com as classificações obtidas com modelos animais comumente usados. Estes resultados são extremamente importantes, pois para que as isoflavonas de soja possam promover seus efeitos benéficos, como por exemplo se ligar aos receptores de estrógeno e estimular a produção de colágeno, devem alcançar a derme e a epiderme, condição atendida desde que submetidas a ambiente que sustente a homeostasia do biomaterial.

Os fragmentos de pele humana, submetidos a cultivo em meio de cultura a 37 °C em 5% de CO_2 com ar umidificado, apresentaram modificações visuais de coloração após o cultivo de 15 e 30 dias em relação aos fragmentos de 0 dias, como visto na Figura 33. De acordo com as pesquisas de Frade de colaboradores (2015), fragmentos de pele cultivados por 75 dias nas mesmas condições do presente estudo apresentaram um afinamento, porém a junção dermoepidérmica foi inalterada e houve proliferação de células. Ao analisar o ensaio imuno-histoquímica, o material em estudo estava semelhante à pele controle, expressando queratinócitos (FRADE et al., 2015).

Figura 33. Fragmentos de pele humana

Imagens representadas nas mesmas condições de análise, sendo as mesmas acima divididas entre fragmentos de pele sem aplicação de creme (CONTROLE), fragmentos de pele com aplicação de creme (VEÍCULO), fragmentos de peles com aplicação de extrato de soja biotransformado incorporado ao creme (ESBT) e fragmentos de peles com aplicação de extrato de soja não biotransformado incorporado ao creme (ESNBT), divididos nos períodos de 0 dias (T0), 15 dias (T15) e 30 dias (T30) de cultivo.

Os fragmentos de tecido foram cultivados no período de 30 dias para que houvesse tempo de estimulação das células excretoras de colágeno e a produção dos mesmos. O tempo de 15 dias foi realizado como período intermediário de investigação. Trabalhos publicados por Kang e colaboradores (2018), demonstraram que o peptídeo de colágeno tem efeitos benéficos nas funções da pele, como hidratação epidérmica após a irradiação ultravioleta B (UVB), sendo possível detectar colágeno. Apesar do modelo hOSEC apresentar algumas limitações, como a falta de inervação e circulação, foi possível estabelecer uma condição para que fosse possível manter o material viável.

4.6.1 Efeito quelante do íon ferro (FRAP) em pele

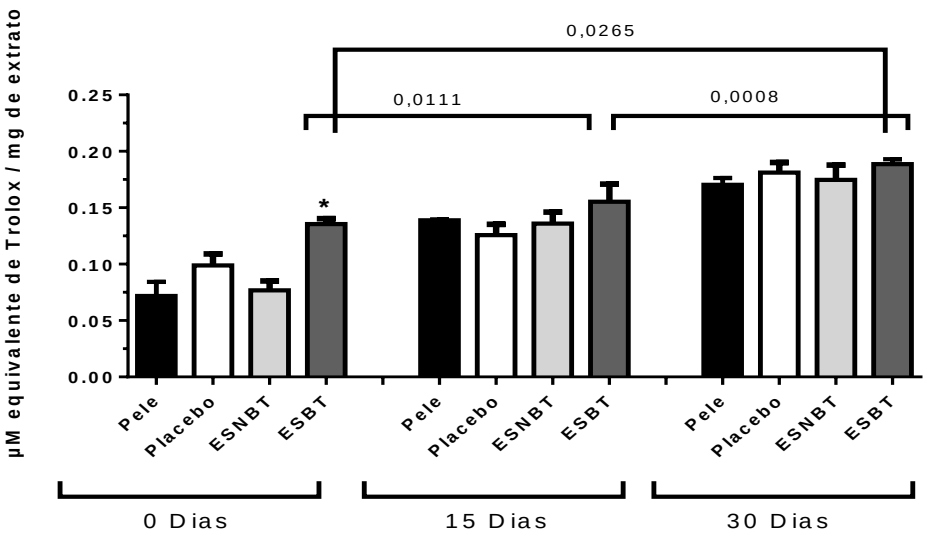
Vários estudos têm mostrado que o aumento da atividade de FRAP reflete diretamente em um aumento na capacidade antioxidante na lesão oxidativa da pele, e que o estresse oxidativo, como estimulação de H_2O_2, irradiação UV ou exposição a cultivos que estimulam essa oxidação, diminuem a concentração de FRAP em queratinócitos ou pele de camundongo. As células da pele podem produzir várias enzimas antioxidantes para combater os efeitos colaterais adversos do estresse. Evidências sugerem que o aumento da deposição de colágeno e a proliferação celular na

pele ocorrem em resposta a estímulos oxidativos. O dano cutâneo induzido pelo estresse oxidativo está associado ao aumento dos padrões de expressão de citoqueratina e à proliferação celular regulada positivamente nas células afetadas (WANG et al., 2020).

Nesse caso, quanto maior a capacidade e a quantidade dos antioxidantes naturais das amostras de pele de interagirem com esse íon, maiores serão os dados de conversão em relação à µM equivalente de Trolox/mg de extrato de pele. Representado na Figura 34, pode-se notar a relação entre o extrato de pele humana tratada com ESBT mantida em cultura de células durante 0 dias comparado com o extrato de pele humana tratada com o mesmo ESBT, também mantida em cultura de células, porem durante 30 dias, que apresentou um aumento significativo de atividade antioxidante por meio da capacidade de produção do íon Fe^{2+} (íon ferroso) formado a partir da redução do íon Fe^{3+} (íon férrico).

Esses resultados podem ser explicados em razão da aplicação do próprio extrato, já que o mesmo possui concentrações de isoflavonas (Genisteína e Daídzeina) superiores significativamente em relação a extratos de soja que não sofreram o processo de biotransformação, como já apresentado nos resultados dessa dissertação (4.3), agindo como agentes antioxidantes.

Figura 34. Efeito quelante do íon ferro (FRAP) em extratos de pele humana



(Os resultados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata com células HDF-a tratadas por 0, 15 e 30 dias com Extrato de Soja Biotransformado (ESBT), Extrato de Soja Não Biotransformado (ESNBT) e o Veículo, além de utilizar pele sem nenhuma aplicação como controle negativo * p< 0,05.)

Nosso estudo demonstrou que houve diferença entre um dos compostos (ESBT) em relação a outros, dentro do mesmo intervalo de tempo (0 dias), revelando uma possível acumulação de isoflavonas, já que esse perfil foi encontrado apenas no fragmento de pele que recebeu a aplicação do ESBT. A ocorrência anterior não foi verificada entre os outros conjuntos de tempo (15 dias e 30 dias), possivelmente pela alta exposição de condições que favoreciam a absorção dos compostos pelo sistema biológico e a utilização dos agentes antioxidantes para a própria homeostasia.

Foi verificada a ocorrência de diferenciação entre as amostras de peles tratadas com ESBT entre os tempos de 0 dias e 15 dias e entre os tempos de 15 dias e 30 dias. Também foi detectado um aumento significativo de maior ação FRAP para as peles tratadas com ESBT expostas há 30 dias em relação à exposição de 0 dias.

De acordo com trabalhos publicados por Frade e colaboradores (2015), na qual explantes cutâneos obtidos em cirurgias foram mantidas em incubadora úmida de CO_2, após 1, 7, 30 e 75 dias de cultura, os resultados baseados nesse estudo revelam que no 30º dia a estrutura cutânea estava inalterada, atestando como uma boa alternativa para testes em animais e testes pré-clínicos, análogo ao teste clínico de pele humana com eficácia e viabilidade semelhantes, comprovadas por análises imuno-histológicas (FRADE et al., 2015); e somado à defesa contra os agentes oxidativos não enzimáticos (como as isoflavonas), além dos antioxidantes naturais da pele, com ação maior em membranas celulares, por ser lipossolúvel.

Estudos de Huang e colaboradores (2010) demonstram que o extrato de isoflavona de soja atua como agente anti-fotoenvelhecimento desejável para o cuidado da pele, na qual a aplicação tópica exibiu efeitos protetores muito maiores sobre o estresse oxidativo induzido por UVB e morte de queratinócitos, revelando ação desejável para o cuidado da pele.

4.6.2 Determinação de proteínas totais

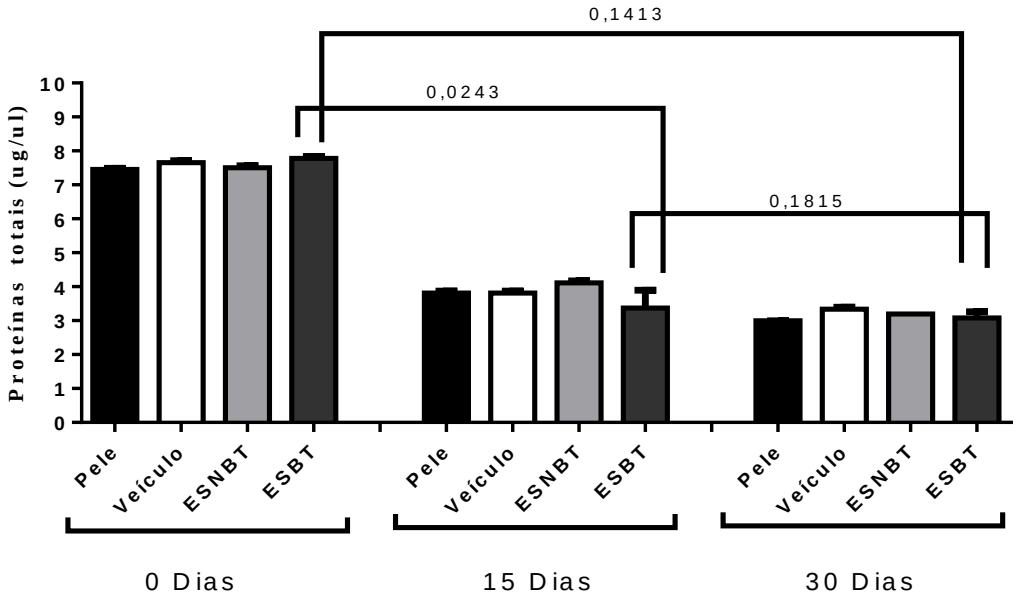
A composição principal da derme é feita de matriz extracelular (MEC) e fibroblastos, e durante o processo de envelhecimento ou degradação tecidual acontecem mudanças significativas, tornando o colágeno, que é o principal componente da MEC, fragmentado e com a sua concentração total diminuída. Devido a esse fato, foi realizada a determinação de proteínas totais nos extratos de pele em estudo nesse trabalho.

Os resultados que podem ser encontrados na Figura 35 revelam que os compostos, dentro dos respectivos grupos de tempo, não apresentam diferença significativa entre si. Ao se comparar

os ESBTs nos três diferentes tempos (0, 15 e 30 dias), é possível detectar que houve apenas uma diferença significativa em relação ao extrato de pele humana tratada com ESBT mantida em cultura de células durante 0 dias comparado com o extrato de pele humana tratada com ESBT, também mantida em cultura de células, porém durante 15 dias.

Nossos dados corroboram com os encontrados com Shin e colaboradores (2019), que descreveram o decrescimento de proteínas na pele, principalmente pelos mecanismos de aumento da atividade das metaloproteinases da matriz e ao comprometimento da sinalização do fator de transformação de crescimento-b induzida por espécies reativas de oxigênio geradas durante o envelhecimento, assim como foi detectado a significativa atividade de FRAP com o passar dos dias, reportado nos item 4.6.1. A redução da quantidade de colágeno dificulta a interação mecânica entre os fibroblastos e a MEC e, consequentemente, leva à deterioração da função dos fibroblastos e diminuição de algumas proteínas estruturais da pele, por mecanismo de degradação (SHIN et al., 2019).

Figura 35. Quantificação de proteínas totais em extratos de pele humana



(Os resultados foram expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em triplicata com células HDF-a tratadas por 0, 15 e 30 dias com Extrato de Soja Biotransformado (ESBT), Extrato de Soja Não Biotransformado (ESNBT) e o Veículo, além de utilizar pele sem nenhuma aplicação como controle negativo * p< 0,05.)

A diminuição da concentração de proteínas totais encontrada nesse trabalho pode ser justificada também pelas evidencias citadas encontradas na literatura. Lowry (2020), demonstra que algumas proteínas se degradem com à deterioração de células com funções básicas relacionadas à homeostasia, acarretando diminuição substancial no número de camadas da pele. Muitos mecanismos que interagem com o DNA podem estar envolvidos no processo de inibição da produção e expressão de proteínas, influenciando vias alternativas de sinalização ativadas por ROS, depleção de ATP, modificações na cadeia de transporte de elétrons e até na desregulação de cálcio nas mitocôndrias (LOWRY, 2020).

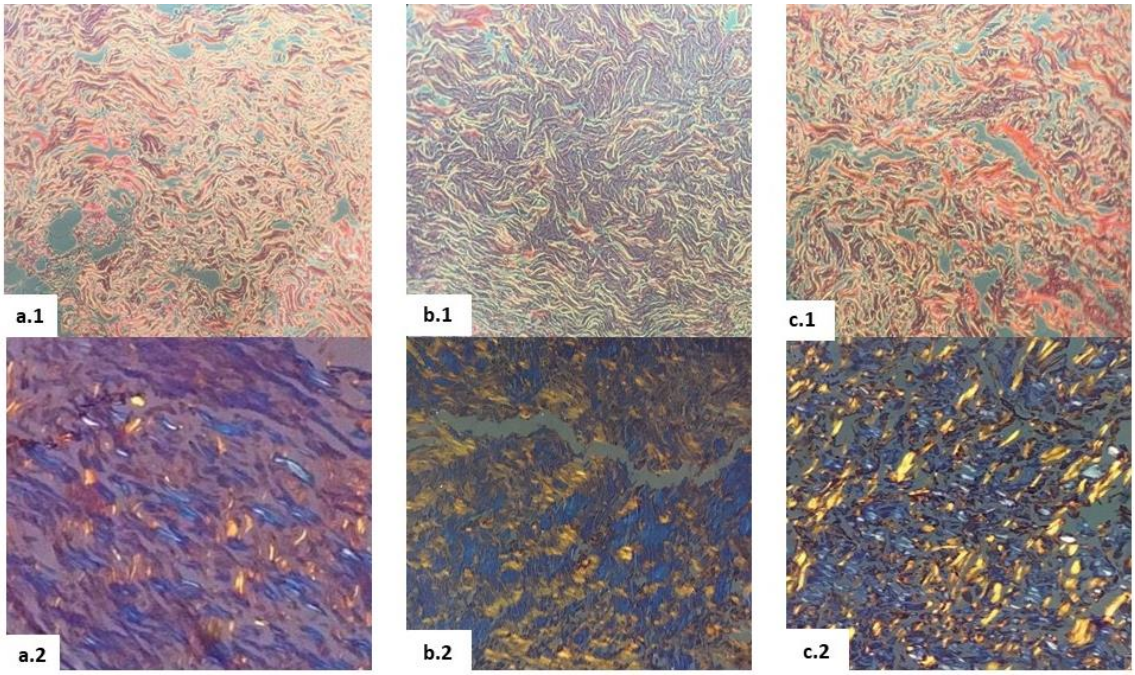
Bukhari e colaboradores (2018) também demonstraram que formulações baseadas em géis, cremes, loção, soro, implantes, entre outros, exibem notável propriedades anti-envelhecimento e rejuvenescimento facial devido ao aumento do tecido mole, melhor hidratação da pele, estimulação de colágeno e elastina e restauração do volume facial (BUKHARI et al., 2018). Nesse item ainda não é possível detectar a atuação específica de proteínas de colágeno estimuladas por ESBT, já que o intuito do presente ensaio é quantificar e apresentar um perfil do tecido em análise e a constituição geral de proteínas, para posteriormente ser possível comparar esses achados com a presença da proteína de interesse. No entanto, vale ressaltar a necessidade de investir em produtos que podem auxiliar componentes lesados ou degradados e retornar ao seu estado natural, mantendo a homeostasia do tecido.

4.6.3 Determinação de colágeno por coloração de lâminas em picrossírius - Hematoxilina em pele

Para a análise de permeação de substâncias na pele, que é um complexo processo e compreende propriedades de difusão e a liberação da substância de dentro da formulação cosmética e a penetração do composto através da pele, o presente estudo utilizou a técnica de identificação de colágeno do tipo I por meio de coloração de lâminas em picrossírius - Hematoxilina em pele humana.

As peles analisadas foram submetidas durante 30 dias de exposição em cultura, utilizando fragmentos de pele sem nenhuma aplicação cosmética (controle negativo), fragmentos de pele tratados apenas com o veículo da formulação (creme) e fragmentos de pele tratados com ESBT no veículo. As amostras foram fixadas em lâminas e os resultados são os apresentados na Figura 36.

Figura 36. Identificação de colágeno 1 em extratos de pele humana



Micrografias em luz polarizada de amostra de pele humana, evidenciando, em laranja, o colágeno tipo I (Picrosirius Red), em lâminas contendo (a) apenas pele humana; (b) pele humana com veículo; (c) pele humana com extrato de soja biotransformado transgênico incorporado ao veículo; aumento 40x. As imagens .1 representam a micrografia sem luz polarizada, enquanto as micrografias .2 apresentam a captura sob o filro de polarização.

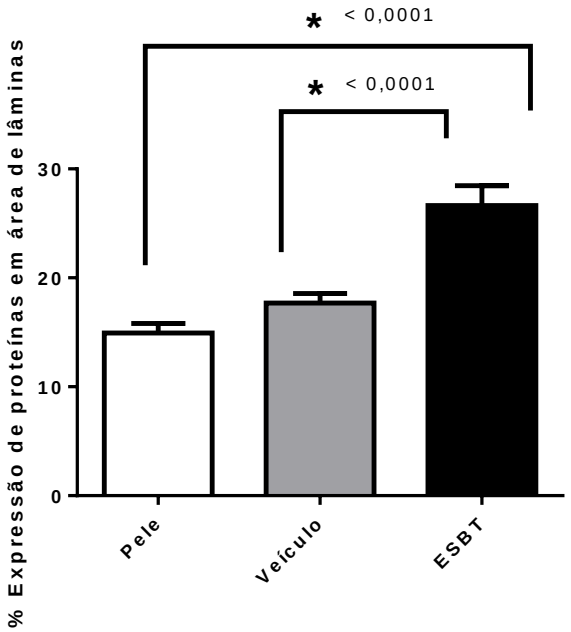
A camada superficial da pele, conhecida como extrato córneo, constitui a primeira barreira de absorção de compostos tópicos e à perda de água, sendo também o local que primeiro entra em contato com a formulação cosmética desse trabalho. A epiderme viável é a responsável por interligar e regenerar o extrato córneo, enquanto que a derme funciona como local de deposição de colágeno, fibras elásticas e ácido hialurônico, alvo de análise para o presente estudo (SOLÉ-BOLDO et al., 2020).

As imagens adquiridas da microscopia foram analisadas pelo programa Image J®, para a seleção das áreas pertencentes aos colágenos tipo I. Na Figura 36 a, tem-se a seleção da área correspondente ao colágeno tipo I de 14,94%, em b, tem-se a seleção da área correspondente ao colágeno tipo I de 17,6% e, em c, ao colágeno tipo I de 26,6%, com valores numéricos foram expressos em porcentagem de área, nas quais podem ser visualizados na Figura 37.

Os extratos de polifenóis, assim como o ESBT, atuam de forma inibitória contra as enzimas de degradação da pele, como colagenase, elastase e hialuronidase, exercendo proteção ao envelhecimento e à regeneração tecidual. Desta forma, foram realizados ensaios de permeação e

retenção com a formulação do tipo creme incorporada com ESBT. Os resultados podem ser observados a seguir na Figura 37, na qual o fragmento de pele sem nenhuma aplicação foi usado como controle negativo e o fragmento de pele sem o ESBT como veículo e para análise foi utilizado o fragmento de pele com ESBT (3%) incorporado ao veículo.

Figura 37. Quantificação de colágeno 1 em pele humana



Médias expressas em porcentagem da área do colágeno tipo I em tecido humano, na qual se apresenta apenas pele humana (controle negativo); pele humana com veículo; pele humana com extrato de soja biotransformado transgênico incorporado ao veículo. Todos os parâmetros foram mantidos nas mesmas condições por 30 dias. Dados representam a média ± SEM de três experiências independentes. * p <0,05 vs controle negativo (ANOVA e Tukey teste posthoc). Análise das imagens pelo programa Image J® e a realização das médias por grupo.

A revela um aumento de porcentagem de área significativa de colágeno do tipo I em peles tratadas por 30 dias com formulação cosmética na qual foi incorporada o ESBT (3%) em relação à porcentagem de área de colágeno, também do tipo I, em grupo controle negativo. É de extrema necessidade a permeação e a indução de propriedades biológicas do extrato de soja para que seja detectada a atividade anti-envelhecimento, por meio de suas propriedades anti-oxidantes, estimuladoras de receptores de estrógeno e inibidora da degradação do colágeno e do ácido hialurônico, dentre outras.

Alguns trabalhos encontrados na literatura corroboram com os nossos resultados de estimulação de colágeno na pele por constituintes de soja. Pesquisas publicadas por Varani e colaboradores (2004) desmontaram que culturas de órgãos de pele humana tratadas com concentrações variáveis de extrato de soja eram capazes de estimular proliferação de fibroblastos dérmicos e síntese de procolágeno do tipo I, com resultados de aumento de 75% e produção de colágeno e 114% de aumento em relação ao controle negativo. Ahn e colaboradores (2018), também demonstraram que curativo nanofibroso totalmente vegetal, composto de acetato de celulose e hidrolisado de proteína de soja, pode melhorar a cicatrização de feridas com reconstituição tecidual e a estimulação de colágeno na pele.

Em relação à utilização de extratos biotransformados, é possível encontrar poucos estudos sobre efeitos desses compostos de soja biotransformado rico em aglicona em células endoteliais humanas ou efeitos *in vitro* de extratos de isoflavonas biotransformadas com capacidade antioxidante, antiinflamatório e antilipogênico. Os estudos sobre extratos biotransformados em cultura de tecidos ainda é escasso, da mesma forma quando se comparado com extratos de soja biotransformados de origem transgênica. Fator fundamental para a produção de dados científicos, salientado no início desse estudo que a produção de soja transgênica no Brasil é maioria em relação aos grãos não transgênicos, sendo de extrema necessidade o desenvolvimento de novas tecnologias e fármacos com potencial terapêutico que utilizem essa fonte de matéria.

Os resultados apresentados nessa seção foram realizados com o intuito de comprovar a efetiva ação do produto desenvolvido ao longo da pesquisa. O trabalho na qual foi baseado esse projeto foi paralisado na etapa de investigação *in vitro*. Além desse estudo abordar a utilização de um material diferente (cultivar de soja alternativa e de procedência transgênica) abre margem para novas pesquisas na linhagem dos transgênicos no Brasil. Existem trabalhos, como o desenvolvido por Lacroix e colaboradores (2007), que demonstram resultados significativos de indução de colágeno e de reconstituição tecidual em peles humanas mantidas em cultura de célula e tratadas com extratos de soja em relação ao tempo, com a análise de estrutura e composição epidérmica e dérmica examinadas após 42 e 60 dias de cultivo. Na maioria dessas pesquisas, o tempo de análise foi superior a 30 dias, sugerindo que poderíamos ter resultados diferentes se abordássemos um tempo divergente na qual foi utilizado nesse estudo. Novas pesquisas com maiores exposições de tempos podem contribuir para uma investigação completa.

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns métodos alternativos são desenvolvidos pela necessidade de uma tecnologia alternativa às já existentes que possa proporcionar efeitos positivos seletivos ao objetivo proposto, menores efeitos colaterais e utilização de matéria prima de fonte barata e abundante no país. Dessa maneira, o presente estudo propõe um modelo alternativo à terapia de reposição hormonal tradicional, pela utilização de isoflavonas agliconas (biotransformadas pelo fungo *Aspergillus awamori*) provindas de soja transgênica brasileira (fonte abundante no país).

As isoflavonas de soja podem combater complicações relacionadas com implicações no processo de reconstituição tecidual da pele, principalmente resultante do período de menopausa, na qual os hormônios femininos diminuem a sua influência e assim, uma menor atividade no órgão, provocando complicações na homeostasia. Muitos estudos demonstraram que a utilização, por via dérmica, destas isoflavonas podem contribuir para um perfil de melhor equilíbrio biológico no órgão e aspectos positivos na pele de mulheres. Para tanto, é necessário que compostos empregados em estudo sejam capazes de estimular respostas adequadas e com seletividade. Já foi evidenciado que dentre as isoflavonas presentes no grão de soja, as formas glicosiladas são as mais abundantes, entretanto, as agliconas, presentes em menores quantidades na soja possuem maior atividade biológica no sistema biológico.

Em vista do exposto, desenvolver um produto cosmético com ativo natural e eficaz capaz de combater sinais de envelhecimento da pele e contribuir para a sua manutenção e homeostasia é essencial para proporcionar melhor qualidade de vida às mulheres em menopausa que sofrem as consequências de tratamentos tradicionais. Neste estudo, foi produzido um extrato de soja biotransformado pelas enzimas o fungo *Aspergillus awamori* (ESBT) para a análise das suas ações na pele. Diversos autores demostraram que a transformação das formas glicosídicas das isoflavonas para suas formas agliconas, realizada por hidrólise enzimática, através da fermentação da soja por microrganismos produtores de b-glicosidades são necessárias para melhores resultados no sistema biológico humano e animal. Através de análises quantitativas utilizando recursos da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi possível identificar as concentrações de Daidzeína e Genisteína (isoflavonas) no extrato biotransformado produzido para adição na formulação desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa.

Em um segundo momento do trabalho, foi avaliado a citotoxicidade do ESBT em cultura de fibroblastos humanos primários (HDF-a), nas quais as análises nos permitiram concluir que

o extrato biotransformado (ESBT) não possui atividade citotóxica. Posterior a estas análises, foi desenvolvida uma formulação cosmética (creme) para a incorporação do extrato, na qual a mesma já havia passado por testes preliminares de estabilidade, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016) e que, segundo o guia de estabilidade de cosméticos publicado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), foi satisfatória para incorporação de princípios ativos.

Ensaios anteriores de permeação e retenção realizado pelo nosso grupo de pesquisa revelou que a formulação cosmética desenvolvida possibilita a retenção das isoflavonas Daidzeína e Genisteína na pele, já que segundo a ANVISA, ensaios farmacocinéticos e toxicocinéticos são necessários para trabalhar com formulação cosmética.

Para concluir o estudo, foi avaliada a capacidade do ESBT em estimular a produção do colágeno em cultura de células (HDF-a) e em cultura de tecido humano (hOSEC). O aumento de colágeno do tipo 1 em análise não está, provavelmente, relacionada com a capacidade antioxidante do extrato de colágeno, porém pode estar relacionada com a interação de um dos componentes do extrato com o receptor de hormônio estrógeno beta (REb) encontrado na pele, já que a dose de genisteína que foi capaz de promover o maior aumento na expressão do colágeno é a mesma apontada como responsável por maior afinidade ao REb. Ao se utilizar os controles padrões de Genisteína e Daídzeína purificados na cultura de células e, consecutivamente, obtidos resultados significativos, pode-se concluir que a ação na produção de colágeno pode ter influência das isoflavonas encontradas no ESBT. No entanto, deve ser levado em consideração também que, apesar da forte evidência de que as isoflavonas, em especial a Genisteína, seja responsável por este efeito na expressão do colágeno (vide resultados obtidos pelo ensaio de western blotting após tratamentos com ESBT), é presumido que a Genisteína possa não ser a única responsável por este efeito benéfico na pele, visto que é detectado nas análises cromatográficas que o extrato produzido possui diversos outros componentes, podendo também induzir atividades no organismo. Além disso, apesar de evidências de que a interação hormonal com REb seja um dos mecanismos responsáveis pelo estímulo da produção de colágeno, não é possível descartar que outros compostos também podem induzir atividade.

Os resultados apresentados nesse projeto revelam que o ESBT não revelou contraindicações em relação à citotoxidade e pode ser utilizado em cosméticos para uso

alternativo de tratamentos relacionados com problemas de constituição tecidual da pele. Entretanto, a obtenção destas isoflavonas biotransformadas é um processo meticuloso, requerindo tempo e precisão na manipulação e na análise.

Desta forma, a utilização de extrato de soja transgênica biotransformada em produtos cosméticos é uma alternativa eficaz, com menor custo e caráter “natural”, característica cada vez mais explorada por algumas indústrias cosméticas em seus produtos.

Produtos de tecnologias eficazes são desenvolvidos a partir de ingredientes naturais, criados a partir de um complexo processo biológico, na qual é necessário garantir o controle de uma ação desejada, assim como a manutenção do efeito, utilizando critérios científicos consolidados para definir o percentual dos ingredientes naturais a serem utilizados na formulação.

Os extratos vegetais, como o produzido nessa dissertação, possuem um *blend* de inúmeras substâncias, e para garantir a atividade dos compostos presentes no produto, as matérias primas e o modo de preparação das formulações devem ser criteriosamente estabelecidos. A utilização de ingredientes naturais em produtos cosméticos é recomendável, visto que reflete expectativas positivas nos consumidores por serem oriundos de processos biológicos espontâneos e pelos benefícios que podem proporcionar à pele e à saúde da mulher. Entretanto, é necessário estudos complementares voltado para a aplicação *in vivo* com novos parâmetros, aprimorando e sofisticando a eficácia e assim dimensionando e comprovando os seus benefícios.

Neste trabalho ficou demonstrado que o extrato de soja transgênica biotransformado pelo fungo *A. awamori* possui atividade estrogênica similar à encontrada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa ao se utilizar uma cultivar de soja alternativa sem transgenia, sendo responsável por estimular a produção de colágeno do tipo 1 em fibroblastos humanos primários e em cultura de pele humana.

6. REFERÊNCIAS

AALBERS, F.S.; FRAAIJE, M.W. Enzyme Fusions in Biocatalysis: Coupling Reactions by Pairing Enzymes. **Chembiochem**, v.20, n.1, p.20-28, 2019.

ABDELLA, A.; EL-BAZ, A.F.; IBRAHIM, I.A.; MAHROUS, E.E.; YANG, S.T. Biotransformation of soy flour isoflavones by Aspergillus niger NRRL 3122 b-glucosidase enzyme. **Nat Prod Res**, v.32, n.20, p.2382-2391, 2018.

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.

ALEZANDRO, M.R.; ALMEIDA, S.A.; MAIA, P.P.; CARVALHO, H.A. Soja transgênica BRS 243 RR: determinação de macronutrientes e das isoflavonas Daidzeína e Genisteína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Ciênc. Tecnol**. **Aliment**., Campinas. 2008.

ANDLAUER, W.; KOLB, J.; FÜRST, P. Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. **J Nutr**, v.130, p.3021- 3027, 2000.

ANDRES, S.; HANSEN, U.; NIEMANN, B.; PALAVINSKAS, R.; LAMPEN, A. Determination of the isoflavone composition and estrogenic activity of commercial dietary supplements. **Food Funct**, v.6, n.6, 2017-2025, 2015.

APROSOJA- Associação dos Produtores de Soja e Milho. Disponível em: <http://www.aprosoja.com.br/comunicacao/audio/safra-20192020-deve-ter-incremento-de-3> Acesso em: 17 de abril de 2020.

ARCHER, D.F. Postmenopausal skin and estrogen. **Gynecol Endocrinol,** v**.**28, n. 2, p.2-6, 2012.

ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clin Dermatol**, v.32, n.1, p.3-13, 2014.

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

ATES, G. VANHAECKE, T. ROGIERS, V. RODRIGUES, R.M. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. **Methods Mol Biol**, v.1601, p.19-26, 2017.

ATKINSON, C.; SKOR, H.E.; FITZGIBBONS, E.D; SCHOLES, D.; CHEN, C.; WÄHÄLÄ K.; SCHWARTZ, S.M.; LAMPE, J.W. Overnight urinary isoflavone excretion in a population of women living in the United States, and its relationship to isoflavone intake. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.11, p.253-260, 2002.

BARNES, S.; KIM, H.; XU, J. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. In:

Congresso Brasileiro de Soja, 2., Foz do Iguaçu. **Anais. Londrina: Embrapa**, p.295- 308, 2002.

BAUMANN, L. How to use oral and topical cosmeceuticals to prevent and treat skin aging. **Facial Plast Surg Clin North Am**, v.26, n.4, p.407-413, 2016.

Bayerl, C. Keil, D. Isoflavonoide in der behandlung der hautalterung postmenopausaler frauen. **Aktuelle Dermatol**, v.28, p14-8, 2002.

BELLA, J.; EATON, M.; BRODSKY, B.; BERMAN, H.M. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 A resolution. **Science**, v. 266, n.5182, p.75–81, 1994.

BEZERRA, P.H.A.; STOCCO, B.; BIANCHI, C.I.; BIANCHINI, F. FIGUEIREDO, S.A.; FONSECA, M.J.V.; TORQUETI, M.R. Soybean extract modified by Aspergillus awamori stimulates a greater collagen-I synthesis in the intracellular matrix of human fibroblasts. **J Cosmet Dermatol**, 2021.

BIGNELL, E.; NEGRETE-URTASUN, S.; CALCAGNO, A.M.; HAYNES, K.; ARST, H.N.; JR, ROGERS, T. The Aspergillus pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. **Mol Microbiol**, v. 55, n.4, p.1072-1084, 2005.

BOTTAI, G.; MANCINA, R.; MURATORI, M. et al. 17b-estradiol protects human skin fibroblasts and keratinocytes against oxidative damage. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 27, p. 1236-1243, 2013.

CARRER, V.; ALONSO, C.; PONT, M.; ZANUY, M.; CÓRDOBA, M.; ESPINOSA, S.; BARBA, C.; OLIVER, M.A.; MARTÍ, M.; CODERCH L. Effect of propylene glycol on the skin penetration of drugs. **Arch Dermatol Res**. 2020.

CEDERROTH, C.R.; ZIMMERMANN, C.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. **Mol. Cell. Endocrinol**, v. 355, p. 192-200, 2012.

CHAN, K.K.L.; SIU, M.K.Y.; JIANG, Y.X.; WANG, J.J.; LEUNG, T.H.Y.; NGAN, H.Y.S. Estrogen receptor modulators genistein, daidzein and ERB-041 inhibit cell migration, invasion, proliferation and sphere formation via modulation of FAK and PI3K/AKT signaling in ovarian cancer. **Cancer Cell Int,** 2018.

CHATTERJEE, C.; GLEDDIE, S.; XIAO, C.W. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. **Nutrients**, v.10, n.9, p.1211, 2018.

CHEN, J.C.; WANG, J.; WANG, Z.J. et al. Effect of Monascus aged vinegar on isoflavone conversion in soy germ by soaking treatment. **Food Chem**, v.186, p.256-264, 2015.

CHEN, K.I.; YAO, Y.; CHEN, H.J.; LO, Y.C.; YU, R.C.; CHENG, K.C. Hydrolysis of isoflavone in black soy milk using cellulose bead as enzyme immobilizer [published correction appears in **J Food Drug Anal**. 2017 Jan;25(1):206]. J Food Drug Anal, v.24, v.4, p.788-795, 2016.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <www.conab.gov.br › safras › graos › item › download > Acesso em: 17 de abril de 2020.

CROWLEY, L.C.; MARFELL, B.J.; SCOTT, A.P. WATERHOUSE, N.J.; Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harb Protoc**, 1;2016(11), 2016 Nov.

DAAN, N.M.; AUSER, B.C. Menopause prediction and potential implications. **Maturitas**, v.82, n.3, p. 257-265, 2015.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS - DATASUS. Informações de Saúde, Demográficas e Socioeconômicas: banco de dados. Disponível em: < http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0206&id=6942> Acesso em: 17 abril. 2020.

DI VIRGILIO, AL. IWAMI, K. WÄTJEN, W. KAHL, R. DEGEN, G.H. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. **Toxicol Lett**, v.151, n.1, p151-162, 2004.

DUARTE, G.V.; TRIGO, A.C.; PAIM, O. M. D. E. F. Skin disorders during menopause. **Cutis**, v. 97, n.2, p.16-23, 2016.

DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; PACE, P.F.; REDDY, K.N. Isoflavone, Glyphosate, and Aminomethylphosphonic Acid Levels in Seeds of Glyphosate-Treated, Glyphosate-Resistant Soybean. **J. Agric. Food Chem**. Departamento de Agronomia, Universidade do Missouri, Columbia. 2003.

DWORATZEK, E.; MAHMOODZADEH, S.; SCHRIEVER, C.; KUSUMOTO, K.; KRAMER, L.; SANTOS, G.; FLIEGNER, D.; LEUNG, Y.K.; HO, S.M.; ZIMMERMANN, W.H.; LUTZ, S.; REGITZ-ZAGROSEK, V. Sex-specific regulation of collagen I and III expression by 17b-Estradiol in cardiac fibroblasts: role of estrogen receptors. **Cardiovasc Res.** 2019.

EHRLICH, H. P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. **Am J Surg**, p.29-33, 2004.

ESAKI, H.; WATANABE, R.; ONOZAKI, H.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Formation mechanism for potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in soybean fermented with Aspergillus saitoi. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.63, n.5, p.851-858, 1999.

Febrasgo-Federação Brasileira de Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. Disponível em: < https://www.febrasgo.org.br/images/arquivos/manuais/Manuais_Novos/consenso_brasileiro_de_t

erapeutica_hormonal_da_menopausa_SOBRAC.pdf > Acesso em: 30 de abril de 2020.

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.

FRADE, M.A.; ANDRADE, T.A.; AGUIAR, A.F.; GUEDES, F.A.; LEITE, M.N.; PASSOS, W.R.; COELHO, E.B.; DAS, P.K.; Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **An Bras Dermatol**, v. 90(3), p.347-50, 2015 Jun 1.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Adv Protein Chem Struct Biol**. V.116, p.135-170, 2019.

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.459-66, 2009.

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

GUTIERREZ-GONZALEZ, J. J.; GUTTIKONDA, S. K.; TRAN, L.S. et al. Differential expression of isoflavone biosynthetic genes in soybean during water deficits. **Plant Cell Physiol**, v.51, n.6, p.936-948, 2010.

HEINONEN, S.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUT, H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6´-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds, **Anal Biochem**, v.274, p.211-219, 1999.

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

HERTRAMPF, T.; Schmidt, S.; Laudenbach-Leschowsky, U.; Seibel, J.; Diel, P. Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. **Mol Cell Endocrinol**, v. 243, p. 51-57, 2005.

HILDEBRAND, K.A. et al.; The basics of soft tissue healingand general factors that influence such healing. **Sports MedArthrosc,** v.13, n.3, p.136-144, 2005.

HIRAMATSU, E.Y.; DE ÁVILA, A.R.A.; GÊNOVA, V.M. et al. Biotransformation processes in soymilk isoflavones to enhance anti-inflammatory potential in intestinal cellular model. **J Food Biochem**, v.44, n.3, p.e13149, 2020.

HSIAO, Y.H.; HSIEH, J.F. The conversion and deglycosylation of isoflavones and anthocyanins in black soymilk process. **Food Chem**, v.261, p.8-14, 2018.

HUANG, C.C.; HSU, B.Y.; WU, N.L.; TSUI, W.H.; LIN, T.J.; SU, C.C.; HUNG, C.F. Anti-photoaging effects of soy isoflavone extract (aglycone and acetylglucoside form) from soybean cake. **Int J Mol Sci**, v. 11(12), p.4782-95, 2010 Nov 24.

HURLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, t. et al. 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.

HÜSER, S.; GUTH, S.; JOOST, H.G. Effects of isoflavones on breast tissue and the thyroid hormone system in humans: a comprehensive safety evaluation. **Arch Toxicol**, v.92, n.9, p.2703–2748, 2018.

HUTCHINS, A.M.; SLAVIN, JL; LAMPE, JW.; Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. **J Am Diet Assoc**. v.95, p.545-551, 1995.

HWANG, C. S.; KWAK, H. S et al. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.101, n.4-5, Nov, p.246-53. 2006.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: < https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/26537-ibge-preve-safra-recorde-de-graos-em-2020> Acesso em: 17 de abril de 2020.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil, 25p. 2019. Disponível em: < https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf > Acesso em 22 de julho de 2021.

IRRERA, N.; PIZZINO, G.; D'ANNA R. Dietary Management of Skin Health: The Role of Genistein. **Nutrients**, v.9, n.6, p. 622, 2017.

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

JAYACHANDRAN, M.; XU, B. An insight into the health benefits of fermented soy products. **Food Chem**, v.271, p. 362-371, 2019.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica** – texto/atlas.10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 488p, 2004.

KANG, M. C.; YUMNAM, S.; KIM, S.Y. Oral Intake of Collagen Peptide Attenuates Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Dehydration In Vivo by Regulating Hyaluronic Acid Synthesis. **Int J Mol Sci**. 2018.

KIM, H.; PETERSON, T.G.; BARNES, S.; Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor b signaling pathways. **Am J Clin Nutr**, v.68 (suppl.), p.1418S-1425S, 1998.

KIM, KM.; LIM, J.; LEE, JJ.; HURH, BS.; LEE, I. Characterization of Aspergillus sojae Isolated from Meju, Korean Traditional Fermented Soybean Brick**. J Microbiol Biotechnol**, v.27, n.2, p.251-261, 2017.

KING, R.A.; BROADBENT, J.L.; HEAD, R.J.; Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. **Journal of Nutrition**, v.126, p.176-182, 1996.

KING, R.A.; Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. **Am J Clin Nutr**, v.68 (suppl.), p.1496S-1499S, 1998.

KŘÍŽOVÁ, L.; DADÁKOVÁ, K.; KAŠPAROVSKÁ, J.; KAŠPAROVSKÝ, T. Isoflavones. **Molecules**, 2019.

KULKARNI, T.S.; KHAN, S.; VILLAGOMEZ, R. et al. Crystal structure of b-glucosidase 1A from Thermotoga neapolitana and comparison of active site mutants for hydrolysis of flavonoid glucosides. **Proteins**, v.85, n.5, p 872-884, 2017.

KUMAR, M.M.; DAVULURI, S.; POOJAR, S.; MUKHERJEE, G.; BAJPAI, A. K.; BAFNA, U. D.; ET AL. Role of estrogen receptor alpha in human cervical cancer-associated fibroblasts: A transcriptomic study. **Tumour Biol**, v.37, n.4, p. 4409-2440, 2016.

LACROIX, S.; BOUEZ, C.; VIDAL, S.; CENIZO, V.; REYMERMIER, C.; JUSTIN, V.; VICANOVÁ, J.; DAMOUR, O. Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from fibroblasts from young or aged donors. **Biogerontology**, v. 8(2), p. 97-109, 2007.

LEAL, M.C.M.R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. (Tese de mestrado). **Universidade Federal do Rio de Janeiro,** Rio de Janeiro, 2000.

LEE, J.H.; HWANG, C.E.; SON, K.S.; CHO, K.M. Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. **Food Chem**, v.272, p.362-371, 2019.

LEITE, M.N.; VIEGAS, J.S.R.; PRAÇA, F.S.G.; DE PAULA, N.A.; RAMALHO, L.N.Z.; BENTLEY, M.V.L.B.; FRADE, M.A.C. Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. **Eur J Pharm Sci**. 2021.

LI, B., Wang, J.H.C. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation

and measurement. **J Tissue Viability**, v. 20, p.108–120, 2011.

LI, J.; ZHANG, S.; AMAYA E. The cellular and molecular mechanisms of tissue repair and regeneration as revealed by studies in Xenopus. **Regeneration** (Oxf), v. 3, n. 4, p.198-208, 2016.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A.; Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **J Nutr Biochem**, v.11, p.326-331, 2000.

LIMA, A. F. Produção e caracterização de b-glicosidase vegetal e microbiana e sua aplicação para conversão de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas. Orientador: YONG K. PARK. 2003. 167 f. **Tese** (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2003.

LIN, Y.C.; CHIPOT, C.; SCHEURING, S. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. **Nat Commun,** v.13, p.11(1):230, 2020 Jan.

LIU, K. Soybeans. Chemistry, Technology and Utilizations, 2ª ed., Gaithersburg, Maryland, **An Aspen Publication**, 1999, p. 83-93.

LIU, T.; LI, N.; YAN, Y.Q.; LIU, Y.; XIONG, K.; LIU, Y.; XIA, Q.M.; ZHANG, H.; LIU, Z.D.; Recent advances in the anti-aging effects of phytoestrogens on collagen, water content, and oxidative stress. **Phytother Res,** v.34(3), p. 435-447, 2019.

LOWRY, W.E. Its written all over your face: The molecular and physiological consequences of aging skin. **Mech Ageing Dev.** p.190:111, 2020.

MARJORIBANKS, J.; FARQUHAR, C.; ROBERTS, H.; LETHABY, A.; LEE, J. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**. 2017.

MATWIEJCZUK, N.; GALICKA, A.; BRZÓSKA, M.M. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. **J Appl Toxicol**. 2020.

MESSINA, M. Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, v.100, n.1, p.423-30, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Série A. Normas e Manuais Técnicos Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos – Caderno, n.9 Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_atencao_mulher_climaterio.pdf. > Acesso em: 19 de abril de 2020.

MITRENGOVÁ, P.; MUČAJI, P.; PERŽEĽOVÁ, V.; DOSEDLA, E.; GÁL, P. Genistein: a promising molecule modulating tumour growth and wound healing? **Ceska Slov Farm,** 2018.

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.

MORAES, A.B.; HAIDAR, M.A.; SOARES, J.M.; SIMÕES, 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.146, n.2, p.188-92, 2009.

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

MORISHITA, N.; MATSUMOTO, T.; MORIMATSU, F.; TOYODA, M. Detection of soybean proteins in fermented soybean products by using heating extraction. **J Food Sci,** v.79, n.5, p.1049-1054, 2014.

MOUTSATSOU, P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. **Hormones** (Athens), v.6, n.3, p.173-93. 2007.

MUROTA, K.; NAKAMURA, Y.; UEHARA, M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2018.

MURPHY, P.A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K. Isoflavones in soy-based infant formulas. **J. Agric. Food Chemistry**, v.45, p.4635-4638, 1997.

NANASHIMA, N. HORIE, K. MAEDA, H. TOMISAWA, T. KITAJIMA, M. NAKAMURA, T. Blackcurrant Anthocyanins Increase the Levels of Collagen, Elastin, and Hyaluronic Acid in Human Skin Fibroblasts and Ovariectomized Rats. **Nutrients**, v.10, n.4, 495, 2018.

NELSON, L.R.; BULUN, S.E.; Estrogen production and action. **J Am Acad Dermatol**, v.45, n.3, p. 116-24, 2001.

NEVES-E-CASTRO, M.; SAMSIOE, G.; DÖREN, M.; SKOUBY, SO. (European Menopause Society) Results from WHI and HERS II - Implications for women and the prescriber of HRT. **Maturitas**; v. 42, p.255-258, 2002.

NIH, C.; 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.

NINGTYAS, D.W.; HATI, S.; PRAKASH, S. Bioconversion and bioaccessibility of isoflavones from sogurt during in vitro digestion. **Food Chem**, 2021.

NISHIDA VS, DE OLIVEIRA RF, BRUGNARI T, et al. Immobilization of *Aspergillus awamori* b-glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process. **Int J Biol Macromol**, v.111, p.1206-1213, 2018.

ORIENTE, R.; TRAMONTINA, D.; DE ANDRADES, C.; HENN, J.L.C.; SILVA, R.C.G.; SIMÃO, A.; MALLER, M.L.T.M.; POLIZELI, M.K.; KADOWAKI, M. K. Characterization of a novel Aspergillus niger beta-glucosidase tolerant to saccharification of lignocellulosic biomass and fermentation inhibitors, **Chem. Pap**, v. 69, p.1050-1057, 2015.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; NERY, I.A.; AGUIAR, C.L.; SATO, H.H.; Extraction of isoflavones from defatted soy flour by ethanol and conversion of glucoside isoflavones to aglycones by fungal b-glucosidase, In: **IFT Annual Meeting**, new Orleans, Anais. New Orleans: IFT, p.164, 2001.

PATRIARCA, M.T.; MORAES, B. A. R.; NADER, H.B.; PETRI, V.; MARTINS, J.R.; GOMES, R.C.; et al. Hyaluronic acid concentration in postmenopausal facial skin after topical estradiol and genistein treatment: A double-blind, randomized clinical trial of efficacy. **Menopause**, v. 20, n. 3, p. 336-341, 2013.

Pedro Silvestre/Canal Rural. Disponível em: < https://www.canalrural.com.br/sites-e-especiais/projeto-soja-brasil/soja-bate-em-r-100-no-disponivel-do-rio-grande-do-sul/> Acesso em: 30 de abril de 2020.

PELLETIER, G.; REN, L. Localization of sex steroid receptors in human skin. **Histol Histopathol**, v. 19, n.2, p.629-636, 2004.

PESHIN, A.; MATHUR, J.M.S. Purification and characterization of b-glucosidase from Aspergillus niger strain 322, **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.401-404, 1999.

PLEADIN, J.; FRECE, J.; MARKOV, K. Mycotoxins in food and feed. **Adv Food Nutr Res**. N. 89, p. 297-345, 2019.

RAINE-FENNING, N. J.; BRINCAT, M. P.; MUSCAT-BARON, Y. Skin aging and menopause: implications for treatment**. Am J Clin Dermatol**, n.4, p. 371-378, 2003.

Raza, A.; Pothula, R.; Abdelgaffar, H.; Bashir, S.; Jurat-Fuentes JL. Identification and functional characterization of a b-glucosidase from Bacillus tequelensis BD69 expressed in bacterial and yeast heterologous systems. **PeerJ**. 2020.

REID, R.; ABRAMSON, B.L.; BLAKE, J. et al. Managing menopause. **J Obstet Gynaecol Can**, v.36, p.830-838, 2014.

ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L.; PRENTICE, R.L.; LACROIX, A.Z.; KOOPERBERG, C.; STEFANICK, M.L.; JACKSON, R.D.; BERESFORD, S.A.; HOWARD, B.V.; JOHNSON, K.C.; et al. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA, v. 288, 321- 333, 2002.

RZEPECKI, A.K.; MURASE, J.E.; JURAN, R.; FABI, S.G.; MCLELLAN, B.N. Estrogen-deficient skin: The role of topical therapy. **Int J Womens Dermatol**. 2019, v. 5, n. 2, p.85-90,

2019.

SAHA, T.; MAKAR, S.; SWETHA, R.; GUTTI, G.; SINGH, S.K. Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. **Eur J Med Chem**, v.177, p.116-143, 2019.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer Letters**, v. 356, p. 231-243, 2015.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p.1-10, 2016.

SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes a practical approach**. New York: Oxford University, 1996, p. 25-55.

SCHOENAKER, D.A.; JACKSON, C.A.; ROWLANDS, J.V.; MISHRA, G.D. Socioeconomic position, lifestyle factors and age at natural menopause: a systematic review and meta-analyses of studies across six continents. **Int J Epidemiol**, n.43, v.5, p.1542-1562, 2014.

SETCHELL, K.D.; CLERICI, C. EQUOL: pharmacokinetics and biological actions. **J Nutr**, v.140, n.7, p.1363-1368, 2010.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W.T.; WOLFE, B.E.; KIRSCHNER, A.S.; HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.447-453, 2002.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; DESAI, P.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; WOLFE, B.E.; BRASHEAR, W.T.; KIRSCHNER, A.S.; CASSIDY, A.; HEUBI, J.E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements, **J Nutr**, v.131, p.1362-1375, 2001.

SHIMIZU M, KUSUYA Y, ALIMU Y, BIAN C, TAKAHASHI H, YAGUCHI T. DRAFT Genome Sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123NT. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 4, p. 1453-1518, 2019.

SHIN, J.W.; KWON, S.H.; CHOI, J.Y.; NA, J.I.; HUH, C.H.; CHOI, H.R.; PARK, K.C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches**. Int J Mol Sci**, v.29, p. 20(9):2126, 2019.

SHOULDERS, M.D.; RAINES, R.T. Collagen structure and stability. **Annu Rev Biochem**, v.78, p.929-958, 2009.

SILVA, L.A.; FERRAZ, C. A. A.; DE MORAES, A. R. B, et al. Collagen concentration on the facial skin of postmenopausal women after topical treatment with estradiol and genistein: a

randomized double-blind controlled trial. **Gynecol Endocrinol**, v. 33, n.11, p.845-848, 2017.

SOLÉ-BOLDO, L.; RADDATZ, G.; SCHÜTZ, S.; MALLM, J.P.; RIPPE, K.; LONSDORF, A.S.; RODRÍGUEZ-PAREDES, M.; LYKO, F. Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. **Commun Biol**, v. 23, p. 3(1):188, 2020.

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L.M.; WU, Z. et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Adv Mater**, n.31, v.1, 2019.

SOUZA, C.E.C.; RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z. Characterization and Application of Yarrowia lipolytica Lipase Obtained by Solid-State Fermentation in the Synthesis of Different Esters Used in the Food Industry. **Appl Biochem Biotechnol**, v.189, n.3, p. 933-959, 2019.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R.N.; GRECO, E.; MANENTI, I.; PIFFERI, P.G. A mixture of purified glycosidases from Aspergillus niger for oenological application immobilized by inclusion in chitosan gels. **Enzyme Microb Technol,** v.30, p.80-89, 2002.

STEENSMA, A.; FAASSEN-PETERS, M.A.; NOTEBORN, H.P.; RIETJENS, I.M. Bioavailability of genistein and its glycoside genistin as measured in the portal vein of freely moving unanesthetized rats. ***J Agric Food Chem***, v. 54, n. 21, p. 8006-8012, 2006.

STOCCO, Bianca. Avaliação da atividade estrogênica de extrato de soja biotransformado por fungo na produção de colágeno. 2016. **Tese** (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SUBRAMANIAN, S.; STACEY, G. and Yu, O. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. **Trends Plant Sci**, v.12, p.282-285, 2007.

ŠUŠANÍKOVÁ, I. PUCHL'OVÁ, M. LACHOVÁ, V. et al. Genistein and Selected Phytoestrogen-Containing Extracts Differently Modulate Antioxidant Properties and Cell Differentiation: an in Vitro Study in NIH-3T3, HaCaT and MCF-7 Cells. **Folia Bio**l (Praha), v.65, n.1, p.24-35, 2019.

TEIXEIRA, C. P.; FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G.R.S.; CARBONEL, A.A.F.; SIMÕES, R.S.; SIMÕES, M.J. Soy isoflavones protect against oxidative stress and diminish apoptosis in ovary of middle-aged female rats. **Gynecol Endocrinol**. v.35(7), p.586-590, 2019 Jul

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

TOKUDOME, Y.; NAKAMURA, K.; KAGE, M.; TODO, H.; SUGIBAYASHI, K.; HASHIMOTO, F. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts. **Int J Food Sci Nutr**, v. 63, n.6, p. 689-695, 2012.

TRAON-MASSON, M.P.; PELLERIN, P. Purification and characterization of two b-

glicosidases from an Aspergillus niger enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.374-382, 1998.

TSAI, T.; CHEN, L.; Effect of probiotic-fermented, genetically modified soy milk on hypercholesterolemia in hamsters. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 47, n.1, p.1-8, 2014.

TSCHUMPERLIN, D. J.; Fibroblasts and the ground they walk on. **Physiology** (Bethesda), v.28, n.6, p.380–390, 2013.

UEHARA, M.; OHTA, A.; SAKAI, K.; SUZUKI, K.; WATANABE, S.; ADLERCREUTZ, H. Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistina and Daidzeína and affect their urinary excretion and kinetics in blood of rats. **Journal of Nutrition**, v.131, p.787-795, 2001.

VARANI, J.; KELLEY, E. A.; PERONE, P.; LATEEF, H. Retinoid-induced epidermal hyperplasia in human skin organ culture: inhibition with soy extract and soy isoflavones. **Exp Mol Pathol,** v.77(3), p. 176-83, 2004.

VERDIER-SEVRAIN, S.; Bontè, F.; Gilchrest, B. Biology of estrogens in skin: Implications for skin aging. **Exp. Dermatol**, v.15, p.83–94, 2006.

WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. **J. Agric. Food Chemistry**, v.42, p.1674-1677, 1994.

WANG, H.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **J. Agric. Food Chemistry**, v.44, p.2377-2383, 1996.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M.J.; The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. **Maturitas**, v.103, p.60–64, 2017.

WU, H.; WANG, X.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; HUANG, M.; HE, J.; SHEN, W. Targeting the middle region of CP4-EPSPS protein for its traceability in highly processed soy-related products. **J Food Sci Technol**, 2017.

WU, M.; CRONIN, K.; CRANE, J.S. Biochemistry, Collagen Synthesis, 2020.

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

XU, X.; HARRIS, K.S; WANG, H.; MURPHY, P.A; HENDRICH, S.; Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. **J Nutr**, v.125, p.2307-2315, 1995.

YAZDKHASTI, M.; TOURZANI, Z.M.; ROOZBEH, N.; HASANPOUR, V.; SAEIEH, S.E.; ABDI, F.; The association between diabetes and age at the onset of menopause: a systematic

review protocol. **Syst Rev**, v. 8, n.1, p. 80-86, 2019.

YOSIPOVITCH, G.; MISERY, L.; PROKSCH, E.; METZ, M.; STÄNDER, S.; SCHMELZ, M. Skin Barrier Damage and Itch: Review of Mechanisms, Topical Management and Future Directions. **Acta Derm Venereol**. 2019.

YUSOF, H.M.; ALI, N.M.; YEAP, S.K.; HO, W.Y.; BEH, B.K.; KOH, S.P.; LONG, K.; ALITHEEN, N.B. Anti-inflammatory, analgesic and acute toxicity effects of fermented soybean. **BMC Complement Altern Med**, v. 19, p.19(1):373, 2019.

ZHANG, P.; ZHANG, P.; XIE, M.; AN, F.; QIU, B.; WU, R. Metaproteomics of Microbiota in Naturally Fermented Soybean Paste, Da-jiang. **J Food Sci**, v.83, n.5, p.1342-1349, 2018.

ZHAO, P.W.; LEE, D.Y.; MA, Z.Z.; SUN, Y.L.; TAO, S.Y.; ZANG, J.F.; NIU, J.Z. Effect of carnosol against proliferative activity of breast cancer cells and its estrogen receptor subtype's mediation and regulation mechanisms. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, 2014.

ZHENG, Q.; GAO, S. The effect of surfactant on fermentation of kitasamycin in Streptomyces kitasatoensis. **Biotechnol Appl Biochem**, v.63, n.6, p.895-900, 2016.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do FCFRP - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 017/2021
kms

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2021.

À pós-graduanda
Bianca de Arruda Leite
Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o protocolo de pesquisa intitulado "**Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extratos de soja biotransformados e não biotransformados por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno em cultura de pele humana**" (CAAE: 41903220.8.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 562), sob sua responsabilidade, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP em sua 215ª reunião, realizada em 30/07/2021, conforme Parecer Consubstanciado nº 4.878.979.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
Coordenadora do CEP/FCFRP

Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP
Avenida do Café s/nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 - cep@fcfrp.usp.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE Versão 4

"Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extrato de soja tradicional e transgênica biotransformado por fungo *Aspergillus awamori* na produção de colágeno"

Prezada Senhora,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa sobre ***Avaliação e comparação da atividade estrogênica de extrato de soja tradicional e transgênica biotransformado por fungo Aspergillus awamori na produção de colágeno,*** que está sendo desenvolvida por Bianca de Arruda Leite do Curso de Mestrado da Universidade de São Paula, sob a orientação da Prof.ª Maria Regina Torqueti e coorientação da Prof.ª Maria José Vieira Fonseca.

O objetivo do estudo é avaliar o efeito do extrato de soja na produção de colágeno em pele humana doada, na qual seriam descartadas após cirurgia médica. As participantes não podem ser fumantes e usuários de medicamentos, por pelo menos um mês antes da cirurgia de retirada de pele. A finalidade deste trabalho é contribuir para o estudo de vias alternativas de reposição hormonal para reconstituição tecidual de mulheres na menopausa.

Solicitamos a sua colaboração para ***coleta de pele descartada após cirurgia médica***, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional**.** Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto. **Existe o risco de quebra de sigilo e confidencialidade no armazenamento dos TCLE. Este risco será minimizado pelo compromisso do pesquisador em manter a guarda do TCLE em arquivos protegidos do alcance de outras pessoas.**Os benefícios desse estudo serão a utilização de produtos naturais, também de baixo risco, em alternativa às terapias convencionais para o estímulo de produção de colágeno em pele, ocasionando melhor aspecto para o tecido, tanto em propriedades físicas (elasticidade, firmeza), quando imunológica (regeneração). As amostras de pele doadas serão descartadas ao final do estudo.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, a senhora não é obrigada a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pela Pesquisadora. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição (se

for o caso). Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Como participante da pesquisa, você tem a garantia de ser indenizado por eventuais danos decorrentes da sua participação na pesquisa conforme a lei vigente.

Em caso de dúvidas éticas, poderá ser consultado o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, no endereço Avenida do Café, s/n, Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto/SP ou pelo telefone (16) 3315-4213, de segunda à sexta-feira, em dias úteis, das 8h00 às 12h00. O CEP é um órgão de caráter consultivo, normativo, deliberativo e educativo, com instituído de defender os interesses dos sujeitos da pesquisa e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões ético-científicos.

Bianca de A. Leite

Assinatura da pesquisadora responsável
E-mail: biancaa.leite@usp.br
CPF:414.333.408-95

Ribeirão Preto, 08 de julho de 2021

Eu, _____, li e concordo em participar da pesquisa que tem o objetivo de estudar a produção de colágeno em pele humana, doada após cirurgia médica. Considerando que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo: declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento. Entendo as consequências envolvidas nesse estudo e a possibilidade de, a qualquer momento, desistir sem que nada me aconteça.

Data:___/___ /___ _____
Assinatura do participante da pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES