

**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:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Torqueti

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José Vieira  
Fonseca

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 16/09/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
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. 117 p.

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> dr<sup>ª</sup> Torqueti, Maria Regina.

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

## 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 influencia 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 histológicas 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 citotoxicidade 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.

## **1. Introdução**

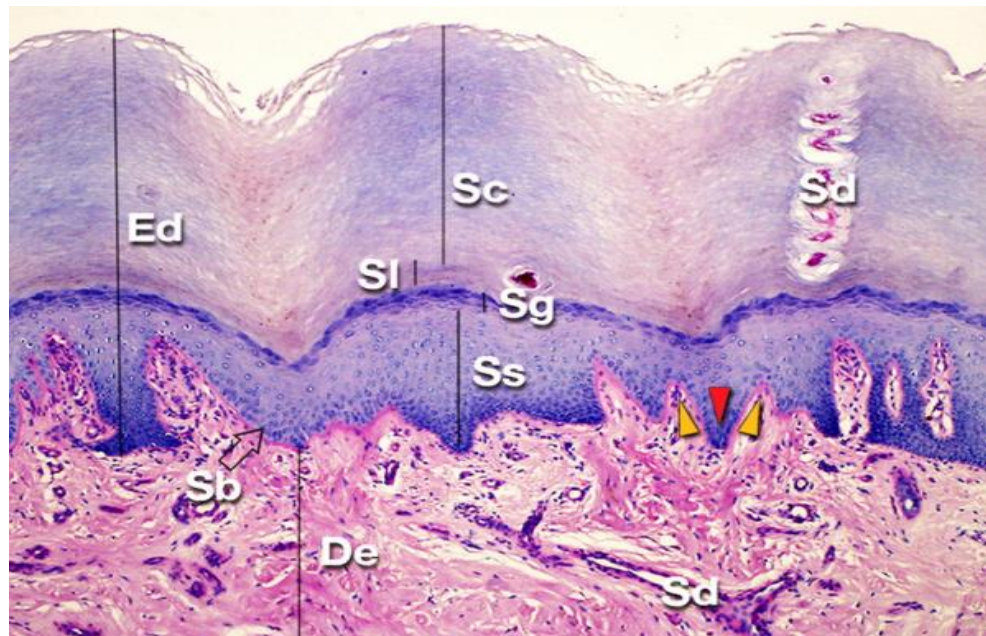
### **1.1 Pele**

A pele é um órgão composto por um agregado de tecidos que funcionam em conjuntos, 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 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 intercaladas 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).

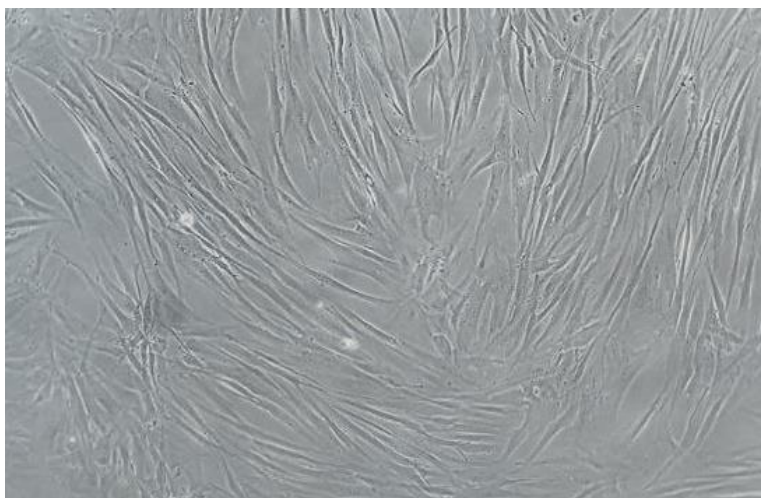
A derme possui duas camadas denominadas de papilar e reticular que são responsáveis por dar suporte e nutrição à epiderme. A camada papilar conecta a derme à epiderme e é constituída por tecido conjuntivo frouxo, promovendo a formação das papilas dérmicas e união das camadas. Já a camada reticular é 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 cm<sup>2</sup> 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, conseqüentemente, 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 ser caracterizado como material viscoelástico, ele possui alta resistência à tração e baixa extensibilidade. Junto com a elastina ele 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

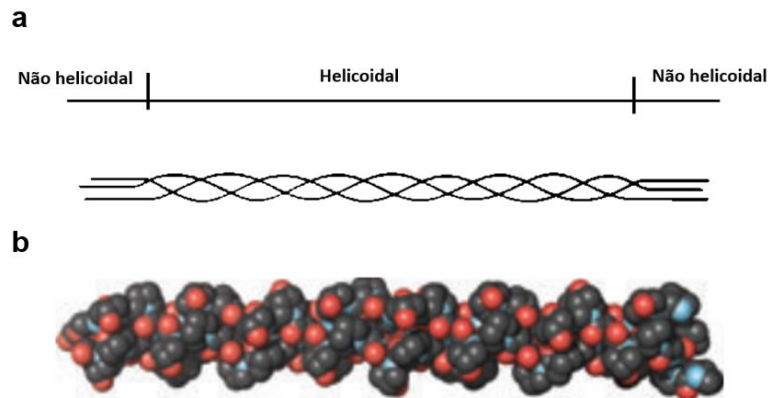
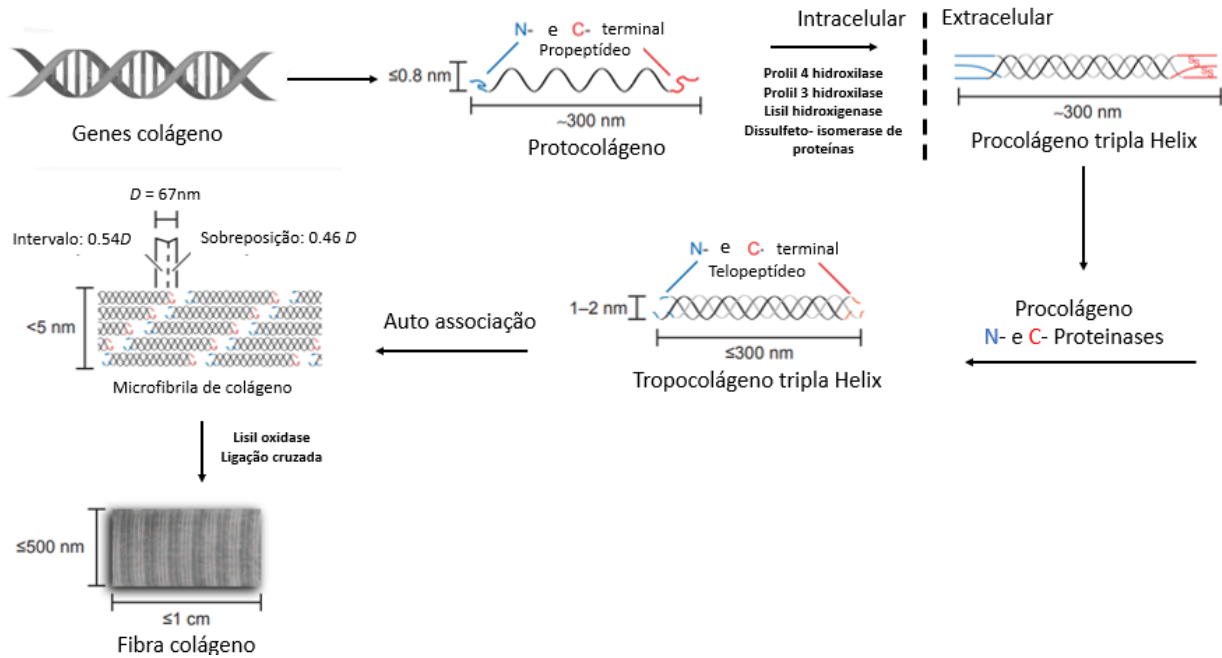


Figura (a) - Esquemática de uma cadeia molecular de um colágeno. Fonte: Adaptada de Soroushanova (2018). Figura (b) - Primeira estrutura cristalina de alta resolução de uma hélice tripla de colágeno, formada por (ProHypGly) 4–(ProHypAla) - (ProHypGly) 5 [Entrada de 1cag do Protein Data Bank (PDB)]. Fonte: 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  $\alpha$  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 clivagem 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). Ensaio sobre fertilidade realizados em populações humanas relataram evidências 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).

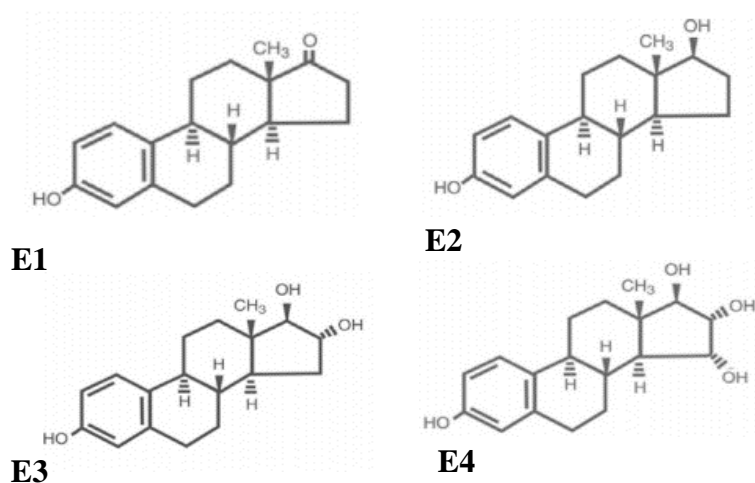
A redução da taxa de deposição de colágeno dérmico se relaciona com a taxa de deterioração da matriz extracelular e a deficiência de estrogênio. Estudos apontam que até 30% do colágeno dérmico pode ser perdido nos primeiros 5 anos após a menopausa, e o mesmo diminui aproximadamente 2,1% ao ano. Da mesma 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 (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>), 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 17b-estradiol, estriol e estretrol (FUENTES, 2019).

Figura 5. Estrogênios endógenos



Estrona (E1), 17b-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 17b-estradiol, devido ao seu papel durante os períodos reprodutivos, já os hormônios 16-hidroxiestradiol (estriol) e 15a 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 influencia 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 subseqüentemente 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. 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 de Receptores de Estrógeno: 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 $\beta$ -estradiol (E2), que passa passivamente através da membrana celular ao se difundir nela. E como já foi mencionado anteriormente, perfis de expressão de RE a e b 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 RE a é o principal fator de câncer de reprodução, o que torna o RE b um alvo terapêutico seletivo para uma nova via promissora de intervenções (KUMAR et al., 2016).

Com a ausência de hormônios e conseqüentemente 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. Alternativa para amenizar essa problemática seria a utilização de fontes alternativas, como fitoestrógenos, os quais apresentam atividade estrogênica fraca com menor atividade hormonal em relação aos hormônios sintéticos utilizadas 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) e o WHI (Women's Health Initiative), 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. Os estudos relataram terapias de reposição hormonal convencional em mulheres na fase pós-menopausa, e teve que ser suspensas nos EUA pois os medicamentos, uma combinação dos hormônios estrogênio e progesterona, causaram um leve, mas significativo, aumento no risco de câncer de mama. 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 estimularam alternativas terapêuticas. Alguns



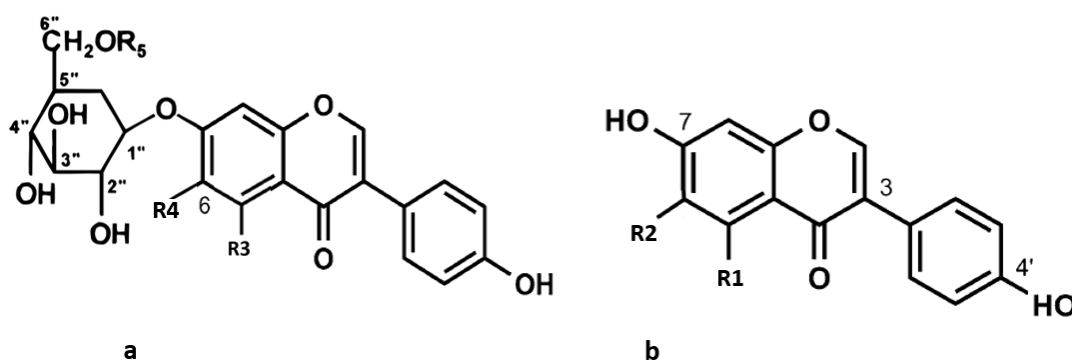
estudos usando isoflavonas isoladamente ou em combinação com outros agentes mostraram efeitos positivos, especificamente nas alterações cutâneas, na aparência e na composição da pele, típicas da menopausa, juntamente com o aumento da síntese e a diminuição da degradação do colágeno dérmico (SILVA, 2017).

### 1.7 Fitoestrógenos

Os fitoestrógenos são provenientes do metabolismo secundário de plantas, e possuem estrutura básica fenólica muito semelhante ao do estrógeno 17 $\beta$ -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

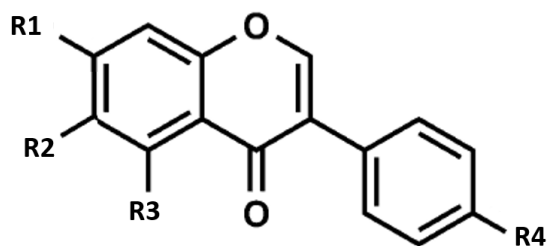


Glicona (a) e Aglicona (b). Fonte: Adaptada de Hüser (2018).

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 <sub>3</sub>	H	OH
Gliciteína	OH	OCH <sub>3</sub>	H	OH

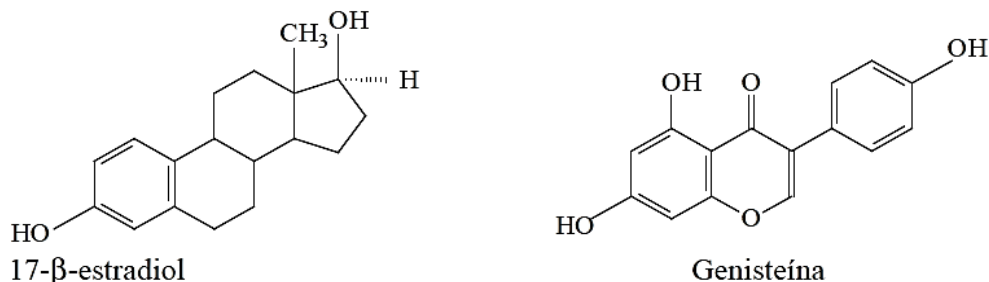


Fontes: Lima (2003).

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 do estrógeno fisiológico 17- $\beta$ - Similaridade nas estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17- $\beta$ -estradiol e a 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 e colaboradores (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 com as condições ambientais e com diferentes cultivares de soja (WANG e MURPHY, 1994).

Existem outros trabalhos de Wang, Murphy e colaboradores que demonstraram que produtos fermentados de soja apresentam diferença significativa em relação aos não fermentados, como maior número de agliconas. Em uma de suas pesquisas realizadas, 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 40mg 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 100mg 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, com mulheres voluntárias de 45 a 55 anos, foi realizado para comparar os efeitos do estrogênio tópico e da Genisteína no colágeno da pele facial de mulheres na pós-menopausa 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 (Tabela1). 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.

<b>Grupo de estudo</b>	<b>Grupo de tratamento</b>	<b>N</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Local da aplicação do tratamento</b>	<b>Resultados de interesse</b>
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)**

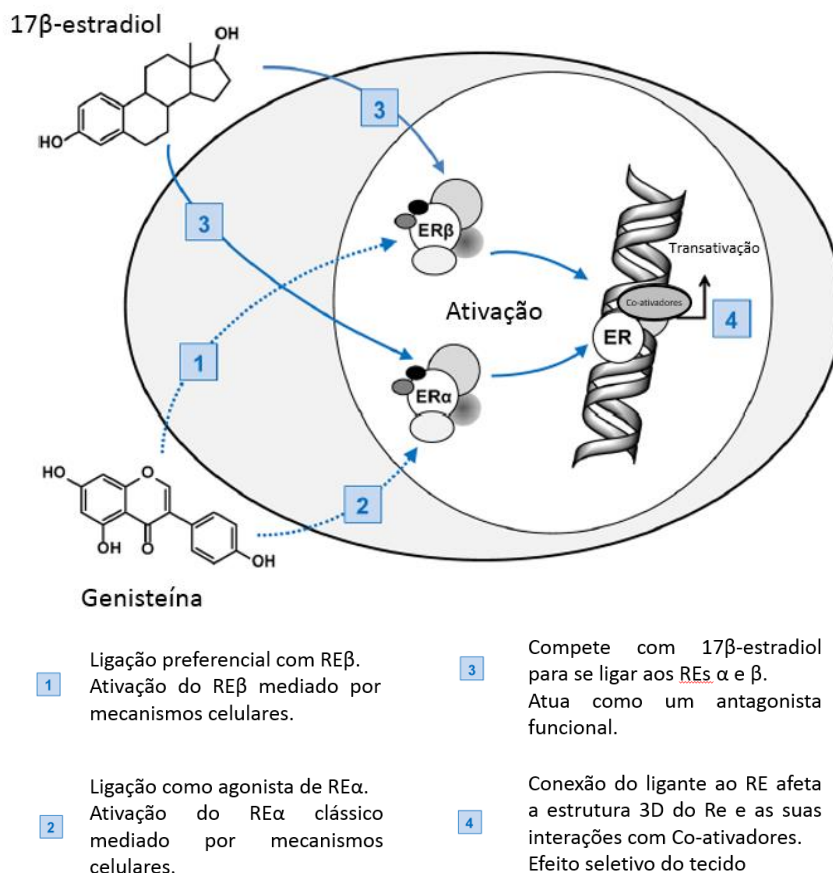
O mecanismo de ação dos fitoestrógenos é complexo, a sua ação mais conhecida se dá pela via de interação com os receptores nucleares para estrógeno, isoformas de receptor de estrógeno alfa e receptor de estrógeno beta, desempenhando papéis tanto agonistas como antagonistas em relação à ação dos estrógenos. 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 SERMs (CHAN et al., 2018).

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



Adaptada de Hüser (2018) e colaboradores.

A afinidade de ligação específicas das isoflavonas aos REα e REβ 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 REα, as isoflavonas tem preferência para se ligam ao REβ, 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 REβ 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 REβ, 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 flora microbiana 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 verificarem 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 (MURATA 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-glicosidasas 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-glicosidasas, 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 desenvolvimento de 50°C. Atualmente a procura por novas fontes de obtenção de b-glicosidasas de maneira sustentável e economicamente viável prioriza o uso de matérias-primas renováveis e processos de baixo custo. Como já mencionado anteriormente, ela 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 purificaram 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 às suas várias 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 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.

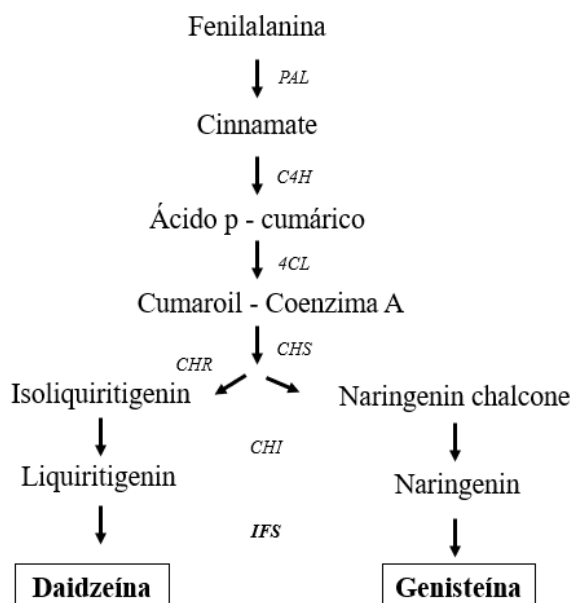
Somado ao mercado financeiro crescente para o plantio de soja, a cultivar também é associada a muitas propriedades à saúde, como na redução de doenças crônicas, doenças cardiovasculares, resistência à insulina / diabetes tipo II, obesidade, certos tipos de câncer,

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 podem ser detectados também se induzidos em resposta a tensões, enquanto os transcritos do IFS1 são mantidos mais constantes (GUTIERREZ-GONZALEZ, 2010).

Figura 11. 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. Alejandro 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 biobalística (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 significativo 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.

## 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 biotransformados com o fungo *A. awamori*. (ESBT) para a análise das suas ações na pele. Diversos autores demonstraram 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, foi satisfatória para incorporação de princípios ativos.

Ensaio 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 citotoxicidade 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, assim como foi feito pelo nosso grupo de pesquisa (STOCCO, 2016). 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 *Aspergillus 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; SCHOLE, 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 Å 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. 17 $\beta$ -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, n.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](http://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 17 $\beta$ -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](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 traditional 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.

HELPERICH, 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 healing and general factors that influence such healing. **Sports Med Arthrosc**, 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, 2<sup>a</sup> 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](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 anti-angiogenic activity. **Biosci 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.

MOUATSATSOU, 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.; SAMSOE, 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 yogurt 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-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 Biol (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-

glucosidases 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.; GNIADDECKI, 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.