



**Doctorado Biomedicina y Farmacia**

**Evaluación de la biodisponibilidad oral de  
isoflavonas: papel de la microbiota intestinal.**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

Juan Pablo Sánchez Rivera

**Dirigida por:**

María del Val Bermejo Sanz

Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo

Marta González Álvarez

Valencia, 2014





## **Doctorado Biomedicina y Farmacia**

### **Evaluación de la biodisponibilidad oral de isoflavonas: papel de la microbiota intestinal.**

Financiado por:

- Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). AGL 2005-06191-C02-01/ALI.
- Ministerio de Educación y Ciencia (MECD) Fun-C- Food 2010, CSD2007–00063.





## Doctorado Biomedicina y Farmacia

Dra. María del Val Bermejo Sanz, Catedrática Universidad Miguel Hernández; Dra. Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo, Catedrática Universidad de Valencia y Dra. Marta González Álvarez, Profesora Contratada Doctora Universidad Miguel Hernández

### **CERTIFICAN:**

Que Don Juan Pablo Sánchez Rivera, Licenciado en Farmacia por la Universidad de Antioquia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis titulada:

**Evaluación de la biodisponibilidad oral de isoflavonas: papel de la microbiota intestinal**

para la obtención del título de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación, en Burjassot, 06 de Junio de 2014.

Fdo. María del Val Bermejo Sanz

Fdo. Teresa M<sup>a</sup> Garrigues Pelufo

Fdo. Marta González Álvarez



*Dedicado a:*





A los Profesores y PAS del departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica, y en especial, *Ana Melero Zaera, Ana Polache, Carmina Olmos, Carolina Cortell, José Latorre, José Esteban Peris, Luis Granero, Octavio Diez, Pilar Abad, Raquel Talens Visconti, Teodoro Zornoza*, quienes han contribuido a mi crecimiento personal y profesional.

A los Profesores del departamento de Farmacología, *José Luis Ríos Cañavate, Marisa Ferrándiz, María del Carmen Recio, María del Carmen Montesino, Rosa Giner, Pilar D'Ocon*, quienes han profundizado mis conocimientos en farmacología y me han conducido por caminos de la sabiduría acompasado por su amistad.

A los Profesores del departamento de Fisiología, *Juan Sastre, Javier Pereda, Salvador Pérez*, grandes en conocimientos y humildes en su sabiduría.

A la profesora del departamento de Parasitología *Maite Galán*, por apoyarme y compartir momentos inolvidables durante los congresos.

A *Adela Martin Villodre*, la madre de nuestro conocimiento y sabiduría.

A *Juana Alborch* su invaluable respaldo, confianza y apoyo han contribuido a alcanzar mis sueños.



A *Alejandro Orrico, Alba Cortell, Amparo García, Ana Catalán, Ana Martínez Tormos, Carlos Carneiro, Chrissi Mathes, Ingry Higueta, Iris Usach Pérez, Isabel Lozoya, Leidi Vargas, Laura Rodríguez, Lucía Martí Prats, María del Carmen Carceller, Patricia Almudever, Patricia Gandía, Peter Conrad, Raul Montes, Rita Brines, Silvia Mellace, Virginia Pérez, Vandana Shah; Laurence Remy*, a la fuerza de la amistad, la confianza y el apoyo mutuo.

A *Inmaculada Carro, Dolores Gallardo, Begoña Navarro, Concepción Dasí*. A los miembros de la secretaria de la Facultad de Farmacia, por contar con vuestra colaboración en todo momento. A *Carmen, Laureano, Enrique, Pablo, Carlos*, a los miembros de la conserjería de la Facultad de Farmacia y del aulario Interfacultativo, gracias por su todo vuestro apoyo. A *Inmaculada Navarro, Jesús, Ana Flores, María Jesús*, al personal del SCSIE. A *José, Patricia, Ana*, al personal del IATA, por contar vosotros en todo momento.

A mi maestro y gran amigo *Nacho Alcibar*, a mis compañeros y mi familia de judo: *Nacho, Pili, Dani, Lucas, Jaime, Pablo, Alba, Ashiro, Borja, Andrei*, entre otros. Su amistad y confianza me han brindado el crecer al lado vuestro y ser mejor cada día.

A *Laura León, Luz Sánchez, Amparo Marín, Arnulfo, Diana, Elena, Carla Castro, Lina Osorio, Paula Daniela, Fiorela*. A *Doña Lola, Loli, Laura Valles, Cristina Guevara y demás*. Gracias por estar a mi lado y darme la mano cuando más lo necesitaba.



*En la memoria de uno de los grandes profesores que he conocido,  
gracias a la vida por haber compartido sus enseñanzas y sabiduría,  
a **Vicente Germán Casabó Alós.***



A **Jose Vicente Gil**, humilde en conocimiento, noble en amistad, gratitud en colaboración y entendimiento, abierto a descubrir la ciencia en todo momento.

A **Isabel González**, paciente en sabiduría y humilde en amistad. Gracias por contar con vuestro apoyo y conocimiento.

A **Marta González**, humilde en sabiduría, grande en apoyo y confianza e inmensa en facilitar su mano con nobleza para alcanzar las metas anheladas.

A **María del Val Bermejo**, constructora de ideas, ejecutora de proyectos, sabia en enseñar y transmitir sus conocimientos a los demás con entereza y humildad.





*A **Teresa M<sup>a</sup>. Garrigues Pelufo**, diestra en la generosidad del conocimiento, sabia en la profundidad de su ser, humilde en alcanzar las metas, virtuosa en el perfeccionamiento y la nobleza, madre y artífice de mi desarrollo personal y profesional.*



*A mi madre*

*A Isa y Sofia*

*A Alex*

*A los Pérez Garrigues, mi familia española*

*A mi familia*



*Sin vuestro apoyo, paciencia, sabiduría y humildad  
no había sido posible alcanzar mis metas y  
acercarme cada día a lo que anhela mi corazón,  
ser feliz y hacer feliz a los que más quiero,  
a vosotros.*



## Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	27
1.1.	ALIMENTOS ENRIQUECIDOS: MITO O REALIDAD.....	29
1.2.	LAS ISOFLAVONAS .....	36
1.3.	MICROBIOTA BACTERIANA .....	44
1.4.	UTILIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS EN NUEVOS ALIMENTOS. ....	47
1.4.1.	Descripción de las cepas.....	47
1.4.2.	Actividad enzimática.....	59
2.	OBJETIVOS .....	61
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
3.1.	COMPUESTOS ENSAYADOS .....	67
3.2.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	69
3.3.	CEPAS BACTERIANAS.....	70
3.4.	METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	72
3.4.1.	Validación de los métodos analíticos.....	75
3.5.	ENSAYOS CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	77
3.5.1.	Pretratamiento de los animales de experimentación ....	77
3.5.2.	Estudios in situ.....	77
3.5.2.1.	Preparación del animal.....	78
3.5.2.2.	Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado .....	81
3.5.2.2.1.	Estimación de la cinética de hidrólisis .....	82
3.5.2.3.	Ensayo de absorción.....	82
3.5.2.3.1.	Perfusión.....	83
3.5.2.3.2.	Toma de muestra .....	83
3.5.2.3.3.	Ensayo de reabsorción de agua.....	84

3.5.2.3.4. Tratamiento de las muestras .....	85
3.5.2.3.5. Estimación de la cinética .....	85
3.5.3. Estudios in vivo .....	90
3.5.3.1. Procedimiento quirúrgico.....	90
3.5.3.2. Preparación de las muestras.....	92
3.5.3.3. Estudio cinético. Evaluación de la biodisponibilidad. .	93
A. Administración intravenosa. Grupo control. ....	93
B. Vía de administración oral.....	94
3.5.3.4. Análisis estadístico de los datos.....	95
3.5.4. Pruebas estadísticas .....	95
4. RESULTADOS .....	99
4.1. CAPACIDAD HIDROLÍTICA Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS ...	101
4.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	104
4.2.1. Estudio in situ .....	104
4.2.2. Estudio in vivo.....	111
A. Vía de administración intravenosa.....	111
B. Vía de administración oral .....	116
4.3. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN IN SITU .....	119
4.3.1. Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado.....	119
4.3.2. Estudios de absorción mediante la técnica Doluisio.....	122
4.3. ESTUDIOS IN VIVO.....	139
4.3.1. Cinética plasmática de las isoflavonas.....	139
A. Grupo control.....	139
4.3.2. Resumen. ....	148
5. DISCUSIÓN.....	153
5.1. CAPACIDAD HIDROLÍTICA Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	155
5.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS.....	155



25	Índice	
5.2.1.	Estudios in situ .....	156
5.2.2.	Estudios in vivo .....	156
A.	Vía de administración intravenosa .....	156
B.	Vía de administración oral.....	157
5.3.	ESTUDIOS IN SITU .....	157
5.3.1.	Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado .....	157
5.3.2.	Ensayo de absorción.....	158
5.4.	ESTUDIOS IN VIVO.....	163
5.4.1.	Cinéticas plasmáticas: grupo control .....	163
5.4.1.1.	Elección del modelo cinético .....	163
5.4.1.2.	Estimación de la biodisponibilidad oral en el grupo control .....	164
5.4.1.3.	Influencia del pretratamiento con cepas bacterianas en la biodisponibilidad.....	167
6.	CONCLUSIONES .....	171
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	175
8.	GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y TÉRMINOS.....	195
9.	ANEXOS .....	203



## **1. INTRODUCCIÓN**



### **1.1. Alimentos enriquecidos: mito o realidad**

La relación entre salud y alimentación se conoce desde antiguo. Ya Hipócrates acuñó la frase: “Que la comida sea tu alimento y el alimento tu medicina”, en el s. V a.C. En las últimas décadas del s. XX se ha reforzado esta idea gracias, en parte, a los numerosos avances científicos<sup>1</sup> en el área de la Microbiología y la Inmunología y al creciente interés por mantener la calidad de vida durante la etapa de envejecimiento. En relación a este último aspecto, se ha demostrado la importancia de la calidad alimentaria para la seguridad del ciudadano<sup>2,3</sup>. Además, existen evidencias de la influencia de los hábitos dietéticos en el desarrollo de numerosas patologías. Asimismo, estudios epidemiológicos rigurosos<sup>4,5</sup> han permitido constatar el papel de nutrientes y determinados complementos alimenticios en la prevención de la enfermedad y en la mejora de la salud.

En nuestro país, esta relación ya tuvo reflejo a nivel legal en la Ley General de Sanidad<sup>6</sup> que estableció en el artículo 18, como una de las actuaciones sanitarias del Sistema Nacional de Salud, el «control sanitario y la prevención de los riesgos para la salud derivados de los productos alimentarios, incluyendo la mejora de sus cualidades nutritivas». Desde esta publicación, se han sucedido distintas normas a nivel nacional y comunitario que integran alimentación y salud en algún sentido<sup>7,8</sup>.

Por otra parte, durante los últimos años del siglo pasado, aparecieron en el mercado un gran número de alimentos enriquecidos con diferentes nutrientes y otros compuestos. La oferta cada vez es

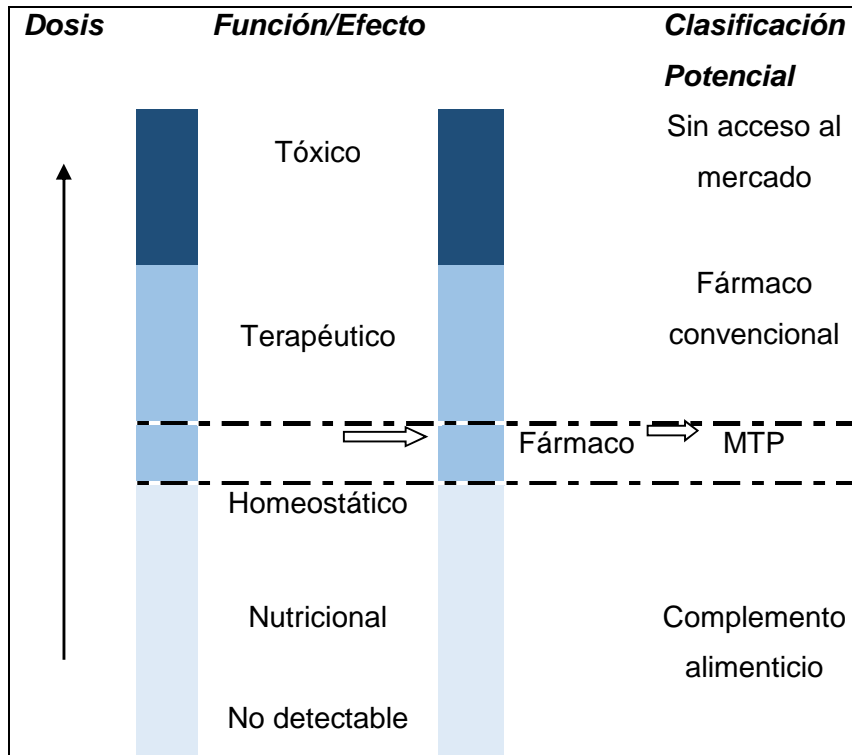
mayor. En general, se trata de productos que se presentan como beneficiosos para el organismo humano<sup>9</sup>. Su consumo también ha ido en aumento, puesto que la sociedad concede cada vez mayor importancia a la alimentación y su relación con la salud<sup>10,11</sup>.

Paralelamente se ha desarrollado un amplio sector de complementos alimenticios, cuya finalidad es complementar la dieta normal ya que, aunque en circunstancias normales una dieta adecuada y equilibrada proporciona todos los nutrientes necesarios. Las investigaciones realizadas<sup>12,13</sup> demuestran que esta situación ideal no se da en la práctica para todos los nutrientes, ni para todos los grupos de población. Se consideran complementos o suplementos alimenticios aquellos que se presentan como fuentes concentradas de nutrientes e incluyen, entre otros, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibra, diversas plantas y extractos de las mismas.

La normativa<sup>14</sup> prohíbe expresamente atribuir a un alimento propiedades de prevención, tratamiento o curación de una enfermedad humana, o cualquier referencia a estas propiedades. Sin embargo, permite la utilización de declaraciones de propiedades saludables en el etiquetado, la presentación y la publicidad de los alimentos comercializados en la Comunidad Europea, siempre que tengan un fundamento científico y estén previamente autorizadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, en sus siglas inglesas).

Esta distinción plantea, incluso desde un punto de vista legal, el problema de cómo diferenciar entre efectos medicinales y efectos sobre la salud. Las acciones de la mayoría de sustancias sobre el

organismo suponen cambios continuos y graduales en respuesta a la dosis, forma, susceptibilidad individual y circunstancias de administración. Esto conlleva que el establecimiento de un punto de corte entre efecto terapéutico y efecto sobre la salud sea a veces un tanto artificial. Se ha propuesto<sup>15</sup> como criterio, la dosis ya que de ella depende el efecto terapéutico. La idea básica se esquematiza en la figura 1.1 que permite visualizar cómo el punto de corte está poco definido como consecuencia inevitable de la amplitud de los términos que utilizan.



**Figura 1.1.** Acciones de las sustancias sobre el organismo (Tomado de Coppens et al)<sup>15</sup>. MTP: Medicamento tradicional a base de plantas.

La normativa europea al respecto establece que en el caso de que un producto supuestamente medicinal pueda encuadrarse dentro de alguna otra categoría (alimento, complemento alimenticio, cosmético) debe considerarse bajo la perspectiva menos restrictiva, es decir, no ha de someterse a la legislación sobre medicamentos. En todo caso, son las autoridades nacionales las que atribuyen una u otra condición a cada producto y, por tanto, las que se responsabilizan de procesos de autorización previos a su puesta en el mercado.



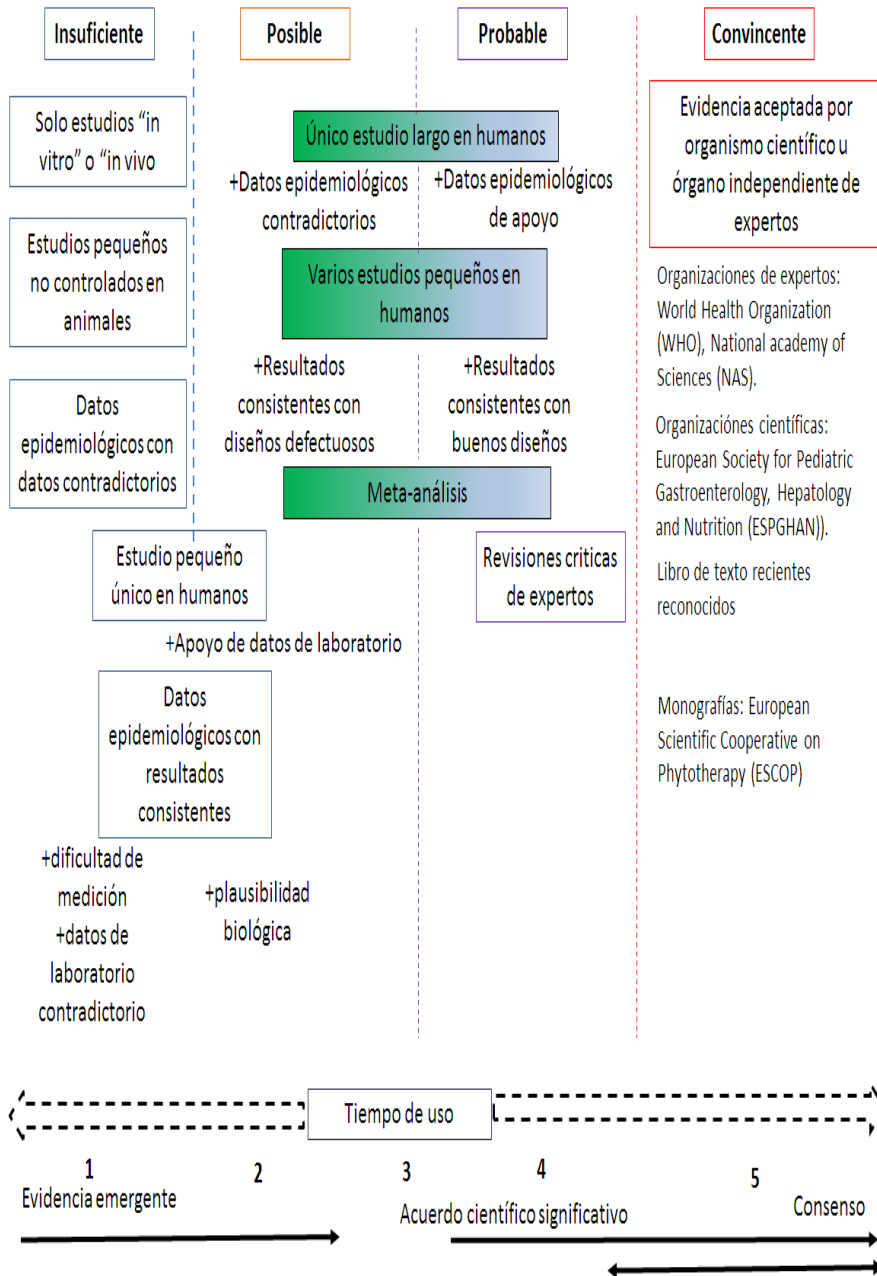
Aunque se reconoce de forma general el papel de los alimentos enriquecidos o complementos alimenticios en la salud, su creciente importancia está generando situaciones de incertidumbre científica respecto a su influencia, positiva o negativa. Actualmente, se revisan los datos de seguridad y se estudia la evidencia científica disponible al respecto de su actividad siguiendo las recomendaciones de la Directiva de suplementos alimentarios (2002/46/EC)<sup>7</sup>. En España se traspuso en el Real Decreto 1487/2009<sup>8</sup>, de 26 de septiembre que estableció, entre otros aspectos, los requisitos para la comercialización de los complementos alimenticios, incluyendo su etiquetado, presentación y publicidad. Además, se determinó las vitaminas y minerales que se pueden utilizar en la fabricación de complementos alimenticios, así como las sustancias o sales que pueden servir como fuentes de vitaminas o minerales.

A nivel europeo, la European Food Safety Authority (EFSA) es el organismo encargado de autorizar la declaración de propiedades saludables, después de una evaluación científica. El problema surge al trasladar los principios básicos de la fundamentación científica, ya bien asentados, a este contexto. Tanto a nivel académico como industrial se ha expresado dudas acerca del tratamiento de estos datos y se ha resaltado la necesidad de alcanzar un consenso científico<sup>16</sup>. Para los medicamentos se reconocen diferentes grados de evidencia científica que avalan con distinta magnitud la seguridad y eficacia necesarias para ser considerados como tales. En el caso de los medicamentos a base de plantas medicinales, la evidencia se constituye sobre fuentes bibliográficas que se basan en los criterios de la Agencia Americana de Políticas e Investigación sobre la Salud y la

OMS. Estos criterios consisten en dar cabida a autorizaciones en las que no es necesario suministrar resultados de ensayos preclínicos y clínicos. En estos casos se considera la evidencia que aportan referencias científicas respecto a la eficacia reconocida y un aceptable nivel de seguridad. Actualmente, la clasificación de la evidencia está sufriendo un proceso de adaptación para incluir el uso tradicional de productos medicinales como grado de evidencia adicional en ausencia de otra evidencia científica.

La OMS y el Fondo Mundial para la investigación del Cáncer han establecido, en el campo de los alimentos, cuatro grados de evidencia: convincente, probable, posible e insuficiente. Estas definiciones tienen que ser desarrolladas para cubrir la interpretación de otros estudios humanos y otros tipos de investigación como estudios *in vitro* y en animales. Sería interesante hacer un esfuerzo conjunto para promover una definición consensuada del grado de evidencia en el campo de propiedades saludables de los complementos alimenticios.

Un marco aceptado sobre la evaluación de la evidencia se muestra en el trabajo de Richardson<sup>16</sup> que se esquematiza en la tabla 1.1.

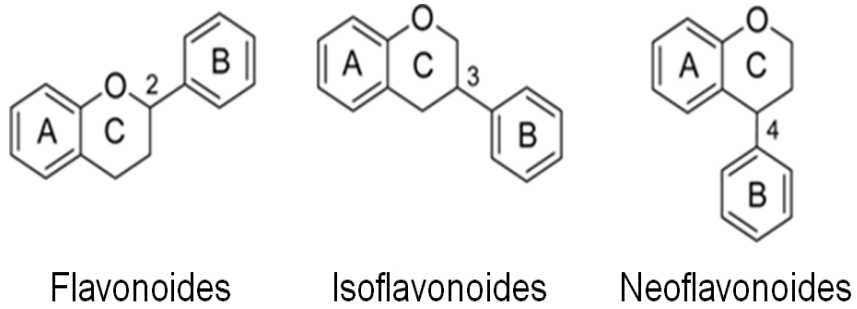


**Tabla 1.1.** Representación esquemática de la escala de evidencia, (Adaptada de Richardson)<sup>16</sup>.

Si la evidencia científica constituye un reto en su definición, más complicado aún es agrupar los conocimientos al respecto de los temas que se abordan ya que en ocasiones no se plantean como estudios rigurosos sino que se infieren de prácticas tradicionales en los que concurren muchas otras variables además del factor en estudio. En los últimos años uno de los campos en los que se ha llevado a cabo una investigación más intensa es el papel de las isoflavonas en la salud y los cambios en el efecto que ejercen según la composición de la microbiota. En concreto, poco se conoce del efecto que origina la coadministración de varias de estas sustancias o complementos. En el presente proyecto se estudia la interrelación de las isoflavonas y la microbiota. Ambas se utilizan con frecuencia en condiciones de premenopausia o durante el climaterio para compensar trastornos asociados al mismo (sofocos, estreñimiento, etc). Se revisa, a continuación, la información más relevante al respecto de uno y otro grupo.

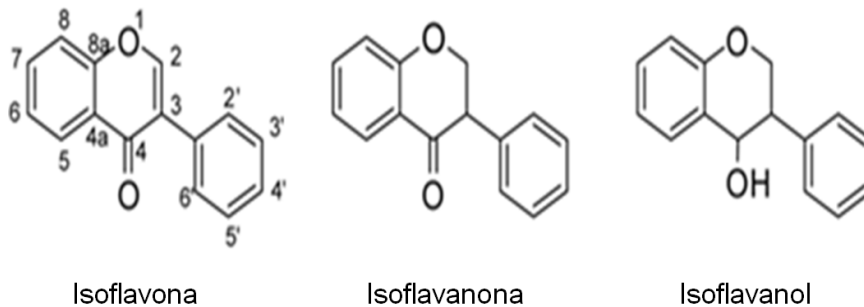
## **1.2. Las isoflavonas**

Son productos que tienen una estructura basada en  $C_6-C_3-C_6$  de carbono, o fenilbenzopirano (o cromano)<sup>17</sup>. Se clasifican según la posición en que está unido el anillo aromático al benzopirano, en tres subclases: flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides (figura 1.2)<sup>18</sup>.



**Figura 1.2.** Estructura básica de flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides (Tomado de Kim, M. 2008)<sup>18</sup>.

La estructura de isoflavonoides presenta, asimismo, una gran variedad de estructuras, que se clasifican en isoflavonas, isoflavanonas e isoflavanoles de acuerdo a su funcionalidad en el C1 a C3. Estos compuestos juegan un papel importante en las interacciones planta-entorno, así como en la nutrición humana y la medicina. Por su utilización, destacan las isoflavonas, cuya estructura y sistema de numeración se muestra en la figura 1.3<sup>18</sup>.



**Figura 1.3.** Estructura, nombre y sistema de numeración de los isoflavonoides simples (Tomado de Kim, M. 2008)<sup>18</sup>.

Las isoflavonas se encuentran de manera habitual en plantas de la familia Leguminosae. En la dieta humana, la mayor fuente de

isoflavonas es la soja, que se consume sobre todo en los países asiáticos. No obstante, en nuestro entorno se demuestra un interés creciente en la misma y en sus derivados. Datos recientes (tabla 1.2)<sup>19</sup> recogen datos sobre la ingesta diaria de isoflavonas en España y otros países de la Unión Europea.

Países Europeos	N	Isoflavonas (mg/día) en hombres	N	Isoflavonas (mg/día) en mujeres
<b>España</b>	355	0.33±0.27	289	0.17±0.29
<b>Italia</b>	361	0.39±0.29	502	0.41±0.26
<b>Grecia</b>	1314	0.24±0.14	1373	0.22±0.13
<b>Francia</b>	-	-	1184	1.13±0.16
<b>Alemania</b>	1134	0.75±0.15	1074	0.56±0.15
<b>Holanda</b>	1024	0.73±0.16	1478	0.77±0.13
<b>Reino Unido</b>	258	11.73±0.26	384	10.23±0.28
<b>Dinamarca</b>	9620	0.60±0.17	997	0.46±0.18
<b>Suecia</b>	1383	0.85±0.14	1643	0.89±0.12
<b>Noruega</b>	-	-	899	1.29±0.17

**Tabla 1.2.** Comparativa del consumo diario de isoflavonas en países europeos (Adaptado de Zamora, R. 2012). N= número de individuos.

La tabla 1.2 y la figura 1.4 muestran que los países mediterráneos muestran menor consumo de isoflavonas (0.47 mg/día)<sup>20-23</sup>, especialmente Grecia<sup>23</sup> y España<sup>20</sup>. Por el contrario, la población del Reino Unido<sup>24</sup> los consume en mayor medida (2.34 mg/día).



**Figura 1.4.** Datos más relevantes de consumo de isoflavonas a nivel mundial (Adaptado de Zamora, R. 2012). Los consumos están expresados en mg/día.

Como se ha comentado, los mayores consumidores a nivel mundial son los países asiáticos. Las poblaciones de China y Japón tienen los consumos más altos de isoflavonas en todo el mundo, que van desde 27.1 hasta 68.6 mg/día<sup>25-28</sup>, ya que la soja es una fuente de alimentación importante en esa región.

En otros países, el consumo es menor como es el caso de Canadá<sup>29</sup> (0.31 mg/día) y EE.UU<sup>30,31</sup> (alrededor de 1.1 mg/día).

Diferentes estudios epidemiológicos relacionan los datos de consumo de fitoestrógenos (entre los que se encuentran las isoflavonas) con la protección frente a ciertas patologías. Estudios realizados en Suecia parecen asociar una mayor ingesta de fitoestrógenos con una disminución en el riesgo de padecer cáncer de próstata<sup>32</sup>. También los fitoestrógenos parecen proteger frente al cáncer de mama<sup>29,28,25</sup> por un mecanismo mediado por el receptor estrogénico. Asimismo, otros estudios realizados en distintos países (Reino Unido, Grecia, Italia, China, Japón) sugieren la relación entre estos compuestos y la reducción en el riesgo de distintas patologías como cáncer colorrectal y de próstata<sup>33</sup>, enfermedad oclusiva arterial periférica<sup>21</sup> y cáncer faríngeo<sup>22</sup>. Lo anterior nos indica que se ha llevado a cabo una intensa investigación sobre las isoflavonas de la soja debido a su posible papel como agentes preventivos de la aparición de enfermedades.

Las isoflavonas están incluidas dentro del grupo de los fitoestrógenos, que son compuestos estrogénicos de origen natural. En este sentido se ha establecido una relación entre el uso terapéutico de las isoflavonas y la mejora de los síntomas de las mujeres en la etapa postmenopáusica<sup>34-36</sup>. La Sociedad Norteamericana de Menopausia recomienda que “para las mujeres con sofocos frecuentes, los médicos pueden considerar la recomendación de los complementos alimenticios con isoflavonas de la soja”<sup>37</sup>. Algunos investigadores<sup>36,38,39</sup> han descrito este efecto y lo han comparado con



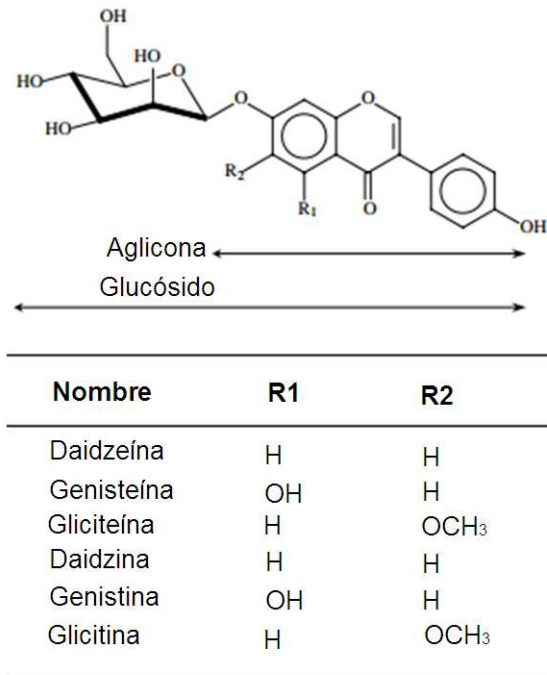
la terapia hormonal; sin embargo concluyen que no existe evidencia suficiente para su uso en reemplazo de la terapia<sup>36</sup>

Las isoflavonas son estructuralmente muy similares a los estrógenos de los mamíferos, y esta similitud es incluso mayor cuando las comparamos con los metabolitos bacterianos de las isoflavonas, como es el caso del equol. Sobre la base de su estructura, no es extraño que las isoflavonas se unan a los receptores estrogénicos; sin embargo, sus acciones se parecen más a las de agonistas o antagonistas parciales de los estrógenos, un concepto que todavía es difícil de comprender pero que continúa fascinando a los bioquímicos y endocrinólogos. Las moléculas con actividad estrogénica pueden actuar como antagonistas en función del número de receptores, su ocupación y la concentración del estrógeno competidor. La existencia de al menos dos tipos de receptores estrogénicos complica aún más la comprensión del mecanismo de acción de las isoflavonas. Cada receptor tiene funciones diferentes en la regulación génica, y se encuentran distribuidos de diferente forma dependiendo del tejido, lo que podría explicar la acción selectiva de los estrógenos dependiendo del órgano que consideremos. La afinidad de las isoflavonas y otros xenoestrógenos parece ser mayor para los receptores  $\beta$  recientemente descubiertos que para los clásicos, lo que sugiere que este nuevo receptor y otros todavía por descubrir pueden ser muy importantes en la acción no-esteroide de los estrógenos<sup>9</sup>.

Uno de los principales problemas para establecer la relación causal entre el consumo y los efectos en el organismo, es que las fuentes de isoflavonas, como productos naturales que son, contienen mezclas de diversas estructuras.

La forma mayoritaria suele ser el glucósido conjugado. Sin embargo, numerosos estudios farmacológicos han demostrado que los efectos de las isoflavonas sobre la salud son producidos mayoritariamente por las agliconas de dichos compuestos y no por sus glucósidos<sup>40,41</sup>. Es por ello que determinar en qué medida se produce la transformación de los conjugados en agliconas y cómo afecta ese proceso a la biodisponibilidad de cada uno de los componentes de la mezcla natural, es esencial para comprender su efectividad y establecer la relación dosis efecto, así como justificar la variabilidad interindividual.

Las isoflavonas mayoritarias de la soja son la daidzeína, la genisteína y, en menor proporción, la gliciteína (figura 1.5). En la soja se encuentran, como se ha comentado, en forma de glucósidos conjugados que reciben el nombre de daidzina y genistina, respectivamente<sup>42</sup>.



**Figura 1.5.** Clasificación y estructura de las isoflavonas (Tomado de Peñalvo, J.2004)<sup>42</sup>

Los glucósidos no se absorben a nivel intestinal. Sólo se produce absorción si se hidrolizan a agliconas (genisteína, daidzeína y su metabolito equol) por glucosidasas, que son enzimas producidas por la flora intestinal y, en particular por los lactobacilos. En esencia, una vez ingerido el glucósido, por ejemplo la daidzina, es parcialmente hidrolizada a la aglicona en el intestino delgado (en este caso la daidzeína), y ésta es la que se absorbe a través del epitelio intestinal<sup>43</sup>. Una parte considerable no se hidroliza y, en consecuencia no se absorbe y llega hasta el colon junto con una cantidad de daidzeína libre que es secretada al final del intestino delgado por la circulación enterohepática<sup>44</sup>. Ciertas situaciones, tales como el uso de antibióticos

o algunas enfermedades que reducen el número y la actividad de la flora intestinal, pueden por tanto influir negativamente en la absorción y la acción de las isoflavonas. Del mismo modo, una mejora en la calidad/cantidad de la flora intestinal podría suponer un incremento en la absorción de las isoflavonas, ya que en el colon la microbiota ejerce una acción fundamental al desglicosilar la fracción conjugada<sup>45-47</sup> y metabolizar las agliconas correspondientes<sup>48</sup>.

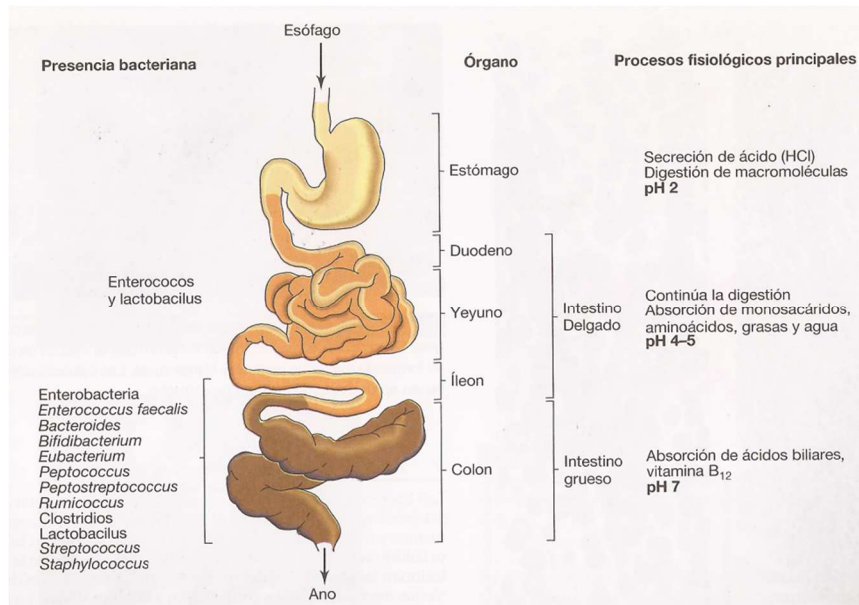
Numerosos estudios muestran una gran variabilidad interindividual tanto en parámetros de absorción como metabolismo y excreción<sup>49-51</sup> de isoflavonas después de la administración de la soja o preparaciones que la contienen. Esto podría estar relacionado con diferencias en la composición de la microbiota.

No existe todavía un cuerpo de doctrina consolidado sobre esta cuestión. Un aspecto importante al respecto es la farmacocinética de estos compuestos. Su conocimiento, en especial la biodisponibilidad oral en diferentes condiciones, podría esclarecer algunos resultados aparentemente contradictorios. En concreto, ha recibido menor atención hasta el momento la influencia que puede tener su ingesta en la absorción, e incluso disposición, de otros nutrientes y medicamentos.

### **1.3. Microbiota bacteriana**

La microbiota comprende la población microbiana habitual del tracto digestivo. Su composición y ubicación es diferencial según la zona que se considere. En la figura 1.6 se muestra un esquema del tracto gastrointestinal y la distribución de los microorganismos no patógenos en individuos sanos. Además, se indican los procesos

fisiológicos principales en función de su órgano a nivel del tracto gastrointestinal.



**Figura 1.6.** Presencia bacteriana en función de la localización a nivel del tracto gastrointestinal<sup>52</sup> (Tomado del libro Brock Biología de los microorganismos)

En el estómago existe una barrera de defensa que no permite la entrada de bacterias extrañas al tracto que consiste en la secreción activa de ácido clorhídrico, que provoca un pH muy ácido incompatible con el desarrollo microbiano. Por ello no existe una microbiota propia en el estómago<sup>52</sup>.

Sin embargo, el intestino desempeña un papel crucial ya que contiene una microflora abundante que contribuye al desarrollo anatómico, fisiológico e inmunológico del huésped<sup>53</sup>. La microbiota se compone de especies pertenecientes a las familias *Bacteroides*,

*Fusobacterium*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*<sup>54</sup>. La flora dominante está constituida por bifidobacterias y lactobacilos que representan el 90% de la población<sup>55</sup>. El *Enterococcus coli* y las diferentes especies de *Escherichia* suponen menos del 1% de todos los microorganismos del intestino. Las diferentes especies bacterianas son capaces de sobrevivir y realizar su actividad en entornos específicos como son las mucosas de las membranas. En la membrana del segmento distal del intestino delgado y en la parte proximal del colon, se concentra el 99% de toda la población bacteriana<sup>56</sup>. En estas superficies viven más de 1000 bacterias de unas 200 especies y de 40 – 50 géneros.

La colonización bacteriana del intestino sufre cambios en función de la edad y está influenciada por los factores bacterianos de fijación, la inmunidad local y el fenómeno de la resistencia a la colonización<sup>55</sup>.

Una de las funciones de la flora intestinal es actuar como mecanismo de defensa. Cuando un agente patógeno entra en contacto con la mucosa gastrointestinal se pone en marcha el sistema inmune secretor. En las secreciones intestinales de mamíferos, el isotipo predominante de anticuerpos es la IgA secretora (sIgA). Los receptores específicos de la Ig polimérica (pIgR) son cruciales para el transporte selectivo de inmunoglobulinas al lumen intestinal. También están presentes en las secreciones intestinales las inmunoglobulinas de clases IgG e IgM, que varían en cantidad e isotipo de acuerdo a la variedad animal. Las secreciones gastrointestinales son producidas por la acción de enzimas proteolíticas<sup>57</sup>. La producción de los anticuerpos de IgA específicos es la respuesta típica del sistema

inmune secretor<sup>58</sup>, contra los antígenos lumbinales para prevenir otras respuestas posteriores en la superficie epitelial. El mantenimiento de la capa epitelial, la producción de moco, glicolípidos, péptidos citoprotectores y sustancias como antibióticos<sup>59</sup>, también suponen estrategias de protección. Además la microflora protectora produce factores regulatorios tales como ácidos grasos de cadena corta y supone un efecto de barrera contra los patógenos problemáticos por su competencia por receptores y sustratos metabólicos. Se considera que uno de los mayores órganos inmunes del cuerpo, en donde han sido identificados todos los tipos de células inmunocompetentes, es la capa de mucosa intestinal<sup>60</sup>. En este sentido, la flora bacteriana es una diana terapéutica para la capacidad de defensa del individuo.

#### **1.4. Utilización de cepas bacterianas en nuevos alimentos.**

##### **1.4.1. Descripción de las cepas.**

El interés científico en la flora intestinal se remonta a finales del s. XIX, cuando los microbiólogos<sup>61-63</sup> estudiaron la microbiota intestinal y sus cambios en respuesta a variaciones de la dieta. Estos estudios permitieron postular la repercusión de su ingestión en la salud, pero realmente no tuvo una resonancia científica hasta los trabajos del Premio Nobel Iliá Metchnikoff y su teoría de la auto-intoxicación, según la cual existen microorganismos intestinales perjudiciales que pueden provocar un envenenamiento gradual del organismo y que la presencia de leche cultivada contribuye a disminuir dicha intoxicación<sup>64</sup>. Minoru Shirota en Japón también defendió en los foros científicos la importancia de la medicina preventiva y, en particular, la posibilidad de modularla microflora intestinal con fines terapéuticos. A este concepto contribuyó eficazmente el aislamiento

en 1930 de una cepa de *Lactobacillus* capaz de sobrevivir al paso a través del tracto intestinal, lo que consolidó la idea de que se podía utilizar para obtener beneficios en la salud.

En la tabla 1.3 se exponen algunas de las descripciones y definiciones que se han dado del fenómeno de utilización de microorganismos a lo largo de los años. Aunque en la literatura se utiliza habitualmente término de probiótico, estrictamente está restringido a las cepas bacterianas que tienen un efecto demostrado sobre la salud. En tanto no se demuestra taxativamente la existencia del efecto se prefiere utilizar el concepto de cepas bacterianas que es el que utilizaremos en esta tesis doctoral.

Año	Descripción	Fuente
1953	Las cepas bacterianas son comunes en alimentos vegetales.	Kollath <sup>65</sup>
1954	Las cepas bacterianas son lo contrario de los antibióticos	Vergin <sup>66</sup>
1955	Los efectos indeseados de los antibióticos se pueden prevenir por la terapia probiótica.	Kolb <sup>67</sup>
1965	Una sustancia secretada por un microorganismo que estimula el crecimiento del otro.	Lilly y Stillwell <sup>68</sup>
1971	Extractos de los tejidos que estimulan el crecimiento microbiano.	Sperti <sup>69</sup>
1973	Compuestos que acumulan resistencia a la infección en el huésped, sin embargo no inhiben el crecimiento de microorganismos in vitro.	Fujii y Cook <sup>70</sup>
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal	Parker <sup>71</sup>
1992	Suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando el equilibrio microbiano	Fuller <sup>72</sup>
1992	Cultivo mixto o individual de microorganismos aplicados a los animales o al hombre, que producen un efecto beneficioso en el huésped mediante la mejora de las propiedades de la microflora indígena	Havenaar y Huis int 'Veld <sup>73</sup>




1996	Cultivo vivo microbiano o producto lácteo elaborado que influye beneficiosamente en la salud y la nutrición del huésped.	Salminen <sup>74</sup>
1996	Microorganismos vivos que cuando se ingieren en cantidades determinadas, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica inherente.	Schaafsma <sup>75</sup>
1999	Preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped.	Salminen, Ouwehan, Benno y Lee <sup>76</sup>
2001	Una preparación o un producto que contiene microorganismos viables, definidos en número suficiente, que alteran la microflora (por implantación o colonización).	Schrezenmeir y Vrese <sup>77</sup>
2002	Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidad adecuada confieren un beneficio de salud al huésped.	FAO/WHO <sup>78</sup>

**Tabla 1.3.** Descripciones y definiciones que se ha dado del término a las cepas bacterianas a lo largo de los años (Tomado de Vasiljebic, T. 2008)<sup>79</sup>.

Siguiendo las recomendaciones del grupo de trabajo de la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ World Health Organization (WHO) para la evaluación de probióticos en los alimentos (2002), se pueden considerar probióticos potenciales a muchos géneros y especies<sup>80</sup>. Desde un punto de vista comercial, no obstante, las cepas más importantes son las bacterias ácido-lácticas (BAL).

Las BAL son bacterias Gram positivas, desprovistas de citocromos, anaerobias, que toleran condiciones aerobias y el medio ácido, fermentadoras estrictas y productoras de ácido láctico como principal metabolito. Entre las mismas destacan los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*.

En España son muchos los derivados lácteos adicionados de cepas bacterianas. La tabla 1.4 (A, B y C) muestra algunos de los productos de los fabricantes más conocidos y las cepas bacterianas que contienen<sup>81</sup>.

Fabricante	Producto	Cepas	Marca
 <a href="http://www.tmdb.de/eu/marke/Bio-tierno_El_Ventero">http://www.tmdb.de/eu/marke/Bio-tierno_El_Ventero</a>	Bio el Ventero	<i>Bifidus active</i>	El Ventero
 <a href="http://www.garciabaquero.com/">http://www.garciabaquero.com/</a>	Bio queso natural	<i>Bifidus lactis, Lactobacillus acidophilus</i>	García-Baquero
 <a href="http://www.triballat.fr/vrai.html">http://www.triballat.fr/vrai.html</a>	Vrai (queso fresco)	<i>Bifidus, Lactobacillus acidophilus</i>	Triballat

**Tabla 1.4.A.** Derivados lácteos probióticos (Quesos) que se comercializan en España (Adaptado de Sanz, 2003)<sup>81</sup>.

Fabricante	Producto	Cepas	Marca
 <p><a href="http://www.danone.es/">http://www.danone.es/</a></p>	Bio Bio fibra Actimel	<i>Bifidus essencis</i> <i>Bifidus essencis</i> <i>L. casei</i> inmunitas	Danone
 <p><a href="http://www.empresa.nestle">http://www.empresa.nestle</a></p>	LC1 LC1 GO Bio calcio Sveltesse Bio Calcio plus Nidina Native 2	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>johnsonii</i> <i>Bifidus Lactis</i> <i>Bifidus Lactis</i> <i>Bifidus Lactis</i> <i>Bifidus,</i> <i>Streptococcus</i> <i>thermophiles</i>	Nestlé
 <p><a href="http://www.centralecheraasturiana.es/">http://www.centralecheraasturiana.es/</a></p>	Bio yogur Natur activa	<i>Bifidobacterias</i> <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	Central Lechera Asturiana
 <p><a href="http://brandinside.de/marke">http://brandinside.de/marke</a></p>	Bio Clesa	<i>Bifidus active</i>	Clesa

**Tabla 1.4.B.** Algunos yogures que se comercializan en España  
 (Adaptado de Sanz, 2003)<sup>81</sup>.

Fabricante	Producto	Cepas	Marca
 <p><a href="http://www.hero.es/">http://www.hero.es/</a></p>	Hero Baby 2 y Junior 3	<i>Bifidus B<sub>B</sub> y B<sub>L</sub></i>	Hero
 <p><a href="http://kaiku.es/">http://kaiku.es/</a></p>	Bio Kaiku  ACTIF	<i>Bifidus active</i>  <i>Lactobacillus LGG</i>	Kaiku
 <p><a href="http://www.santiveri.es/">http://www.santiveri.es/</a></p>	ProBifidus	<i>Lactobacillus acidophilus,</i> <i>Lactobacillus gaserii,</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Santiveri

**Tabla 1.4.C.** Otros derivados lácteos probióticos que se comercializan en España (Adaptado de Sanz, 2003)<sup>81</sup>.

La selección de las distintas cepas obedece a razones fisiológicas y también tecnológicas. Gordon, Macrae y Wheather<sup>82</sup> definieron las condiciones para que produzcan efectos beneficiosos en el huésped. La cepa bacteriana debe ser elegida entre las que están presentes de manera fisiológica en el intestino, no debe ser patógena y se debe incluir en concentraciones que permitan la colonización ( $10^7$ - $10^9$ cfu/mL de un producto). Aunque hay una amplia variabilidad de criterios de selección estándar se aceptan como tales los que se muestran en la tabla 1.5<sup>79</sup>. La clasificación taxonómica juega un papel determinante en la selección de un probiótico, la cual puede indicar su origen, hábitat y fisiología de bacterias. Además del criterio ambiental se deben incluir otros criterios en la selección como son los tecnológicos, funcionales y fisiológicos. Otra cuestión relevante es la utilización de cepas resistentes a antibióticos puesto que los genes que codifican la resistencia, especialmente cuando depende de plásmidos<sup>83</sup>, pueden transferirse entre microorganismos.

General	Propiedad
Criterios ambientales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Origen</li> <li>- Patogenicidad e infectividad</li> <li>- Factores de virulencia</li> <li>- Toxicidad, actividad metabólica</li> <li>- Propiedades intrínsecas (resistencia antibiótica)</li> </ul>
Criterios tecnológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estabilidad genética</li> <li>- Viabilidad deseada durante el procesamiento y almacenamiento</li> <li>- Buenas propiedades sensoriales</li> <li>- Producción a gran escala</li> </ul>
Criterios Funcionales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolerancia a jugos y ácidos gástricos</li> <li>- Tolerancia a la bilis</li> <li>- Adhesión a la superficie de la mucosa</li> <li>- Efectos validados y documentados sobre la salud</li> </ul>
Criterios fisiológicos deseables	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inmunomodulación</li> <li>- Actividad antagonista hacia patógenos gastrointestinales (<i>Helicobacter pylori</i>, <i>Candida albicans</i>)</li> <li>- Metabolismo del colesterol</li> <li>- Metabolismo de la lactosa</li> <li>- Propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.</li> </ul>

**Tabla 1.5.** Criterios deseables y claves para la selección de las cepas bacterianas en aplicaciones comerciales. (Tomado de Vasiljebic, T. 2008)<sup>79</sup>

La utilización de las BAL se considera segura, por la larga tradición en el consumo de las mismas, especialmente en productos derivados de la leche. Sin embargo, es importante destacar que se han comunicado casos en los que su ingesta se ha asociado a efectos nocivos. Concretamente, algunas cepas de *Lactobacillus* se aislaron en sangre e infecciones locales<sup>84,85</sup>.

En cuanto a las propiedades beneficiosas para la salud, algunas están bien documentadas mientras que otras proceden de datos obtenidos a partir de modelos animales en los que se ha demostrado su potencial terapéutico<sup>64</sup>, pero están pendientes de ser evaluadas científicamente en humanos. En todo caso, es un acuerdo general que los beneficios son específicos de cada cepa.

Entre las BAL se reconocen numerosos géneros con propiedades beneficiosas para la salud. Bacterias como las *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* renuevan la flora intestinal, previenen enfermedades diarreicas, cáncer de colon e hipercolesterolemia, al optimizar la salud intestinal. Asimismo contribuyen a prevenir cáncer y enfermedades cardiovasculares, entre otras<sup>86</sup>.

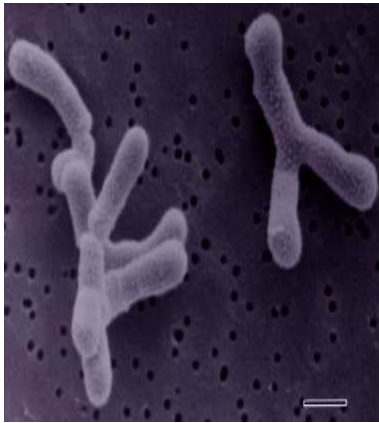
En este trabajo se ha utilizado cepas de *B. adolescentis*, *B. animalis subsp. lactis*, *L. casei* y *L. plantarum*, cuyas características esenciales se resumen en los párrafos siguientes.

- *Bifidobacterium*:

Las *Bifidobacterium* son un tipo de microorganismos presentes de manera habitual en el intestino humano que pertenecen a la clase Actinobacteria. Son bacilos, de forma variada (habitualmente curvos), anaerobios y con dimensiones comprendidas entre 0.5-1.3 x 1.5-8 µm.

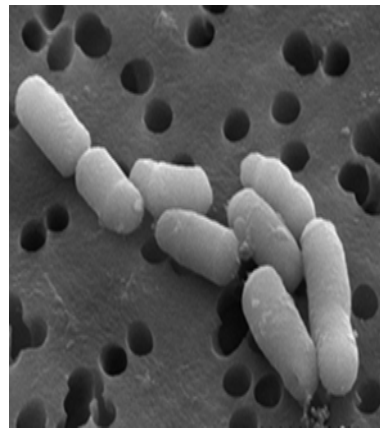


Las células pueden ser ramificadas o tener forma de maza; se disponen en parejas a menudo en forma de V. Fermentan hidratos de carbono a acetato y lactato pero no a  $\text{CO}_2$ <sup>87</sup>. Estas bacterias juegan un papel esencial en el mantenimiento de la salud, dado el beneficio metabólico y las funciones de protección que aportan<sup>88,89</sup>. Es el género bacteriano intestinal predominante durante el primer año de vida en los bebés alimentados con leche materna pero se convierte cuantitativamente en menos importante en la microbiota del adulto<sup>90,91</sup>. La cepa de *B. adolescentis* (figura 1.7) ha demostrado ser más pro inflamatorio y no tener efectos en la inmunidad<sup>92,93</sup>.



**Figura 1.7.** *B. adolescentis*

<http://microbewiki.kenyon.edu/images/0/06/Bifidobacterium.jpg>



**Figura 1.8.** *B. animalis subsp. lactis*

<http://www.probiotic-cn.com>

La especie *B. animalis subsp. lactis* (figura 1.8) se encuentra en el intestino de adultos y niños sanos<sup>94</sup>. Algunas cepas de *B. animalis subsp. lactis* son capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal. Para modificar la flora fecal se adhieren a las células epiteliales humanas in vitro, y así modulan la respuesta inmune del

huésped, además de prevenir la gastroenteritis y la colitis microbiana<sup>95-98</sup>.

Los beneficios asociados a las cepas bacterianas de *B. animalis subsp. lactis* han dado lugar a su inclusión en la dieta humana a través de la formulación en una gran variedad de suplementos dietéticos y alimentos. De hecho es el *Bifidobacterium* más comúnmente utilizado como probiótico en productos lácteos comerciales en América del Norte y Europa<sup>99,100</sup>.

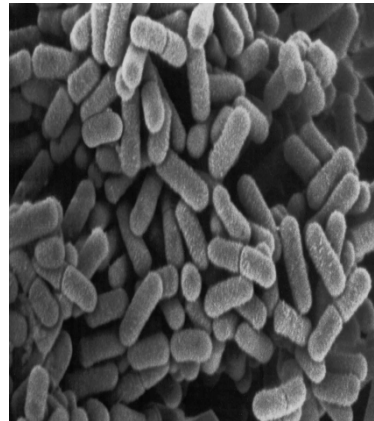
- *Lactobacilos:*

Respecto a los *Lactobacillus*, son bacilos pertenecientes a la clase Bacilli. Son habitualmente Gram+, regulares, no esporulados, microaerófilos y con dimensiones entre 0.5-1.2 x 1-10 µm. Son fermentadores que requieren medios ricos y complejos para su crecimiento y que producen mayoritariamente lactato como producto final. Son catalasa y citocromo negativos<sup>87</sup>.



**Figura 1.9.** *L. casei*

<http://www.nutritionnews.com/>



**Figura 1.10.** *L. plantarum*

<http://www.admani.com/>

Una de las especies más utilizada en productos lácteos es el *L. casei* (figura 1.9). No hay cepas originales que representen al *L. casei* en forma salvaje a parte de la cepa ATCC 393<sup>101</sup>. Como se observa en la figura 1.9 presenta forma de varillas rectas que se agrupan en cadenas cortas o largas, en función del medio en que se realiza su crecimiento. Su crecimiento en la leche es lento y ocurre generalmente en 3-5 días a 30°C. El ámbito de temperatura de crecimiento es de 10 a 40°C<sup>101</sup>. *L. casei* se ha utilizado con éxito en productos lácteos tradicionales, así como quesos y un gran número de productos comerciales de alimentos fermentados<sup>102</sup>.

*L. plantarum* (figura 1.10) es una BAL común en numerosos procesos de fermentación naturales, tales como los de ensilaje de col, pepino, aceitunas o yuca. Tiene la capacidad, en presencia de acetato o lactato, de mantener un gradiente de pH entre el interior y el exterior de la célula<sup>103</sup>. A su vez, contribuye a las cualidades organolépticas y al potencial de conservación de los productos de fermentación, al convertir cuantitativamente los azúcares de bajo peso molecular en ácido láctico.

#### **1.4.2. Actividad enzimática.**

Se ha demostrado que las cepas bacterianas contienen enzimas como las transferasas, hidrolasas, isomerasas y liasas entre otras<sup>104</sup>. Las hidrolasas de los glucósidos son el grupo de enzimas más importantes para los microorganismos presentes en el intestino y su función es modificar poli y oligosacáridos en azúcares fermentables. En general, el proceso de hidrólisis enzimática del enlace glucosídico involucra una catálisis ácida. Por su actividad de transglicosilación, las  $\beta$ -galactosidasas son las hidrolasas de glucósidos mejor estudiadas.

Esta actividad hidrolasa puede ser beneficiosa para favorecer la transformación de los glucósidos de la soja a agliconas, que, como hemos comentado previamente, son las moléculas que se absorben y que tienen actividad biológica.

En base a todo lo expuesto resulta de interés evaluar la acción de distintas cepas bacterianas sobre los procesos cinéticos de hidrólisis que sufren las isoflavonas. Ello permitiría considerar la posibilidad de utilizar dichas cepas para aumentar la biodisponibilidad y, en consecuencia, el efecto terapéutico de las agliconas contenidas en complementos alimenticios a base de soja.

## **2. OBJETIVOS**



Los OBJETIVOS del proyecto se pueden definir en los siguientes términos:

- 1- Puesta a punto y validación de metodología analítica para:
  - a) Cuantificar isoflavonas de la soja en muestras intestinales, tanto los glucósidos (daidzina y genistina) como las agliconas (daidzeína y genisteína).
  - b) Cuantificar las muestras plasmáticas tras la administración oral e intravenosa.
- 2- Determinación en órgano aislado de la rata del proceso de hidrólisis intestinal de daidzina y genistina.
- 3- Selección de las cepas bacterianas más adecuadas para la realización del estudio en función de su capacidad hidrolítica.
- 4- Caracterización en rata *in situ* de los niveles intestinales de las isoflavonas (daidzina, genistina, daidzeína y genisteína), tras una dosis estándar después del tratamiento con las cepas seleccionadas y en su ausencia.
- 5- Determinación de la biodisponibilidad oral de las isoflavonas en presencia y ausencia de diferentes cepas bacterianas en rata Wistar.





### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. Compuestos ensayados

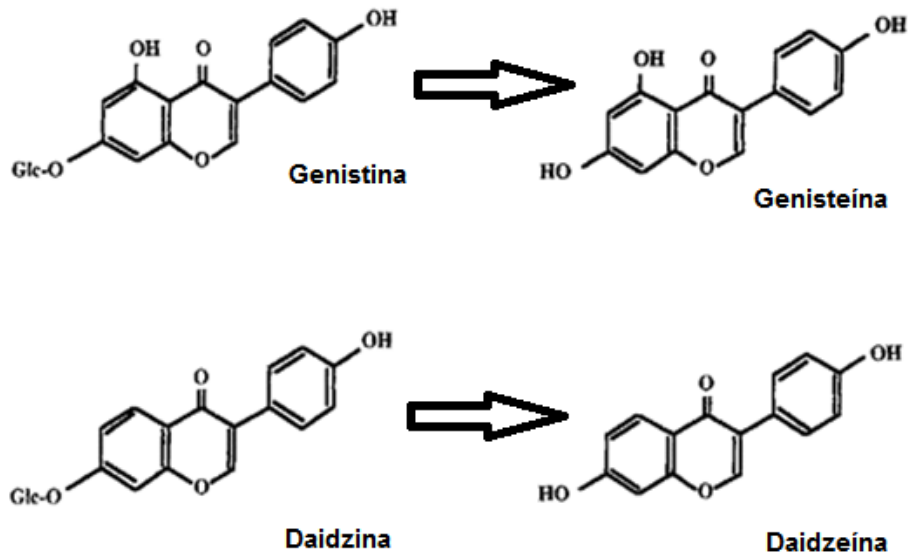
Como fuente de isoflavonas se ha utilizado Fisiogen® (Grupo Zambon S.L., figura 3.1) que es un complemento alimenticio rico en isoflavonas de la soja, que se comercializa como adyuvante en los trastornos que acompañan a la menopausia. En la soja (*Glycine max.*) se pueden encontrar isoflavonas (figura 3.2) en forma de glucósidos (genistina y daidzina entre otros) y las agliconas correspondientes (genisteína y daidzeína respectivamente). Cada comprimido recubierto de Fisiogen® contiene 80 mg de isoflavona de soja, de los cuales 60.8 mg corresponden a genistina/genisteína y 19.2 mg a otras isoflavonas; además contiene 0.015 g de proteínas, 0.108 g de hidratos de carbono y 0.015 g de grasas<sup>105</sup>. Las muestras se han preparado triturando un comprimido de Fisiogen, disolviendo el polvo obtenido en 0.8 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Ref. D4540) y completando hasta 25 mL con líquido de lavado corto, LLC (ver anexo 1.2.1.2.2) o solución salina.

Los patrones de las isoflavonas fueron suministrados por Sigma-Aldrich (daidzina Fluka Ref. 30408, genistina Fluka Ref. 48756, daidzeína Ref. D7802, genisteína Ref. G6649). Sirvieron para la identificación de los picos cromatográficos, la cuantificación y la validación del proceso de recuperación de las isoflavonas extraídas de Fisiogen®.



**Figura 3.1.** Envase y comprimidos de Fisiogen®

(<http://www.zambon.es/es/zes-atesanes/zspa-rdkt/entry/0/416/409/area-mujer.html#ancor499>)



**Figura 3.2.** Estructura química de las principales isoflavonas contenidas en Fisiogen®<sup>18</sup>

### 3.2. Diseño del estudio

El estudio en animales se realizó en rata Wistar utilizando técnicas experimentales *in situ* e *in vivo*. Ambas se han llevado a cabo tanto en ausencia como tras un pretratamiento con cepas bacterianas (ver apartado 3.4.1). Los ensayos *in situ* permitieron determinar los efectos del tratamiento con las cepas seleccionadas sobre la desaparición de los glucósidos y formación/desaparición de las agliconas en el lumen intestinal. Los estudios *in vivo* se orientaron a la determinación de la biodisponibilidad oral en las distintas condiciones de ensayo. En la tabla 3.1 se muestra los distintos grupos de ensayo y el número de animales de cada grupo.

	Técnica <i>in situ</i>	Técnica <i>in vivo</i>
<b>Control</b>	6 (6)	4 (4)
<b><i>B. adolescentis</i><sup>A</sup></b>	4 (4)	5 (4)
<b><i>B. animalis subsp. lactis</i><sup>B</sup></b>	5 (3)	4 (3)
<b><i>L. casei</i><sup>C</sup></b>	4 (3)	5 (3)
<b><i>L. plantarum</i><sup>D</sup></b>	4 (4)	5 (4)

**Tabla 3.1.** Grupos de animales ensayados (A: LMG 11037<sup>T</sup>, B: DMS 10140<sup>T</sup>, C: ATCC 393<sup>T</sup>, D: ATCC 14917<sup>T</sup>). Entre paréntesis se presenta el número de animales utilizados para el tratamiento matemático.

### 3.3. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se seleccionaron a partir de una colección que se muestra en la tabla 3.2. El listado incluye cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Bacteriodes* de las colecciones DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), ATCC (American Type Culture Collection) y LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent Belgium). La selección se basó en la capacidad de las distintas cepas para hidrolizar glucósidos de isoflavona *in vitro*. Estos ensayos se realizaron en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA) de Valencia. El desarrollo del ensayo consiste en inocular la cepa bacteriana en tubos de ensayo con 10 mL de medio suplementado con las isoflavonas e incubar durante 48 h. Se realizan tres series de ensayos:

- Medio de cultivo + 500  $\mu$ L de disolución de Fisiogen al 20% (**FG**), como control.
- Medio de cultivo inoculado con la cepa bacteriana + 500  $\mu$ L de disolución de Fisiogen al 20% (**FG + FLORA**)
- Medio de cultivo inoculado con la cepa bacteriana (**FLORA**).

Tras la incubación, se toman dos muestras: una para su análisis por HPLC y otra para la medición del crecimiento bacteriano.

En base a los resultados, se seleccionaron 4 cepas (*B. adolescentis*, *B. animalis subsp. lactis*, *L. casei* y *L. plantarum*) que demostraron tener mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa. Estas cepas se administraron como pretratamiento de los animales de experimentación en forma de suspensión de un liofilizado en suero salino.

Para ello, se siembra cada una de las cepas (preinóculo Over/Night) en 7 mL de MRS (Man Rogosa Sharpe medium; ver anexo 1.2.2) y se cultivan durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se siembran 4 mL del preinóculo en 220 mL de medio MRS. En el momento que alcanza crecimiento constante (24-48 horas), se centrifuga. A continuación se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con solución salina (NaCl 0.9 %). Posteriormente se resuspende en 15 mL de leche desnatada y 5% de sacarosa. Esta suspensión se liofiliza con una liofilizador Virtis de SP Scientific, modelo 35L Génesis SQ EL-85. El liofilizado se mantiene a 4°C durante un máximo de 6 meses.

<b>Cepas</b>	
<i>Bacteroides fragilis</i> DSM 2451	<i>Ruminococcus albus</i> DSM 20455
<i>Bacteroides vulgatus</i> DSM 1447	<i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243T
<i>Bacteroides ovatus</i> DSM 2451	<i>Veillonella dispar</i> DSM 20735
<i>Alistipes putredins</i> ( <i>Bacteroides putredins</i> ) DSM 2451	<i>B. adolescentis</i> LMG 11037T
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	<i>B. animalis</i> subsp. <i>Animalis</i> LMG 10508T
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702T	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140T
<i>Clostridium coccooides</i> DSM 935	<i>B. bifidum</i> LMG 11041T
<i>Clostridium histolyticum</i> DSM 2158T	<i>B. catenulatum</i> LMG 11043T
<i>Clostridium viride</i> DSM 6836T	<i>B. dentium</i> LMG 11045T
	<i>B. ruminantium</i> LMG 21811T

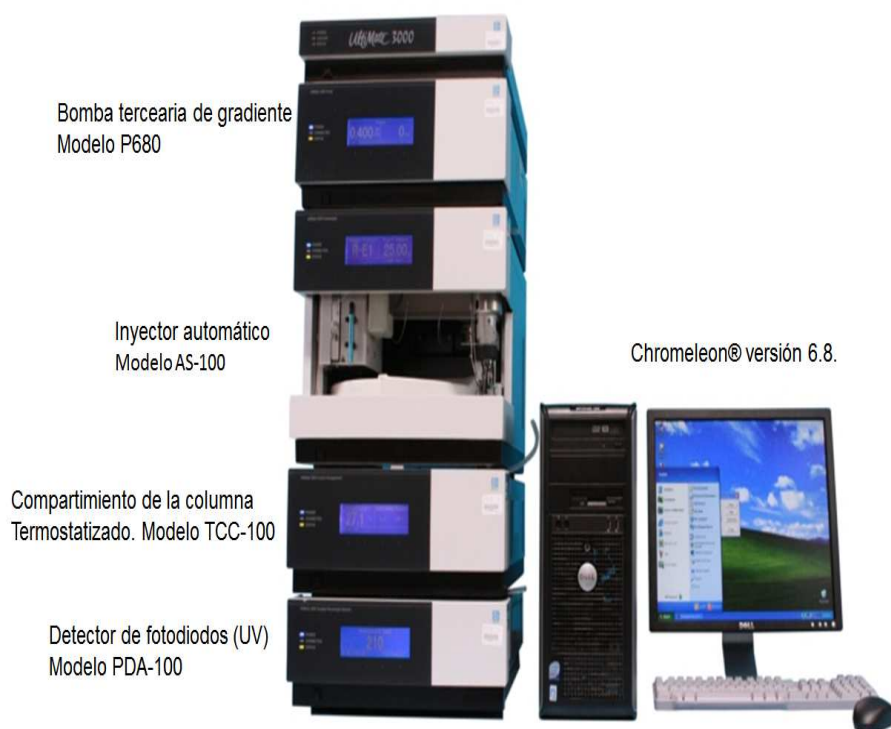
<i>Clostridium clostridiforme</i> DSM 9933T	<i>L. ruminis</i> LMG 10756T
<i>Clostridium ramosum</i> DSM 14002T	
<i>Clostridium leptum</i> DSM 5388	<i>L. reuteri</i> LMG 9213T
<i>Clostridium difficile</i> DSM 1296T	<i>L. gasseri</i> LMG 9203T
<i>Eubacterium halli</i> DSM 3353	<i>L. casei</i> ATCC 393T
<i>Ruminococcus products</i> DSM 2950	<i>L. plantarum</i> ATCC 14917T

**Tabla 3.2.** Listado preliminar de cepas bacterianas propuestas para realizar experimentos *in vitro* (obtenidas de las colecciones DSMZ, ATCC y LMG).

#### 3.4. Metodología analítica

El análisis de las muestras se ha llevado a cabo, tras su extracción en medio sólido, por cromatografía líquida de alta resolución en un equipo Ultimate® 3000 HPLC series (Dionex), cuyos componentes se muestran en la figura 3.3.





**Figura 3.3.** Componentes del equipo UltiMate® 3000 HPLC series (Dionex)

Las condiciones analíticas se han resumido en la tabla 3.3.

Parámetro	Condiciones analíticas
Columna	Phenomenex® RP-18, (250x4.6 mm I.D; tamaño de partícula 5 µm)
Flujo	1 mL/min
Temperatura	35°C
Volumen de Inyección	10 µL
Detector de fotodiodos UV	λ de 250, 254, 260, 254, 320 nm
Detector de fluorescencia	Excitación 308 nm; emisión 460 nm
Fase móvil	Fase acuosa (A): 1% v/v TFA en agua HPLC. Fase orgánica (B): 1% v/v TFA en acetonitrilo
Programa de mezcla	0 a 20 min, 10% B; 20 a 27min, 40%B 27 a 30 min, 100% de B.
Tiempo de retención	Daidzina: 9 min. Genistina: 11 min. Daidzeína: 13 min. Genisteína: 16 min

**Tabla 3.3.** Condiciones analíticas utilizadas

Las áreas cromatográficas se interpolaron en rectas de calibrado elaboradas al efecto. Para ello, se preparó una solución madre patrón (SM) que resultó del filtrado a través de PTFE (Politetrafluoretileno) de 45 µm de una suspensión obtenida por mezcla de 100 µL de DMSO, 50 mL de LLC y el pulverizado manual de 2 comprimidos de Fisiogen®. La curva de calibrado se realizó con cinco diluciones de SM en LLC. La concentración de SM se calculó por referencia a una solución preparada con patrón estándar (Los patrones de daidzina, genistina, daidzeína y

genisteína fueron preparados en agua HPLC e inyectados a la concentración de 0.13, 0.16, 1.27 y 1.00 mg/mL, respectivamente).

### 3.4.1. Validación de los métodos analíticos

Las áreas resultantes de los cromatogramas se representaron frente a las concentraciones ajustándolos linealmente por mínimos cuadrados mediante el programa Excel® 2013.

Para la cuantificación de las muestras *in situ* e *in vivo* fue necesario realizar diferentes validaciones de la metodología analítica en función del rango de concentración. En el caso de muestras de ensayos *in situ* se utilizaron dos validaciones de la metodología tanto para glucósido como para agliconas ya que el rango de concentración de las muestras obtenidas en el ensayo de valoración del proceso de hidrólisis era más alto que el rango de concentraciones de las muestras obtenidas por la técnica de Doluisio. Caso similar sucede con las muestras plasmáticas de agliconas tras administración por la vía oral e intravenosa. El rango de concentración de las muestras intravenosas es mayor al rango de las muestras orales, por lo que se ha realizado una validación de la metodología para cada vía de administración.

En la validación de las metodologías analíticas se tuvo en consideración criterios como linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación, que se detallan a continuación.

La *linealidad* se comprobó por la significación de la pendiente y el coeficiente de correlación  $r$ .

La pendiente de la recta de calibración (respuesta/concentración) permitió discernir la *sensibilidad* del método.

## 76 Materiales y método

El *límite de detección* se calculó mediante la expresión:

$LOD = (3.3 \cdot \sigma) / s$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la línea de regresión, y  $s$  la pendiente de la curva de calibración estimada a partir de soluciones diluidas del analito.

El *límite de cuantificación* se expresó como  $LOQ = (10 \cdot \sigma) / S$ , donde  $\sigma$  representa la desviación estándar de la ordenada en el origen y  $s$  la pendiente de la recta de calibración.

La *precisión* (medida de repetitividad), se expresó como el coeficiente de variación. Se midió mediante el análisis de cinco estándares de las curvas plasmáticas a partir de la SM de Fisiogen® (25%, 50%, 75%, 100%, 125%), tanto intradía como interdía. Se tiene en cuenta el área tanto del estándar de genisteína como de daidzeína para ser utilizado en relación con el área obtenida de las curvas plasmáticas.

La *exactitud* se evaluó a partir del error relativo de cinco patrones, inyectados en distintos momentos del procesado de las muestras.

### 3.5. Ensayos con animales de experimentación



**Figura 3.4.** Rata macho Wistar  
[http://cerebrodarwin.blogspot.com.es/2008\\_07\\_01\\_archive.html](http://cerebrodarwin.blogspot.com.es/2008_07_01_archive.html)

Se utilizaron ratas macho Wistar de la colonia del estabulario del Servicio de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, con un peso comprendido entre 250-300 gramos (figura 3.4). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética como parte del Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) AGL 2005-06191-C02-01.

#### 3.5.1. Pretratamiento de los animales de experimentación

A cada uno de los animales se le administró vía oral 2 mL de cultivo liofilizado resuspendido en LLC de una de las cepas a ensayar, durante cuatro días. La administración se realizó mediante sonda gástrica. El quinto día se llevó a cabo el ensayo de absorción.

#### 3.5.2. Estudios *in situ*

El estudio de absorción *in situ* tiene por objetivo conocer la influencia de la ingestión de cepas bacterianas en el paso de las isoflavonas contenidas en Fisiogen® a través de la membrana intestinal.

Se ha utilizado la técnica de perfusión *in situ* con recirculación descrita inicialmente por Prof. J. Doluisio<sup>106</sup>. Este método permite valorar experimentalmente la concentración remanente en el lumen intestinal en

función del tiempo. El proceso de desaparición del compuesto en estudio puede deberse, de forma general, a fenómenos de degradación en ese medio o al paso del mismo a través de la membrana del enterocito. Las mezclas complejas de las isoflavonas, como se ha descrito en el apartado de Introducción, están sometidas a un intenso proceso metabólico en condiciones fisiológicas. La literatura consultada atribuye ese fenómeno a la presencia de la flora microbiana, que se retira en los lavados previstos en la técnica. Sin embargo, se estimó conveniente hacer un estudio de estabilidad en presencia del intestino, preparado del mismo modo que para el estudio de absorción, con el fin de determinar el grado de hidrólisis que se produce en condiciones fisiológicas.

#### **3.5.2.1. Preparación del animal**

Se somete al animal a un periodo de ayuno de 8 h con acceso libre al agua para garantizar su hidratación. Se utilizaron jaulas de doble fondo para evitar la coprofagia.

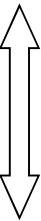
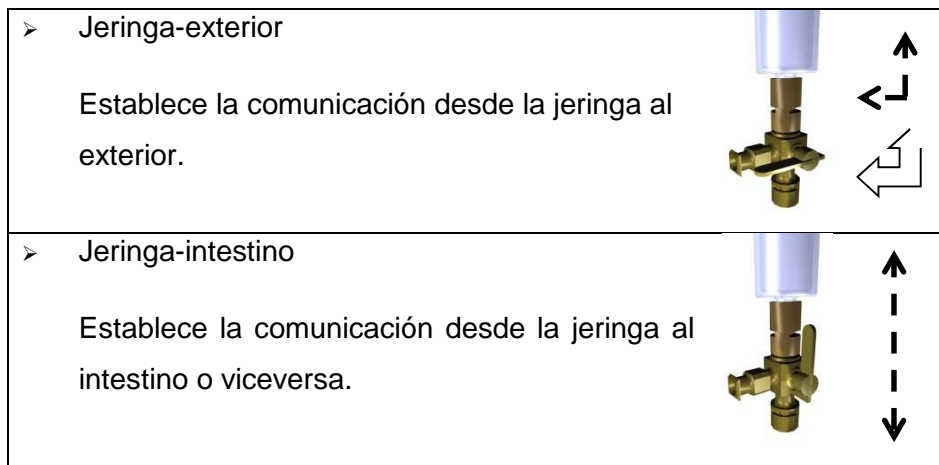
Transcurrido este tiempo, se anestesia el animal por vía intraperitoneal (ver anexo 1.2.1.1). A continuación, se utiliza una lámpara para suministrar calor al animal y así evitar la hipotermia por la relajación muscular generalizada que provoca la anestesia.

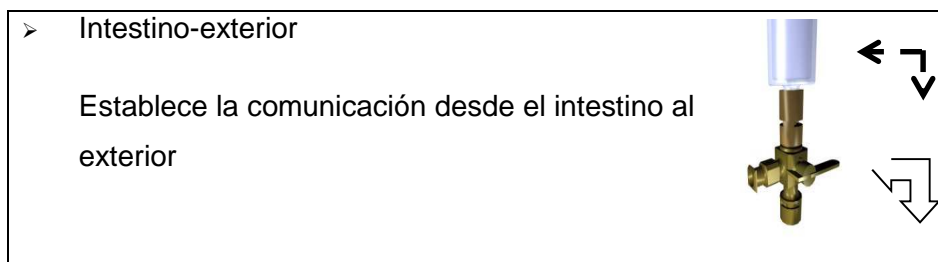
El animal pierde el reflejo palpebral cuando logra el estado de anestesia profunda. Dicho grado se alcanza a los 30 min después de su administración. En una tabla quirúrgica se coloca el animal en posición decúbito supino y se sujetan de manera flexible las extremidades con cinta adhesiva.

Se descubre la cavidad abdominal al seccionar la piel a partir de 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm del apéndice xifoides. Para llevarlo a cabo, se sostiene la piel con unas pinzas de disección en forma de diente de ratón y se efectúa la incisión con unas tijeras de punta roma. Es conveniente distanciar los rectos abdominales y realizar el corte por la línea alba para no provocar hemorragia.

Descubierta la cavidad abdominal, se procede a localizar el duodeno, al cual desemboca el conducto biliar. Es necesario ligarlo con ayuda de un hilo de seda para evitar el paso de la secreción biliar al intestino.

A posteriori, se realiza un pequeño corte en bisel cerca del píloro donde se introduce el extremo de una cánula acodada, la cual se fija con hilo de seda al intestino. Un tubo de polietileno se acopla al otro segmento de la cánula mediante una llave de tres pasos tipo *Stopcock* (figura 3.5). A su vez, ésta se enrosca en una jeringa de 10 mL de capacidad que está sujeta a una pinza acoplada a un soporte vertical.





**Figura 3.5.** Esquema de las diferentes posiciones de la llave de tres pasos tipo Stopcock.

A continuación, se procede a localizar el extremo íleo-cecal para realizar una incisión y facilitar la limpieza de la mucosa.

La reproducibilidad del ensayo puede verse afectada por la obstrucción de las cánulas y la aparición de residuos y sales biliares, por lo que es necesario liberar totalmente la mucosa intestinal de los mismos. La jeringa conectada a la cánula permite realizar la limpieza, al hacer pasar en varias ocasiones las soluciones de lavado, atemperadas a 37°C, por la jeringa y a través del intestino. La *solución de líquido de lavado largo (LLL; ver anexo 1.2.1.2)* se utiliza primero para eliminar los restos sólidos (alrededor de 50 mL) y luego se introducen unos 50 mL de *solución de líquido de lavado corto (LLC; ver anexo 1.2.1.2)*. Con ésta última se prepara la mucosa y restituye el pH fisiológico.

Al culminar el proceso de lavado, se fija en el extremo final otra cánula, conectada a su vez a una llave de tres pasos y a otra jeringa, sujeta con unas pinzas a un soporte vertical.

Para finalizar, se hace pasar aire por el intestino, en ambos sentidos, para extraer la *solución de LLC* remanente. Sin embargo, alrededor de 0.7 mL se mantendrá en el interior.



Durante todo el proceso, debe procederse con delicadeza ya que la mucosa intestinal puede deteriorarse por una excesiva presión sobre el émbolo, lo que repercutiría en la perfusión sanguínea, y podría provocar cambios en la absorción de las sustancias evaluadas.

### **3.5.2.2. Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado**

Para realizar este estudio se desbrida el intestino y se extrae completo de la cavidad abdominal. Se pesa, se mide la longitud y se segmenta en dos porciones.

En la tabla 3.4 se muestran los valores obtenidos. Cada segmento se introduce en un tubo estéril de polietileno de 50 mL en presencia de 5 mL de la solución de perfusión (ver anexo 1.2.1.3). Los tubos se incuban horizontalmente a 37 ° C, bajo agitación a 300 rpm.

	Intestino Rata 1			Intestino Rata 2		
Parte	A	B	Total	A	B	Total
<b>Peso (g)</b>	5.14	5.11	10.25	4.57	4.49	9.04
<b>Extensión (cm)</b>	27.00	26.80	53.80	29.30	28.70	58.00

**Tabla 3.4.** Peso y tamaño del intestino delgado

Se toman muestras (200 µL) cada 5 min hasta los 30 min. Posteriormente se analiza el contenido en glucósidos y agliconas de cada muestra.

### 3.5.2.2.1. Estimación de la cinética de hidrólisis

La cinética del proceso de degradación puede corresponder a orden uno u orden cero. Por tanto, se utilizaron las ecuaciones:

$$C = C_0 - k \cdot t \quad [1]$$

$$\ln C = \ln C_0 - k \cdot t \quad [2]$$

En la que C es la concentración remanente y t el tiempo. La estimación lineal por mínimos cuadrados mediante Excel® versión 2013 proporciona el valor de la constante k junto con su error estándar. También resuelve el valor de la concentración inicial ( $C_0$ , ordenada en origen) con su error. Proporciona asimismo la significación estadística del ajuste mediante el coeficiente de correlación r y el valor de la F de Snedecor.

### 3.5.2.3. Ensayo de absorción

Tras acondicionar el animal como se describe en el epígrafe 3.5.2.1, se coloca una torunda de algodón humedecido en suero

fisiológico a 37°C y se cubre la cavidad abdominal para conservar el estado óptimo de hidratación y su temperatura funcional. La deshidratación puede incrementar el proceso de reabsorción de agua y por consiguiente aumentar la concentración de fármaco en el intestino. Por otra parte, una reducción en la temperatura local corporal puede conllevar a la disminución del flujo sanguíneo mesentérico y, en determinados casos, un enlentecimiento de la absorción.

#### **3.5.2.3.1. Perfusión**

La solución del compuesto a ensayar (ver anexo 1.2.1.3), atemperada a 37°C, se administra por la jeringa proximal. Dado que se perfunde en intestino completo, el volumen empleado es de 10 mL. La llave de tres pasos se mantiene en posición intestino-exterior para dosificar. El siguiente paso es situar la llave distal en posición intestino-exterior y la llave proximal en jeringa-intestino. El émbolo de la jeringa proximal se presiona ligeramente para pasar la solución al intestino y desplazar el aire contenido al exterior sin causar un elongamiento excesivo de la pared intestinal. Después se sitúan las llaves en posición jeringa-exterior, con lo que el intestino se convierte en un compartimento estanco y se pone en marcha el cronómetro.

#### **3.5.2.3.2. Toma de muestra**

Este proceso se lleva a cabo cada 5 min, de forma alterna en cada una de las jeringas. Inicialmente se toma la muestra por la jeringa distal. Para ello es necesario impulsar la solución remanente en el intestino a la jeringa correspondiente, insuflando aire con ayuda de la otra. Una vez se toma la muestra, el volumen de líquido extraído se devuelve

inmediatamente al intestino, que así es, de nuevo, un compartimiento estanco. Se toman 6 muestras de 200  $\mu$ L cada una. Al finalizar el ensayo se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su valoración.

### **3.5.2.3.3. Ensayo de reabsorción de agua**

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada<sup>57,75</sup> de modo que la solución remanente en lumen se concentra.

Su control se realiza inmediatamente después de finalizar la toma de muestras. Consiste en medir el volumen remanente a tiempo final en el lumen para estimar la variación del mismo a lo largo de la experiencia. Para ello se separa la cánula adaptada a la jeringa íleo-cecal, se coloca un tubo de centrifuga de 25 mL y con la jeringa conectada, se impulsa aire para desplazar el líquido remanente hacia el mismo.

Se separa el intestino de las uniones mesentéricas y se vacía completamente ejerciendo presión desde el principio al final con ayuda de un algodón húmedo.

El volumen recogido se centrifuga durante 15 min a 3000 rpm. Con ayuda de pinzas, se separa el residuo y se mide el volumen del sobrenadante. Este valor, adicionado del volumen recogido en las muestras extraídas, se considera el volumen total.

Para finalizar se verifica el pH final de la solución a modo de control, debido a la importancia del grado de ionización de los compuestos en la absorción.

#### 3.5.2.3.4. Tratamiento de las muestras

Las muestras se centrifugan a 8000 rpm durante 8 min. Este proceso permite la separación del sobrenadante (solución del compuesto ensayado) y la sedimentación de posibles sólidos presentes en la muestra. De esta forma se previene la interferencia de restos de mucosa, los cuales podrían modificar la valoración, taponar el sistema cromatográfico, provocar picos fortuitos o variaciones en la línea base.

Se coloca 200 µL del sobrenadante de las muestras en insertos y viales apropiados según el tipo de inyector automático utilizado. En este trabajo se utilizaron viales ámbar de 1.5 mL e insertos de vidrio de 0.2 mL de capacidad, con tapón de PTFE (Politetrafluoretileno/Silicona).

#### 3.5.2.3.5. Estimación de la cinética

##### A) *Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua*

Con el fin de tener en cuenta este efecto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Dado que la reabsorción de líquido intestinal sigue una cinética de orden cero,<sup>142</sup> se utilizó la forma integrada de la ecuación representativa del proceso:

$$V = V_0 - k_0 \cdot t \quad [3]$$

en la que  $V_0$  corresponde al volumen remanente a tiempo inicial,  $V$ , el volumen remanente a cada tiempo y  $k_0$  representa la constante de velocidad de reabsorción de agua (mL/min). Cabe destacar que  $V_0$  no coincide con el volumen de perfusión ya que tras el acondicionamiento del intestino siempre queda un cierto volumen residual de LLC; éste se ha calculado experimentalmente y tiene un valor de 0.7 mL.

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se obtienen los parámetros  $V_0$  como ordenada en el origen y  $k_0$  como pendiente. Estos parámetros permiten determinar los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra ( $V_t$ ), y con ellos se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, utilizando la ecuación:

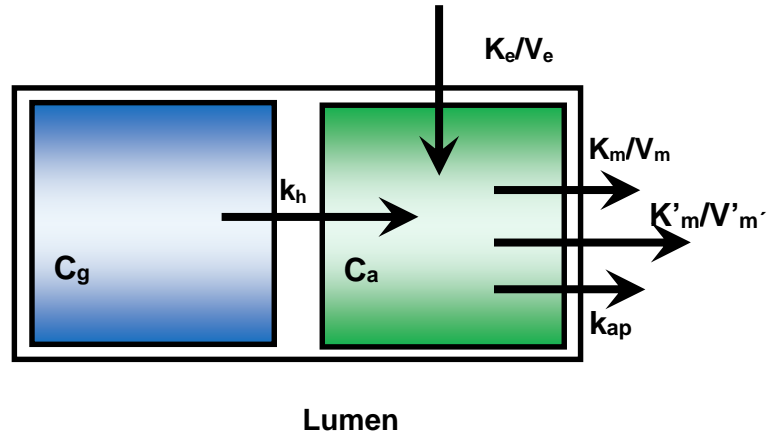
$$C=E \cdot \frac{V_t}{V_0} \quad [4]$$

en la que C corresponde a la concentración de soluto corregida y E es la concentración obtenida experimentalmente.

### *B) Cálculo de los parámetros cinéticos*

#### Método 1

La desaparición de las agliconas del medio intestinal puede deberse a múltiples procesos. Cabe considerar un proceso de pérdida por absorción (activa y pasiva) y por metabolismo, y un proceso de ganancia, que puede deberse bien a la hidrólisis de los glucósidos o bien a la secreción activa desde la membrana del enterocito. El modelo cinético corresponde a:



$C_g$ : concentración de glucósido

$C_a$ : concentración de aglicona

$k_{ap}$ : constante de absorción pasiva

$K_m/V_m$ : parámetros del proceso de absorción activa

$k_h$ : constante de hidrolización

$K_e/V_e$ : parámetros del proceso de secreción activa

$K'_m/V'_m$ : parámetros del proceso de metabolismo luminal.

**Figura 3.6.** Modelo para el cálculo de los parámetros cinéticos.

No obstante, los datos experimentales no permiten estimar matemáticamente con precisión los parámetros del modelo debido a que se ha ensayado una única concentración (correspondiente a la solución de perfusión).

Se asumen, pues, cinéticas de primer orden para los procesos activos. Este supuesto es válido siempre que la concentración de sustrato sea muy inferior a la constante de Michaelis Menten ( $K_m$ ) del proceso. Por otra parte se engloban todos los procesos de desaparición del lumen (metabolismo, absorción activa y pasiva) como  $k_{des}$ . Del mismo modo, la

## 88 Materiales y método

constante  $k_h$  engloba todos los procesos de aparición de aglicona en lumen (hidrólisis y secreción). La ecuación de velocidad corresponde, en este caso, a:

$$\frac{dC_a}{dt} = k_h \cdot C_g - k_{des} \cdot C_a \quad [5]$$

siendo

$C_a$ : concentración de aglicona remanente en el lumen.

$k_{des}$ : constante aparente de primer orden de desaparición de aglicona.

$k_h$ : constante aparente de ganancia de aglicona, así denominada debido a que el proceso de secreción se considera negligible.

$C_g$ : concentración de glucósido

En este supuesto, la concentración de aglicona a cada tiempo podría describirse como:

$$C_a = C_o \cdot \left( \frac{k_h}{k_h - k_{des}} \right) (e^{-k_h \cdot t} - e^{-k_{des} \cdot t}) \quad [6]$$

Mientras que la concentración de glucósido se podría describir como:

$$C_g = C_o \cdot e^{-k_h \cdot t} \quad [7]$$

donde  $C_g$  es la concentración de glucósido a tiempo  $t$  y  $C_o$  corresponde a la concentración inicial de del mismo.



Estas ecuaciones se han ajustado simultáneamente mediante la herramienta Solver de Excel® 2013 a los valores experimentales de concentración remanente de cada animal.

Para obtener un valor representativo de las constantes, el ensayo se realiza en un mínimo de 3 ratas para cada condición ensayada. Tras esto se obtiene un valor medio que se considera característico de las condiciones del ensayo.

Se han comparado los valores de las constantes de hidrólisis y desaparición obtenidas en las diferentes condiciones para cada uno de los compuestos mediante ANOVA de una vía, test de Dunnett y estadístico de Levene.

### Método 2

La alternativa a este método consiste en realizar el análisis sobre los datos originales de concentración luminal frente al tiempo y utilizar una estrategia de selección de modelo cinético y de estimación de parámetros.

Para ello los datos de concentración remanente en lumen del compuesto de interés (las agliconas y los glucósidos) frente al tiempo en los diferentes grupos se han ajustado mediante regresión lineal a modelos de complejidad creciente, empezando por contener una única pendiente ( $k_a$ ) y ordenada en origen, misma ordenada con diferentes pendientes, diferentes ordenadas con una pendiente común y el más complejo que incluye diferentes ordenadas y diferentes pendientes en cada grupo. En este caso, no es posible utilizar el primer punto de concentración remanente de aglicona, puesto que está en fase de

formación. El método se ha desarrollado mediante la herramienta Solver de Excel® 2013. De esta manera de cada modelo se obtiene una suma de cuadrados residuales y ello permite la comparación entre los modelos mediante la prueba F de Snedecor. Para aquel modelo que resulte significativamente mejor se obtiene el valor del parámetro y su error de estimación.

A partir de estos datos se puede construir el intervalo de confianza del 95% de cada parámetro estimado y evaluar las diferencias entre ellos.

### **3.5.3. Estudios *in vivo***

El cálculo de la biodisponibilidad requiere conocer el área bajo la curva (*AUC*) de concentración frente al tiempo de administración extravasal referida a la intravenosa. Es necesario, por tanto, conocer el perfil plasmático de los compuestos tras estos tipos de administración. Para obtener las muestras plasmáticas se introduce en la vena yugular del animal una cánula de silicona. De esta forma se evita la anestesia en cada toma de muestra y no se causa sufrimiento al animal. El animal permanece consciente en su jaula con libre acceso al agua.

#### **3.5.3.1. Procedimiento quirúrgico**

El procedimiento anestésico se realiza mediante administración por vía intraperitoneal tal como se describe en el anexo 1.2.1.1. En el momento que se logra el estado profundo de anestesia, comprobada a través de la pérdida del reflejo palpebral, la rata se coloca sobre una tabla de cirugía en posición de decúbito supino y se fijan sus extremidades mediante cinta adhesiva.

Con esta colocación se puede delimitar fácilmente el cuadrante de la parte superior derecha del cuello donde se aprecia un pulso constante. Con ayuda de unas tijeras de punta roma y unas pinzas en diente de ratón, se procede a efectuar un corte en la piel. Se separa el tejido subcutáneo hasta descubrir la vena yugular. Para facilitar el proceso de inserción del catéter y ayudado de pinzas, se realiza la limpieza de la zona adyacente a la vena, eliminando restos de tejido y grasa. La cánula (ver anexo 1.3.3) se prepara acoplada a una jeringuilla con solución salina heparinizada (ver anexo 1.3.1) y se adapta a una aguja de sutura que posee un pequeño catéter de silicona previamente fijado con un sellante. La aguja se traspasa de manera paralela a través de la vena yugular en orientación desde el cuello hacia el corazón<sup>107</sup>. Después de penetrar unos centímetros, la aguja sale de manera longitudinal a la vena. Con ayuda de movimientos rotacionales lentos y progresivos, se facilita el paso de la aguja con la cánula acoplada. En ese momento se separa la aguja, dejando libre el conducto para el paso de solución salina heparinizada. Lentamente se ingresa el segmento exteriorizado y se verifica el acceso a sangre. Comprobado esto, se introduce el conducto en su totalidad en la vena. A continuación se fija el hilo al músculo interno anexo a la vena yugular de la rata.

Seguidamente, se procede a la exteriorización de la cánula, para lo que se adapta el extremo acoplado a la jeringuilla a otra aguja con fijador. Cuando se ha traspasado el músculo y la piel de la rata, se deja un extremo de la cánula y se retira del fijador. Por último, se sutura la herida, se empapa con povidona yodada al 10% (Desinpor®), se verifica la extracción de sangre y se inyecta solución salina heparinizada. Se tapa

el conducto mediante un nudo. El animal se queda en recuperación durante 24 h.

El día del experimento, a un grupo de animales se administra 0.5 mL de la solución a ensayar (ver anexo 1.3.2) vía intravenosa. La administración se efectúa a través de la cánula adicionando también 1 mL de suero heparinizado (ver anexo 1.3.1). A los otros grupos de animales (control y ratas tratadas con alguna de las cepas ensayadas) se les administra 2 mL de la solución por vía oral. La administración oral se lleva a cabo mediante una sonda gástrica acoplada a una jeringa. A partir de ese momento se toman muestras de 0.25 mL de sangre sobre eppendorfs heparinizados, a los tiempos prefijados durante 8 h.

### **3.5.3.2. Preparación de las muestras**

Las muestras extraídas se centrifugan a 8000 rpm durante 8 min y se transfiere el sobrenadante a otro tubo, que será congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser después analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La descongelación de las muestras plasmáticas se realiza durante una hora a temperatura ambiente y se homogenizan en un agitador horizontal. A continuación se transfieren 100  $\mu\text{L}$  de muestra a otro tubo, se añade 100  $\mu\text{L}$  de tampón de hidrólisis (ver anexo 1.3.4) y se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 h. Tras este período se adiciona bajo agitación 10  $\mu\text{L}$  de patrón interno (formononetina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en DMSO). A continuación se desproteinizan las muestras mediante tratamiento de las mismas con tampón de trimetil amonio sulfato (ver anexo 1.3.4) durante 10 min a  $60^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se centrifuga a 8000 rpm durante 5 min.

El sobrenadante se fracciona mediante cartuchos Sep-Pak C18 VacRC de 500 mg. Estos se deben activar mediante 10 mL de metanol y 20 mL de agua destilada. Se hace pasar la muestra por aplicación de vacío y se lava con 5 mL de acetato de amonio 10 mM pH 5 y 5 mL de agua destilada. La elución de las isoflavonas se consigue al añadir lentamente 1.5 mL de metanol. El eluato se transfiere a un tubo para ser evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, a la temperatura de 45°C.

El residuo se resuspende en 100 µL de una mezcla de metanol y ácido trifluoroacético al 1% en agua HPLC 40:60 (v/v). Las muestras se filtran con politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 µm.

### **3.5.3.3. Estudio cinético. Evaluación de la biodisponibilidad.**

Los datos de concentración plasmática frente al tiempo se han tratado mediante la herramienta Solver de Excel® 2013. Cada una de las curvas se estudió individualmente con objeto de estimar los parámetros farmacocinéticos correspondientes y luego se obtuvieron las medias como características de las distintas condiciones.

#### **A. Administración intravenosa. Grupo control.**

Los resultados se han tratado tanto bajo el punto de vista modelo-independiente como dependiente.

Respecto al tratamiento compartimental se han ensayado los dos modelos habituales (mono y bicompartimental). Como criterios de bondad de ajuste se ha determinado el coeficiente de correlación entre los valores de concentración experimentales y predichos por el modelo, y el criterio de información de Akaike. Teniendo en cuenta que los modelos a

comparar tienen diferente número de parámetros, se ha calculado el valor de F de Snedecor como criterio de selección. Los parámetros secundarios se han calculado asumiendo que los glucósidos se hidrolizan completa e instantáneamente al entrar en contacto con la sangre. La ecuación 8 se empleó para la determinación del ajustado de las concentraciones plasmáticas para el modelo monocompartimental y la ecuación 9 se usó para el ajustado matemático mediante el modelo bicompartmental.

$$C_{IV} = C_o \cdot e^{-kel*t} \quad [8]$$

$$C_{IV} = A \cdot e^{-\alpha*t} + B \cdot e^{-\beta*t} \quad [9]$$

En cuanto a los parámetros no compartimentales, *AUC* se ha calculado por el método de los trapecios. Se ha utilizado únicamente el periodo muestreado dado que el área restante representa una fracción insignificante del  $AUC_o^\infty$ .

#### B. Vía de administración oral

Las curvas de nivel plasmático presentan un perfil característico de compuestos con circulación enterohepática que hacen muy difícil su tratamiento matemático con las herramientas disponibles. El cálculo de la biodisponibilidad, por tanto, se ha llevado a cabo por comparación de *AUC* estimados por métodos no compartimentales.

La influencia del pretratamiento de los animales en la magnitud de absorción de daidzeína y genisteína *in vivo* se ha detectado por comparación del  $AUC_o^t$  correspondiente a cada aglicona tras la administración oral en las distintas condiciones ensayadas.

En la determinación de la biodisponibilidad en velocidad se han utilizado los valores de  $C_{\max}$  y  $t_{\max}$  que se estimaron a partir de cada curva experimental.

#### **3.5.3.4. Análisis estadístico de los datos**

Se ha utilizado pruebas paramétricas, dado que se cumplen las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas entre los grupos. Además las observaciones son independientes, es decir, el valor de una observación en un grupo no proporciona información sobre el valor de la observación en otro grupo. Las pruebas paramétricas de comparación entre medias que se han realizado en este trabajo fueron las siguientes: se realizó a las concentraciones plasmáticas individuales obtenidas, la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov<sup>108</sup>) para cada tiempo y cepa ensayada.

Se ha comprobado la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene y se ha llevado a cabo un análisis de varianza de una vía. Detectadas las diferencias, se han identificado los pares significativos mediante la prueba de Dunnett. Para la realización de estos análisis se ha utilizado el paquete estadístico SPSS (versión 19).

#### **3.5.4. Pruebas estadísticas**

En el presente trabajo se ha utilizado los criterios estadísticos que se indican a continuación:

##### *Coefficiente de variación (CV)*

El coeficiente de variación (CV) de un parámetro es la desviación estándar (DE) expresada como porcentaje respecto al valor del parámetro promedio estudiado ( $\bar{x}$ ):

$$CV = \frac{DE}{X} \cdot 100 \quad [10]$$

Proporciona información sobre la certeza con la que se ha estimado cada parámetro. El ajustado será tanto más fiable cuanto menores sean los valores de los coeficientes de variación.

*Coefficiente de correlación lineal (r)*

El coeficiente de correlación lineal se ha usado como criterio estadístico para determinar la fiabilidad de los ajustados lineales por mínimos cuadrados en las rectas de calibración. En los ajustados no lineales se ha empleado como criterio de calidad el coeficiente de correlación lineal entre los valores experimentales y teóricos predichos por el modelo.

En ambos casos es tanto más fiable cuanto más se aproxima el valor absoluto del coeficiente de correlación (r), a la unidad.

*Criterio de información de Akaike (AIC)*

La expresión para obtener el AIC es la siguiente:

$$AIC = n \cdot \ln SCP + 2 \cdot p \quad [11]$$

en la que n es el número de puntos experimentales, SCP es la suma de cuadrados de los residuales (que pueden ser o no ponderados) y p es el número de parámetros de la ecuación que se analiza. El menor AIC señala el mejor modelo.



*Prueba F de Snedecor*

Este ensayo valora la posibilidad de que la obtención de mejores resultados en un modelo más complejo sea debido al azar. Para ello se determina si la suma de los cuadrados de los residuales se reduce significativamente al utilizar un modelo con mayor número de parámetros. La expresión para obtener el estadístico F es:

$$F = \frac{SCP_1 - SCP_2}{SCP_2} \cdot \frac{\delta_2}{\delta_1 - \delta_2} \quad [12]$$

en la que  $\delta_1$  y  $\delta_2$  son los grados de libertad de cada modelo calculados mediante la diferencia entre el número de puntos experimentales y el número de parámetros que definen el modelo. SC1 y SC2 representan la suma de cuadrados de los residuales de cada modelo. Las variables con el subíndice 1 se refieren siempre al modelo más sencillo.

Se determinó la significación del estadístico F calculado, tomando un valor  $\alpha=0.05$  como límite de aceptación de la hipótesis nula de que no hay mejora en el ajuste.



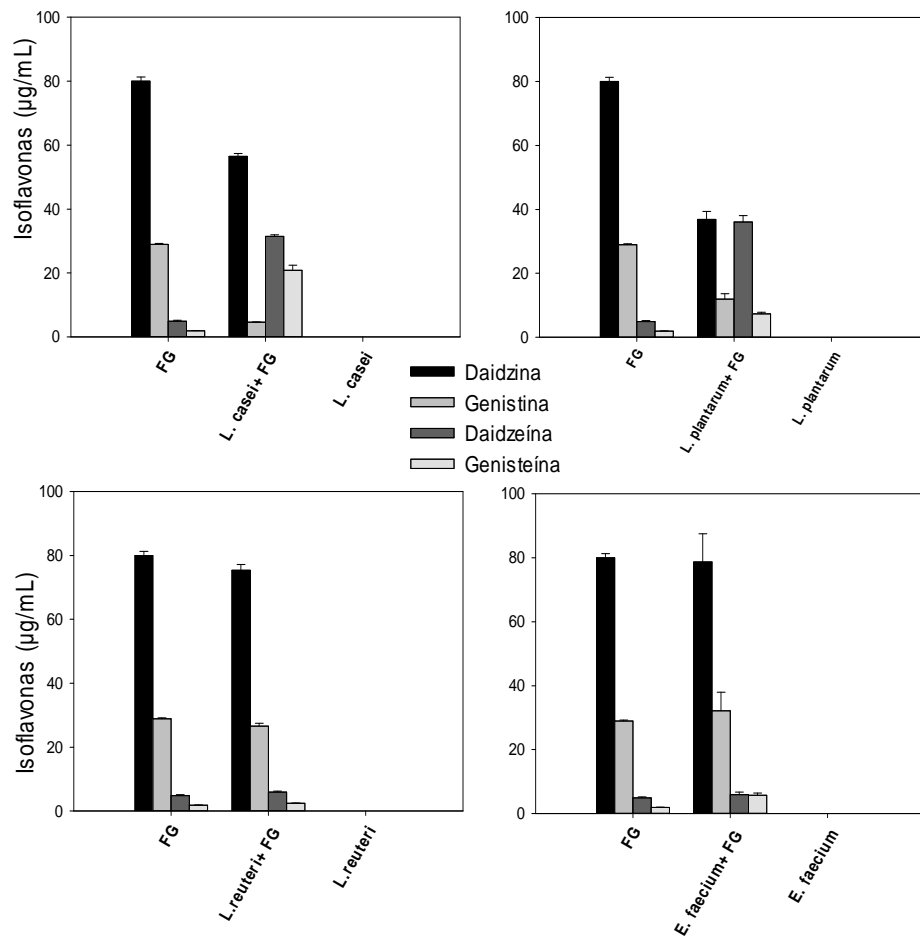
## **4. RESULTADOS**



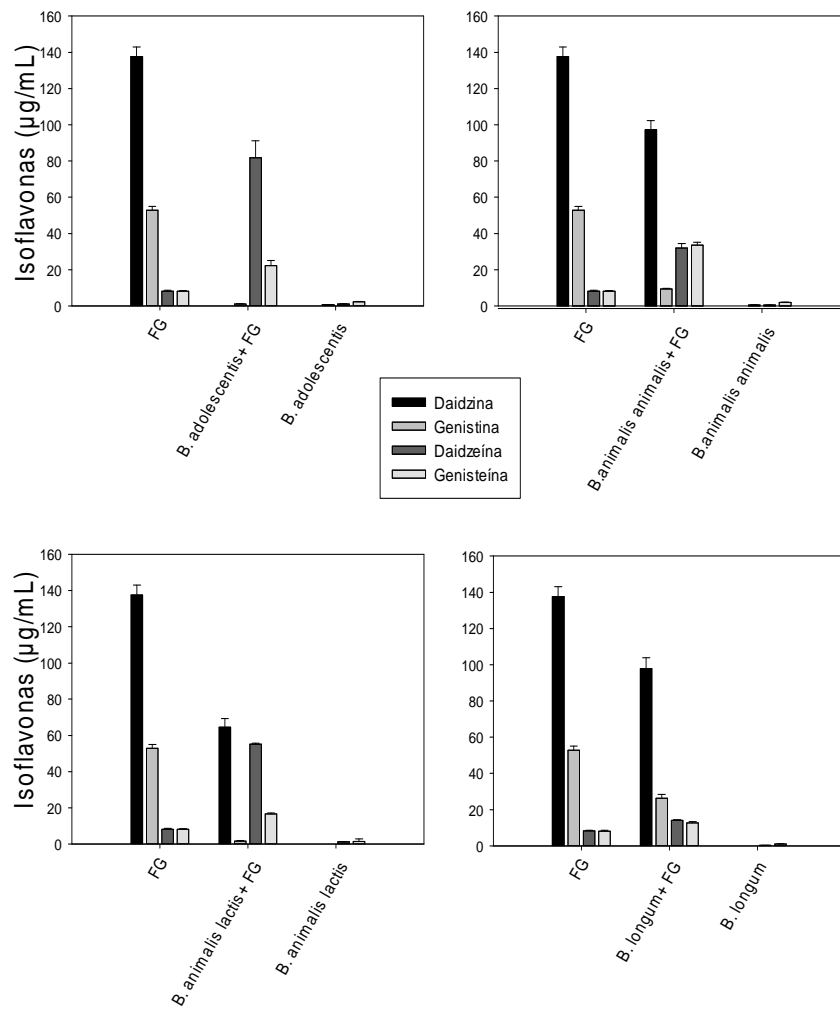
Tal y como se detalla en el capítulo 3 en primer lugar fue necesario seleccionar las cepas bacterianas que se iban a utilizar en este estudio, lo cual se realizó en función de su capacidad hidrolítica (ver epígrafe 3.3). Después se llevó a cabo el pretratamiento de las ratas Wistar en presencia de cada una de las 4 cepas seleccionadas. Finalizado el mismo se realizaron estudios de absorción utilizando técnicas *in situ* e *in vivo*. Por último se llevó a cabo la determinación del contenido en glucósidos y agliconas de las muestras intestinales y de agliconas de las muestras plasmáticas, mediante HPLC. Lógicamente, para contrastar la validez del método analítico se desarrollaron previamente estudios de validación de las técnicas puestas a punto a tal efecto. Los resultados experimentales se muestran agrupados en función de la metodología experimental utilizada.

#### **4.1. Capacidad hidrolítica y selección de cepas bacterianas**

Es importante conocer y determinar la capacidad que poseen las cepas bacterianas para hidrolizar los glucósidos a agliconas. Si se produjese mayor hidrólisis de los glucósidos, aumentaría la concentración de agliconas a nivel del lumen intestinal, lo que previsiblemente se vería reflejado a nivel plasmático. En la figura 4.1 y 4.2 se muestran los resultados más interesantes obtenidos en el estudio *in vitro* de la actividad hidrolítica de las cepas descritas en el epígrafe 3.3 para especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* (*E.faecium*) y *Bifidobacterium*, respectivamente.



**Figura 4.1.** Ensayos *in vitro* de incubación de cepas de *Lactobacillus* y el *E. faecium* con isoflavonas. **FG**: medio de cultivo sin inocular + 500 µL de disolución de Fisiogen.

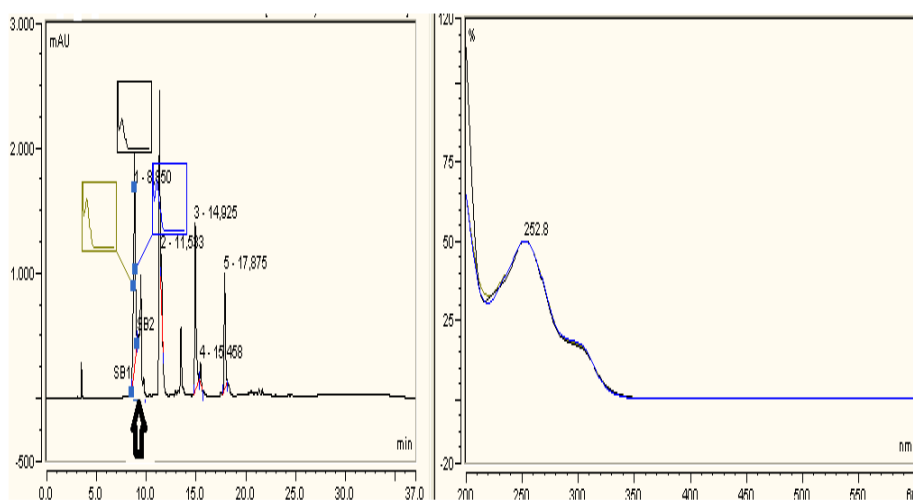


**Figura 4.2.** Ensayos *in vitro* de incubación de cepas de *Bifidobacterium* con isoflavonas de Fisiogen. **FG:** medio de cultivo sin inocular + 500 µL de disolución de Fisiogen.

## 4.2. Metodología analítica

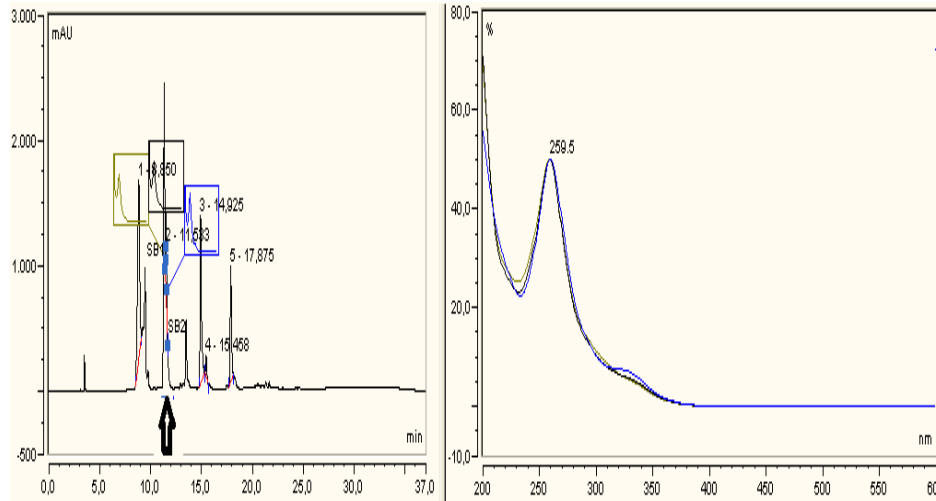
### 4.2.1. Estudio *in situ*

En las figuras 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 se presentan cromatogramas de las isoflavonas en líquido de lavado corto (LLC). Se muestra asimismo la identificación de daidzina y genistina (glucósidos), daidzeína y genisteína (agliconas) mediante el espectro de absorción. Estos cromatogramas son una muestra del método utilizado para la cuantificación de glucósidos y agliconas en las muestras correspondientes a la técnica de absorción *in situ*.

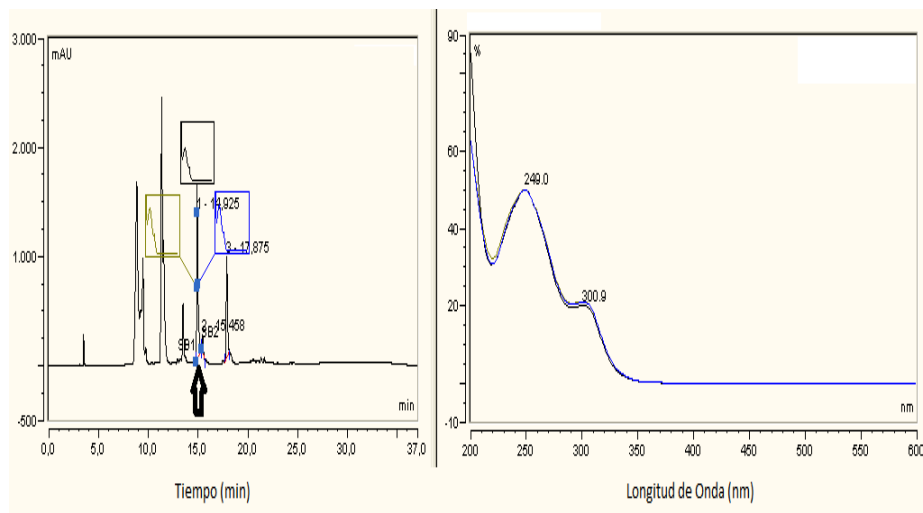


**Figura 4.3.** Patrón acuoso de daidzina en LLC.

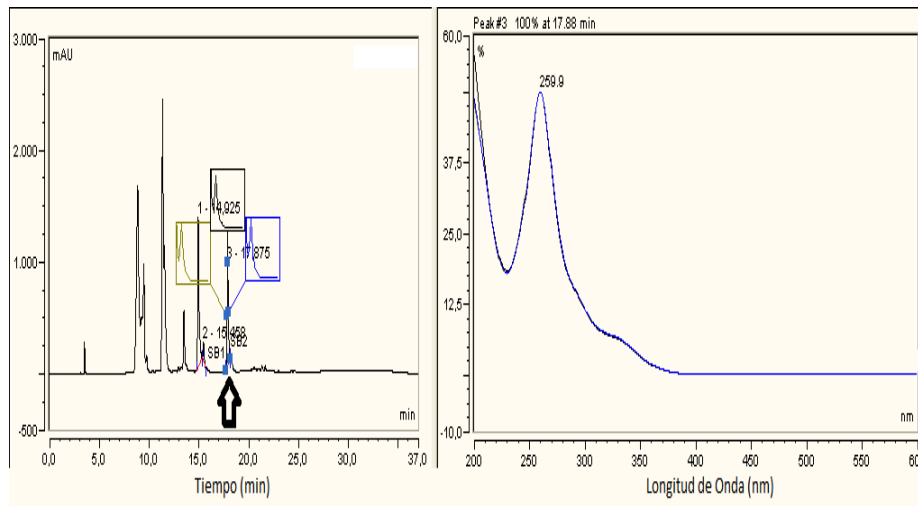




**Figura 4.4.** Patrón acuoso de genistina en LLC



**Figura 4.5.** Patrón acuoso de daidzeína en LLC.



**Figura 4.6.** Patrón acuoso de genisteína en LLC.

En las tablas 4.1 y 4.2 se muestran los resultados correspondientes al proceso de validación de la metodología analítica.

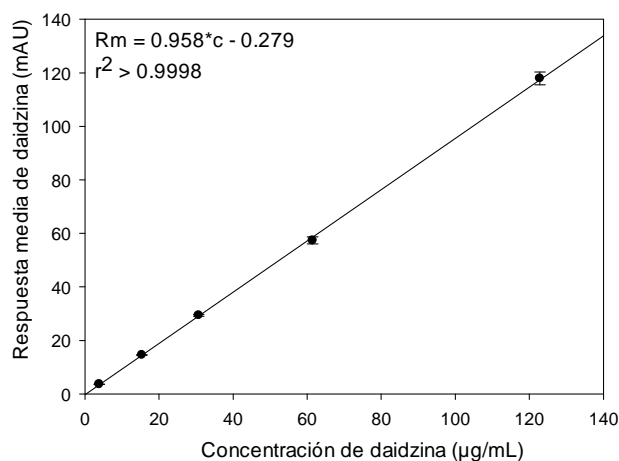
	<b>Daidzina</b>	<b>Genistina</b>
<b>Rango</b>	<b>3.84 - 122.87</b>	<b>1.06-33.80</b>
Linealidad. $r^2$	> 0.999	> 0.999
Precisión. CV (%)	$\leq$ 2.23%	$\leq$ 4.55%
Exactitud. ER (%)	$\leq$ 7.51%	$\leq$ 9.06
Limite de detección. LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	2.78	1.67
Limite de cuantificación. LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	5.59	5.06
<b>Rango</b>	<b>0.25-65.08</b>	<b>0.05-6.28</b>
Linealidad. $r^2$	> 0.999	> 0.999
Precisión. CV (%)	$\leq$ 6.43%	$\leq$ 2.48%
Exactitud. ER (%)	$\leq$ 9.07%	$\leq$ 10.14
Limite de detección. LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.15	0.03
Limite de cuantificación. LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.25	0.09

**Tabla 4.1.** Parámetros de validación del método analítico para los glucósidos.

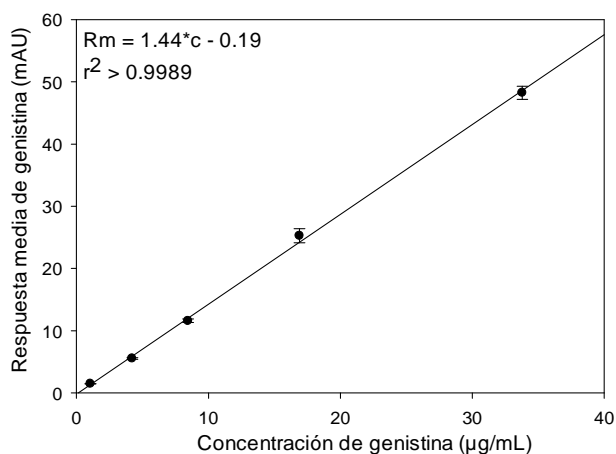
	Daidzeína	Genisteína
<b>Rango</b>	<b>5.66-90.53</b>	<b>4.02-64.25</b>
Linealidad. $r^2$	> 0.999	> 0.999
Precisión. CV (%)	≤ 15.3%	≤ 6.90%
Exactitud. ER (%)	≤ 4.18%	≤ 5.49
Limite de detección. LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	2.28	0.89
Limite de cuantificación. LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	4.67	2.70

**Tabla 4.2.** Resultados de la validación del método analítico para cuantificar agliconas.

Las figuras 4.7 a 4.12 presentan gráficamente la curva de calibración media de replicados interdía de daidzina y genistina, en los dos ámbitos y daidzeína y genisteína, respectivamente.

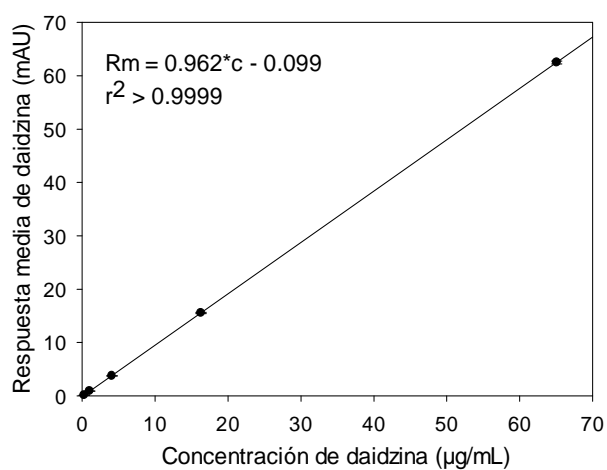


**Figura 4.7.** Curva de calibración de daidzina en el rango de interés para la evolución de los componentes de Fisiogen en órgano aislado.  $R_m$ : Área media del cromatograma, C: concentración.



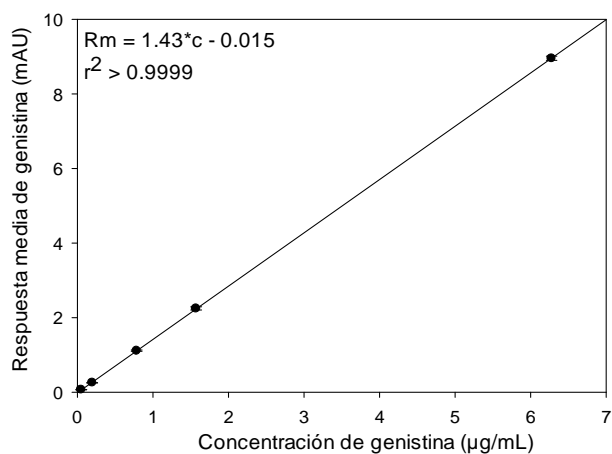
**Figura 4.8.** Curva de calibración de genistina en el rango de interés para la evolución de los componentes de Fisiogen en órgano aislado.

Rm: Área media, C: concentración.

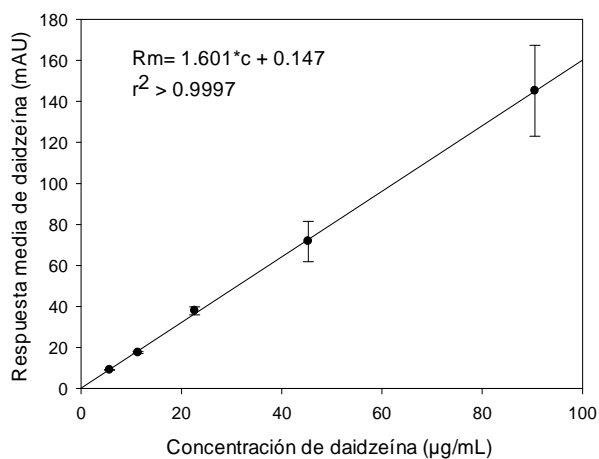


**Figura 4.9.** Curva de calibración de daidzina en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*. Rm: Área media del cromatograma, C: concentración.

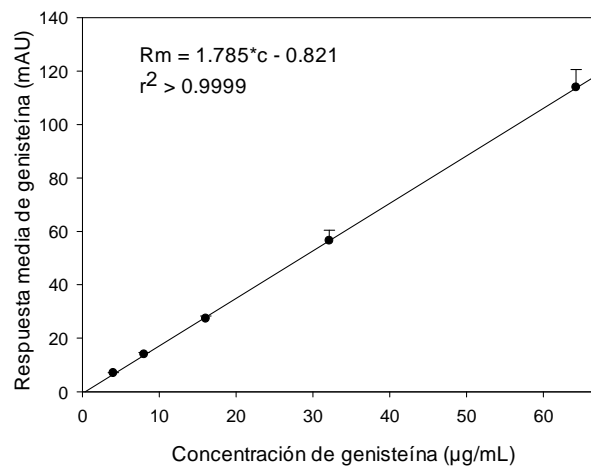
Rm: Área media del cromatograma, C: concentración.



**Figura 4.10.** Curva de calibración de genistina en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*. Rm: Área media del cromatograma, C: concentración.



**Figura 4.11.** Curva de calibración de daidzeína en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*. Rm: Área media del cromatograma, C: concentración.



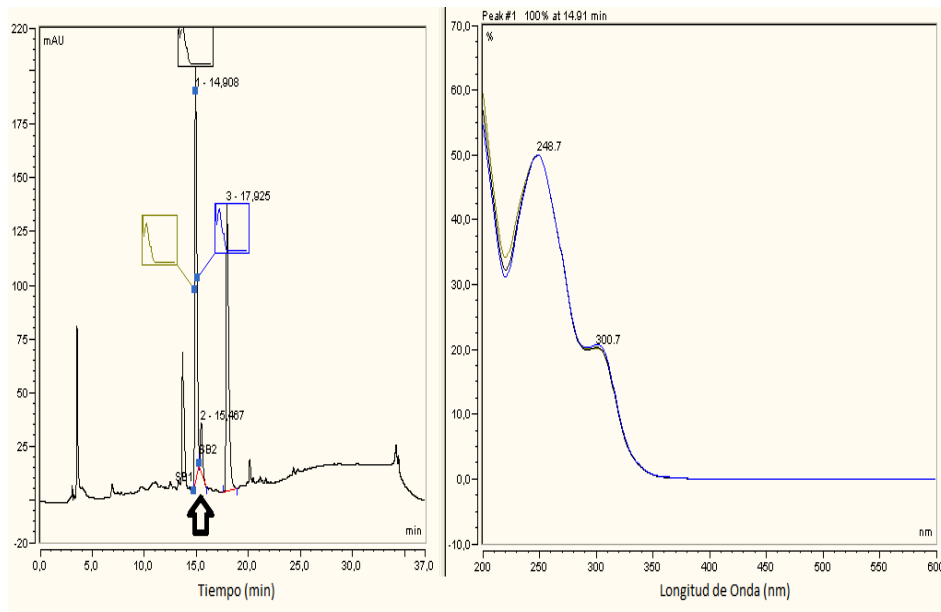
**Figura 4.12.** Curva de calibración de genisteína en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*. Rm: Área media del cromatograma, C: concentración.

#### 4.2.2. Estudio *in vivo*

##### A. Vía de administración intravenosa

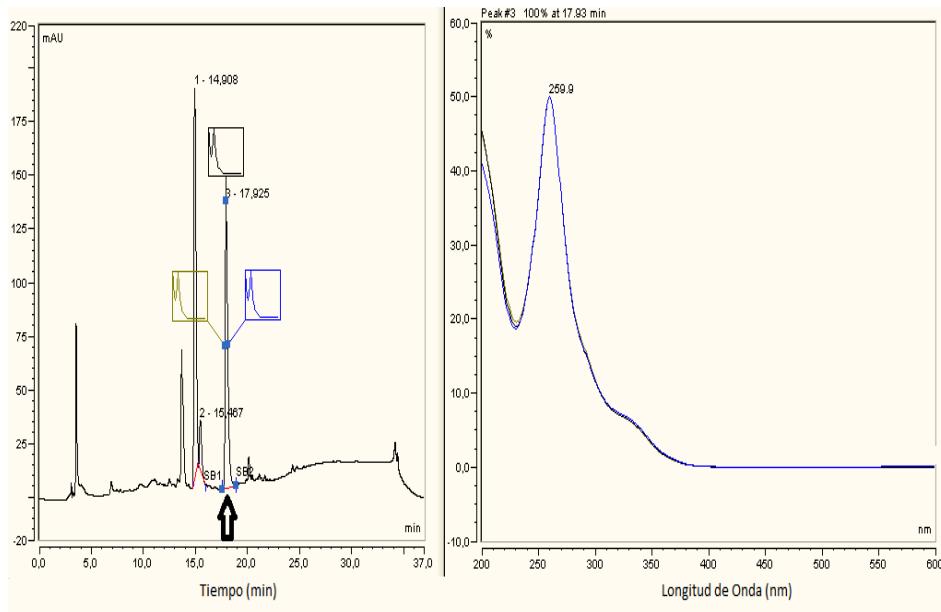
En las figuras 4.13 y 4.14 se presentan un cromatograma tipo de las isoflavonas en plasma. Se muestra asimismo la identificación de daidzeína y genisteína mediante el espectro de absorción, respectivamente.

Estos cromatogramas son una muestra del método utilizado para la cuantificación de ambas agliconas en las muestras plasmáticas obtenidas tras la administración intravenosa.



**Figura 4.13.** Patrón de daidzeína en plasma que se utiliza para la cuantificación de las muestras plasmáticas correspondientes al ensayo por vía intravenosa.





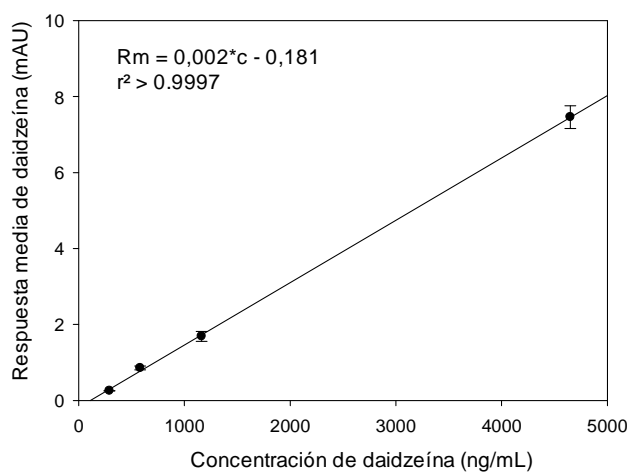
**Figura 4.14.** Patrón de genisteína en plasma en el rango de concentraciones altas.

En la tabla 4.3 se muestran los resultados correspondientes al proceso de validación de la metodología analítica para este ámbito de concentraciones.

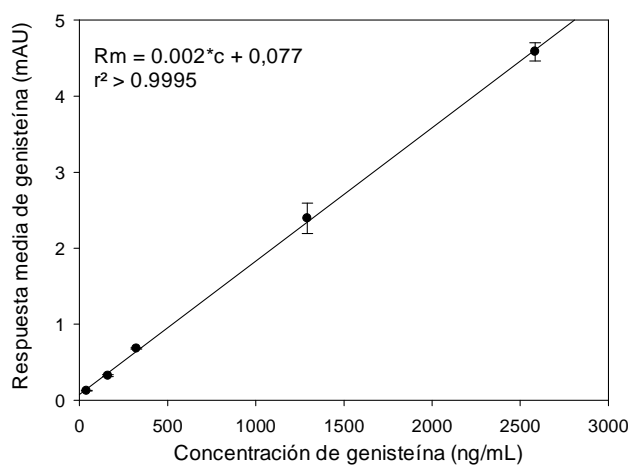
Parámetro	Daidzeína (mAU)	Genisteína (mAU)
Rango (ng/mL)	290.65–650.45	40.39 –2584.90
Linealidad. $r^2$	> 0.999	> 0.999
Precisión. CV (%)	≤ 7.65%	≤ 8.40%
Exactitud. ER (%)	≤ 16.27%	≤ 18.55
Limite de detección. LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	141.94	87.04
Limite de cuantificación. LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	297.50	160.06

**Tabla 4.3.** Parámetros validación de la metodología analítica aplicada en la cuantificación de las isoflavonas tras su administración por vía intravenosa.

Las figuras 4.15 y 4.16 presentan gráficamente una curva de calibración medias de replicados interdía de daidzeína y genisteína, respectivamente.



**Figura 4.15.** Curva de calibración de daidzeína para cuantificar muestras plasmáticas. Rm: Área media, C: concentración



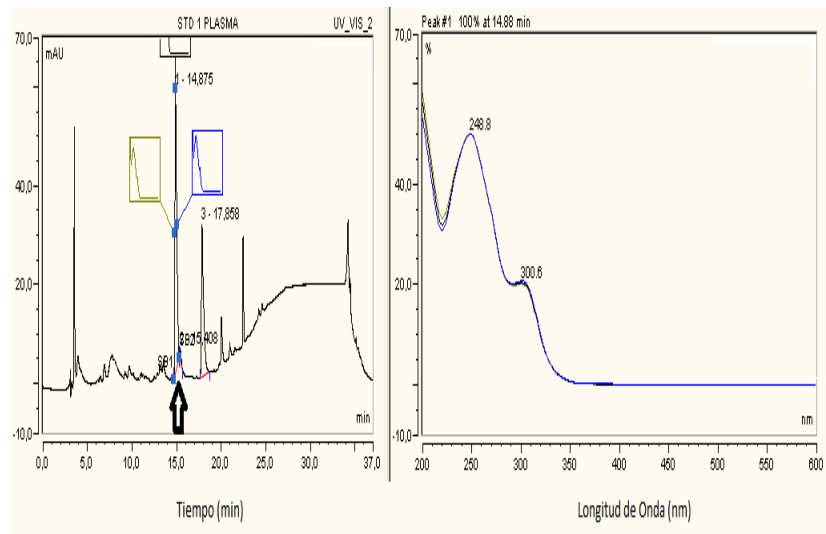
**Figura 4.16.** Curva de calibración de genisteína para cuantificar muestras plasmáticas. Rm: Área media, C: concentración

### B. Vía de administración oral

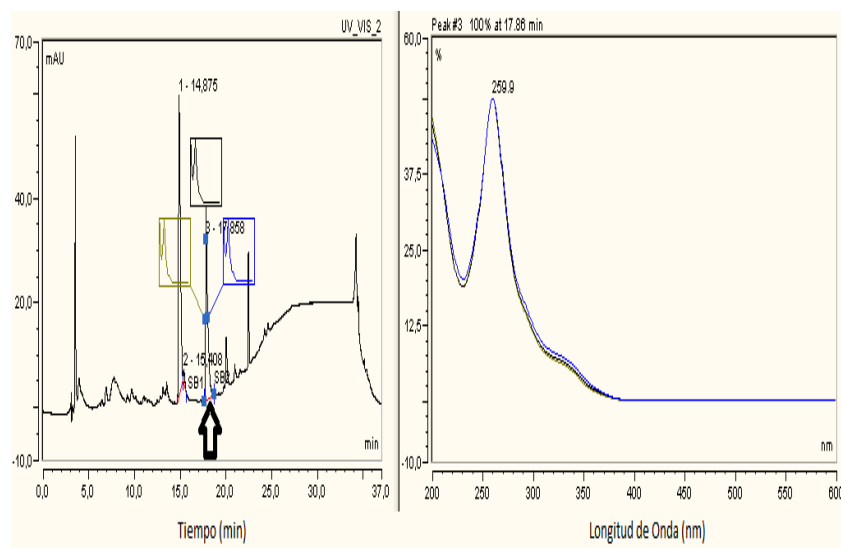
La determinación de las concentraciones plasmáticas de agliconas después de la administración oral de Fisiogen se validó de forma independiente puesto que los niveles plasmáticos son aproximadamente unas cinco veces menores. En consecuencia las curvas se prepararon para rangos inferiores. Los resultados de la validación se presentan en la tabla 4.4. En las figuras 4.17 y 4.18 se presentan un cromatograma de patrón de las isoflavonas en plasma. Se muestra asimismo la identificación de daidzeína y genisteína mediante el espectro de absorción, respectivamente.

Parámetro	Daidzeína (mAU)	Genisteína (mAU)
Rango (ng/mL)	69.76–1116.18	47.70 – 763.26
Linealidad. $r^2$	>0.9992	>0.9996
Precisión. CV (%)	≤ 7.61%	≤ 4.33%
Exactitud. ER (%)	≤ 8.04%	≤ 6.44
Limite de detección. LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	47.05	26.10
Limite de cuantificación. LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	96.53	64.47

**Tabla 4.4.** Parámetros de la validación de la metodología analítica para muestras plasmáticas de las isoflavonas en estudio

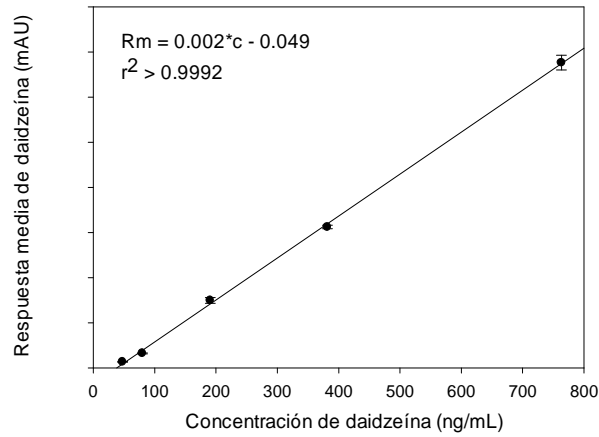


**Figura 4.17.** Patrón de daidzeína en plasma para las concentraciones obtenidas tras administración oral.

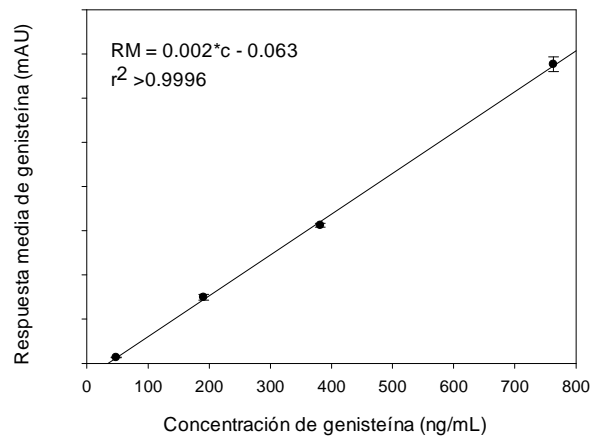


**Figura 4.18.** Patrón de genisteína en plasma para las concentraciones obtenidas tras administración oral.

Las figuras 4.19 y 4.20 muestran las curvas de calibración medias de replicados interdía de daidzeína y genisteína, respectivamente.



**Figura 4.19.** Curva de calibración de daidzeína en muestras plasmáticas obtenidas tras la administración por vía oral.



**Figura 4.20.** Curva de calibración de genisteína en muestras plasmáticas obtenidas tras la administración por vía oral.

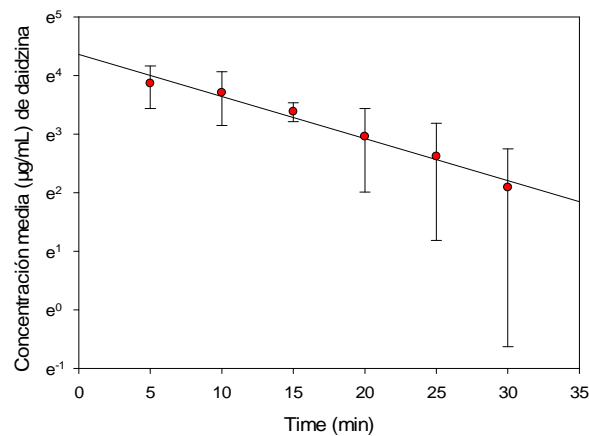
### 4.3. Estudios de absorción *in situ*

#### 4.3.1. Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado.

En la tabla 4.5 y la figura 4.21 se grafica la evolución de los niveles de daidzina con el tiempo. Se calcula el orden de la cinética de degradación del glucósido.

ORDEN	Ecuación	r <sup>2</sup>
0	$C=55.55-1.66*t$	0.97
1	$\ln C=4.36-0.07*t$	0.98

**Tabla 4.5.** Parámetros calculados para las cinéticas de degradación media de la daidzina.

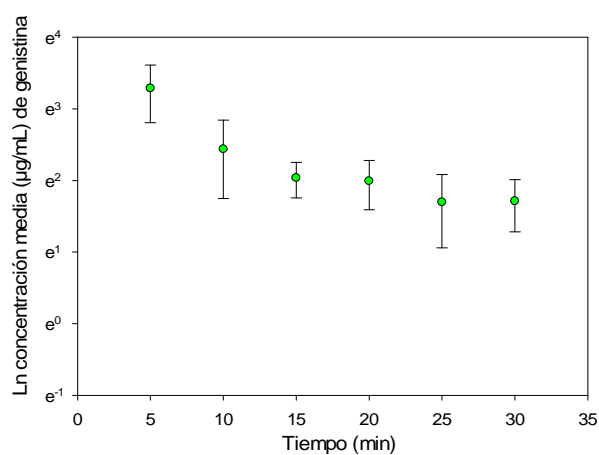


**Figura 4.21.** Evolución de daidzina del Fisiogen® en órgano aislado

En la tabla 4.6 y la figura 4.22 se muestra el resultado del estudio de la evolución de concentraciones de genistina (glucósido) con el tiempo en el intestino delgado.

ORDEN	Ecuación	r <sup>2</sup>
0	$C=23.16-0.71*t$	0.66
1	$\ln C=3.21-0.06*t$	0.81

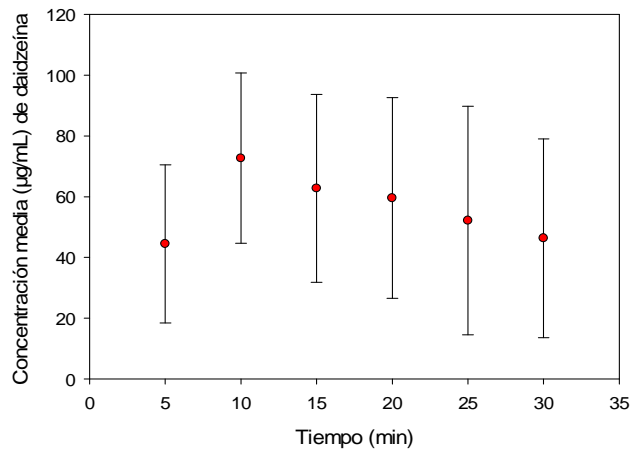
**Tabla 4.6.** Parámetros calculados para las cinéticas de degradación media de la genistina



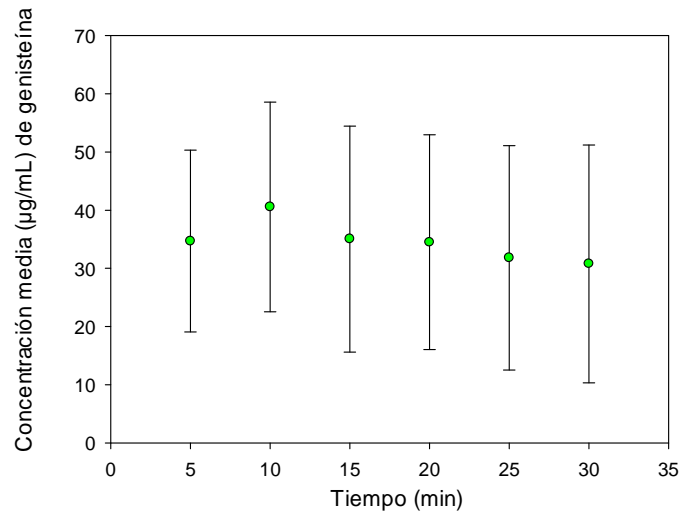
**Figura 4.22.** Evolución de genistina del Fisiogen® en órgano aislado

Los valores de concentración con respecto al tiempo de las agliconas se muestran en las figuras 4.23 y 4.24.





**Figura 4.23.** Evolución de daidzeína del Fisiogen® en órgano aislado.



**Figura 4.24.** Evolución de genisteína del Fisiogen® en órgano aislado

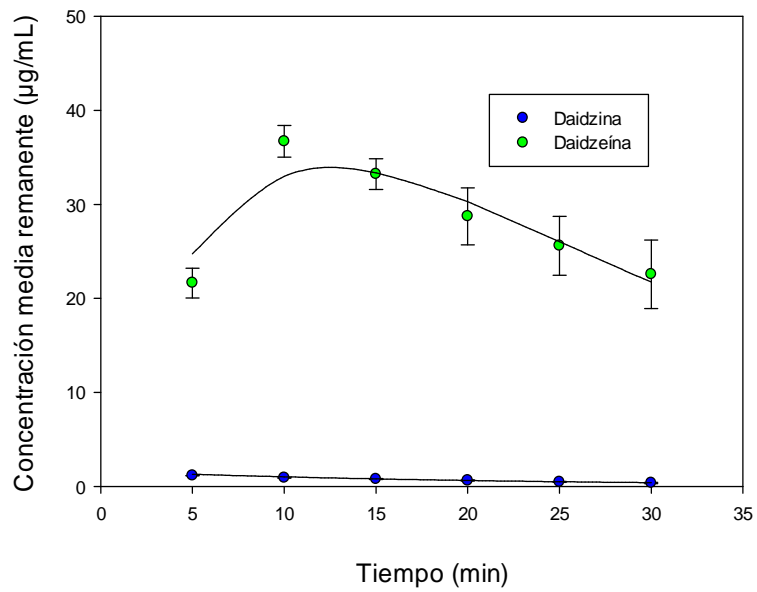
#### 4.3.2. Estudios de absorción mediante la técnica Doluisio

En las tablas 2.17 a 2.26 del anexo 2.2.4, se detallan las concentraciones remanentes en lumen a los tiempos de toma de muestra para cada animal, las constantes de desaparición e hidrólisis individual (obtenidos por regresión no lineal) y su valor medio, así como todos los parámetros estadísticos indicativos de la bondad de los ajustes.

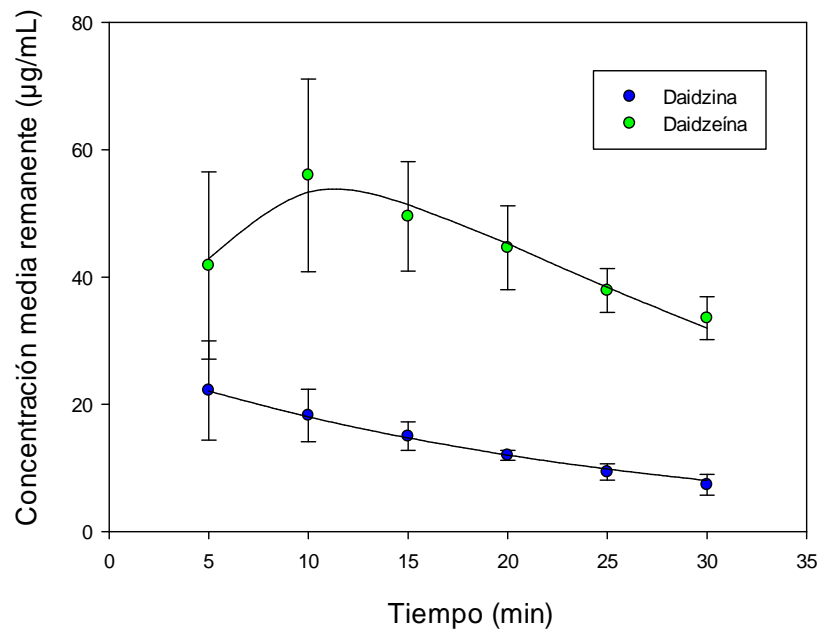
Las cinéticas de hidrólisis de la daidzina y desaparición de la daidzeína correspondientes a cada condición se presentan en las figuras 4.25 a 4.29. En ella se muestra el ajuste del modelo a la rata promedio de las concentraciones remanentes individuales. En la tabla 4.7 se detallan los parámetros obtenidos con la estimación no lineal mediante el método estándar en dos etapas.

Daidzina/daidzeína	$k_h$ (h <sup>-1</sup> )±DE	$k_{des}$ (h <sup>-1</sup> )±DE	$r^2$
Control	3.47 ± 1.09	6.34 ± 1.36	> 0.99
<i>B. adolescentis</i>	2.34 ± 1.12	10.20 ± 0.93	> 0.99
<i>B. animalis subsp. lactis</i>	2.67 ± 0.82	13.41 ± 1.72	> 0.99
<i>L. casei</i>	2.40 ± 0.88	12.33 ± 3.97	> 0.99
<i>L. plantarum</i>	2.17 ± 0.47	11.10 ± 0.82	> 0.99

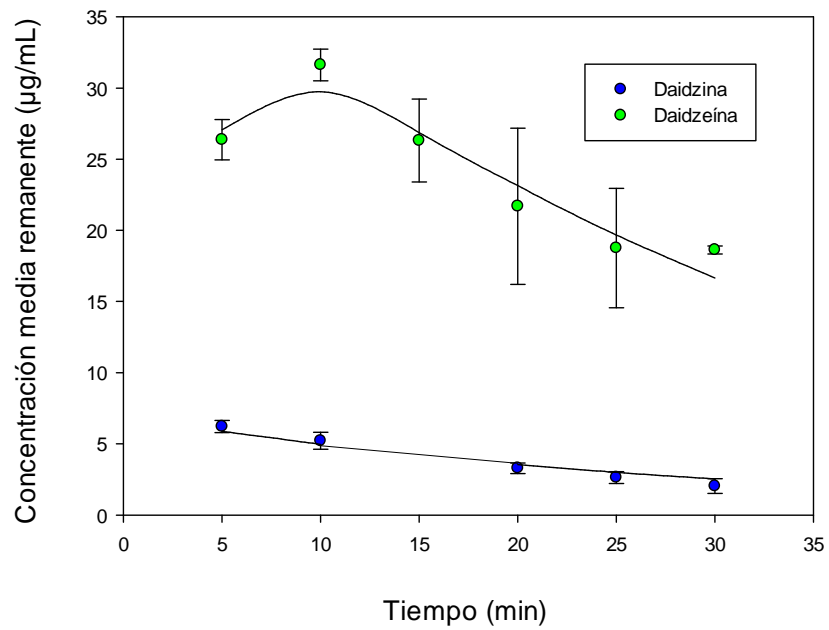
**Tabla 4.7.** Cuadro resumen de los parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de daidzina/daidzeína *in situ*.



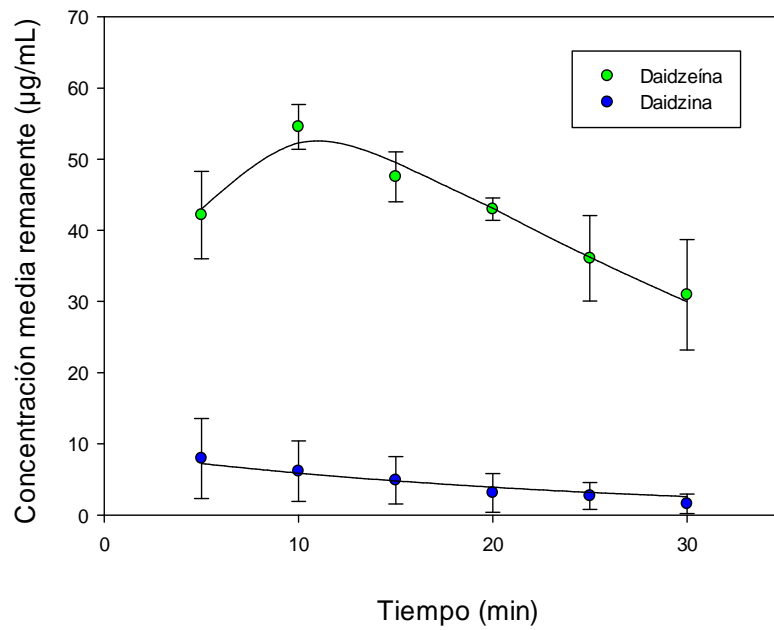
**Figura 4.25.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino en ausencia de pretratamiento (grupo control).



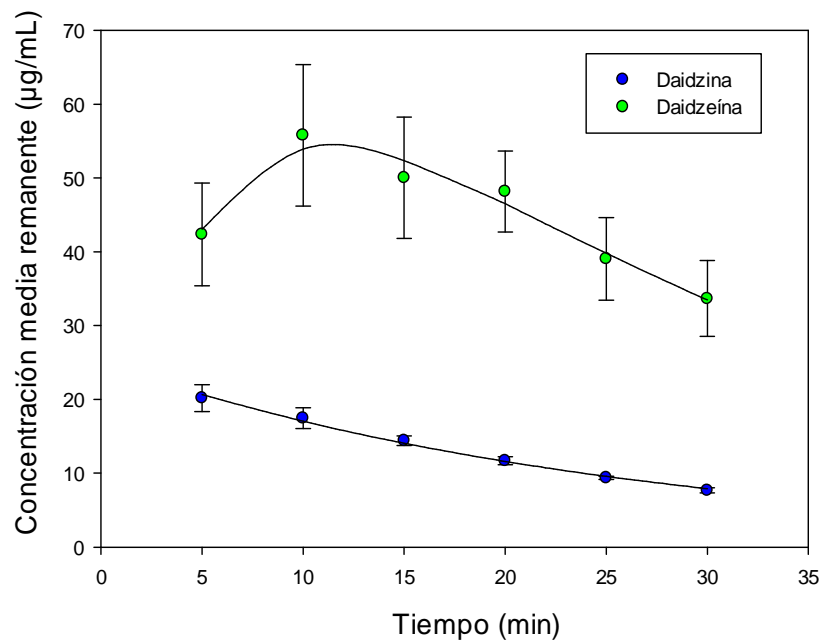
**Figura 4.26.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *B. adolescentis*.



**Figura 4.27.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *B. animalis subsp lactis*.



**Figura 4.28.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *L. casei*

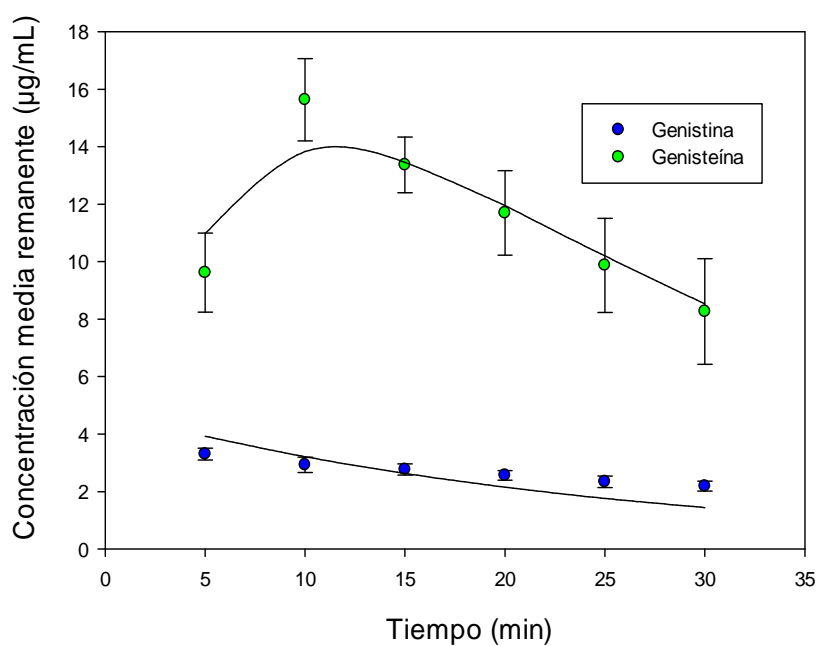


**Figura 4.29.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *L. plantarum*.

En cuanto al proceso de desaparición de la genistina y la formación de absorción de la genisteína, la evolución de las concentraciones remanentes medias de los distintos animales en función del tiempo, en las distintas condiciones, se representan en las figuras 4.30 a 4.34. Los parámetros representativos del ajustado del modelo a los datos individuales se muestran en el Anexo 2.2.4. La tabla 4.8 presenta los valores medios de los ajustes individuales (método estándar en dos etapas).

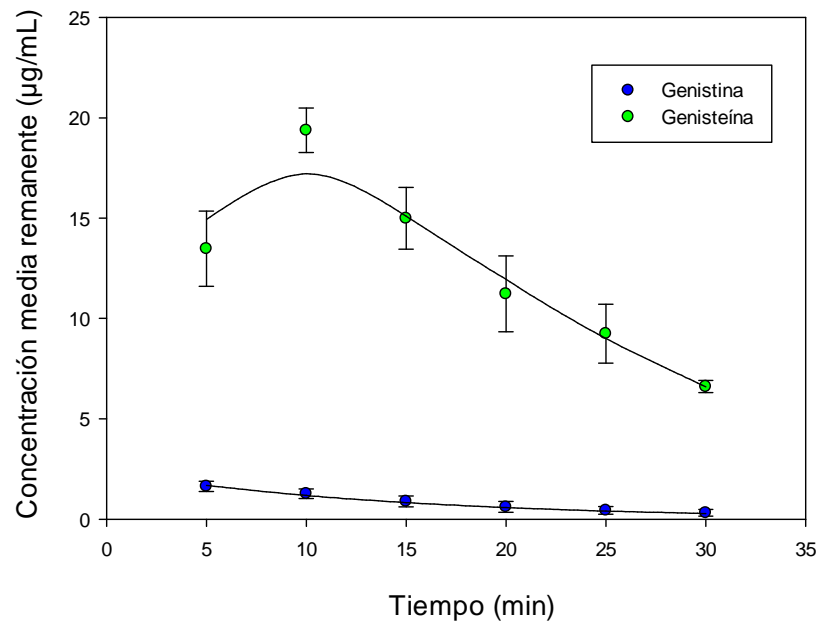
Genistina/genisteína	$k_h$ ( $h^{-1}$ ) $\pm$ DE	$k_{des}$ ( $h^{-1}$ ) $\pm$ DE	$r^2$
Control	$2.38 \pm 0.62$	$9.88 \pm 1.47$	$> 0.97$
<i>B. adolescentis</i>	$4.45 \pm 0.43$	$9.12 \pm 0.18$	$> 0.99$
<i>B. animalis subsp. lactis</i>	$2.72 \pm 1.01$	$12.14 \pm 1.71$	$> 0.99$
<i>L. casei</i>	$4.77 \pm 0.63$	$6.33 \pm 2.75$	$> 0.98$
<i>L. plantarum</i>	$3.27 \pm 1.24$	$10.98 \pm 5.38$	$> 0.99$

**Tabla 4.8.** Cuadro resumen de los parámetros cinéticos de hidrólisis y desaparición de genistina/genisteína *in situ*.

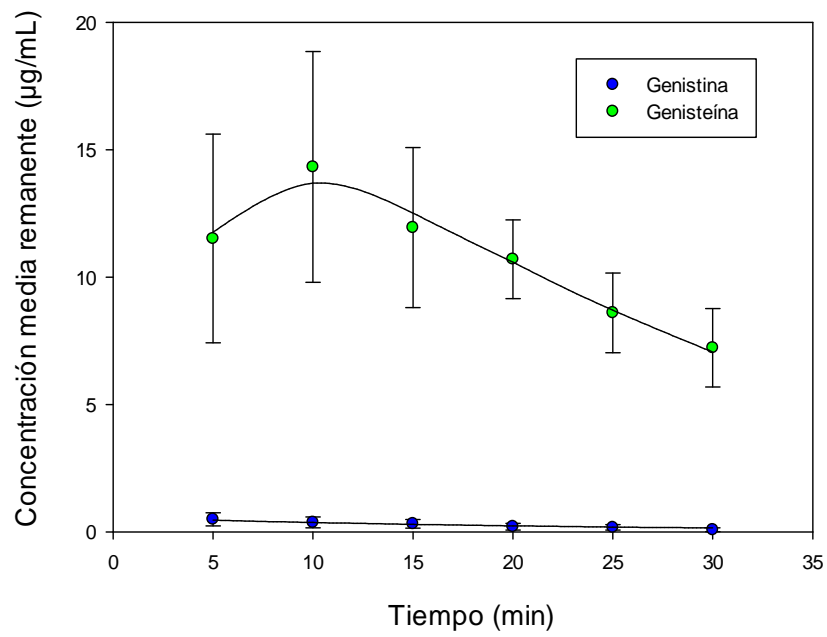


**Figura 4.30.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino en ausencia de pretratamiento (grupo control).

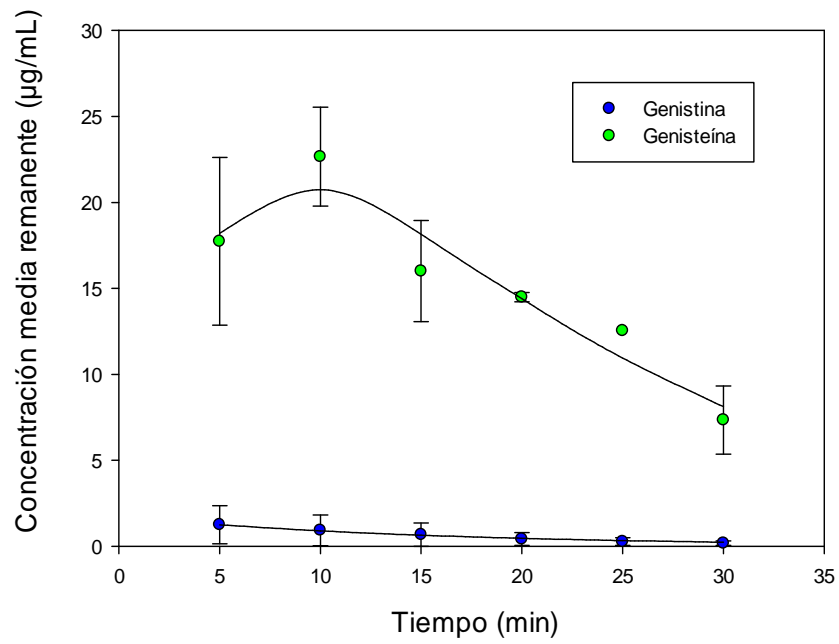




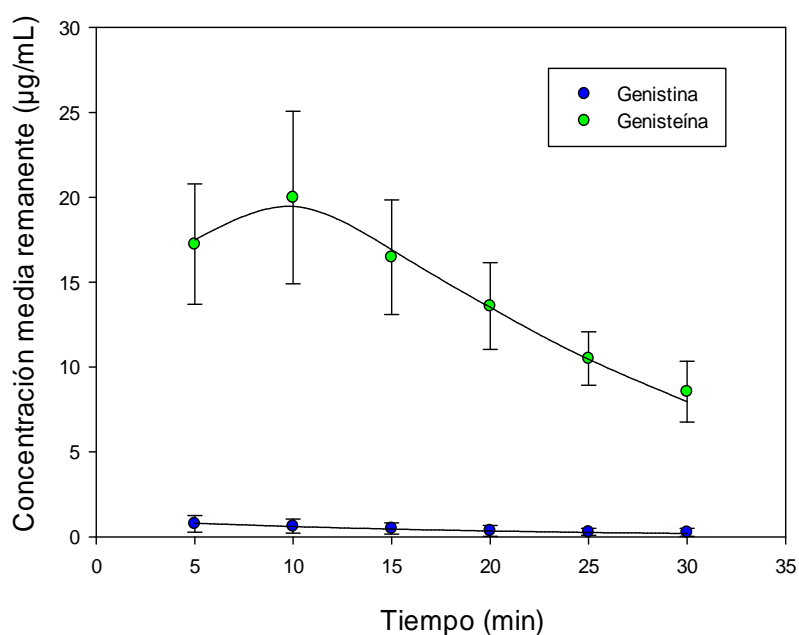
**Figura 4.31.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *B. adolescentis*.



**Figura 4.32.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *B. animalis subsp lactis*.

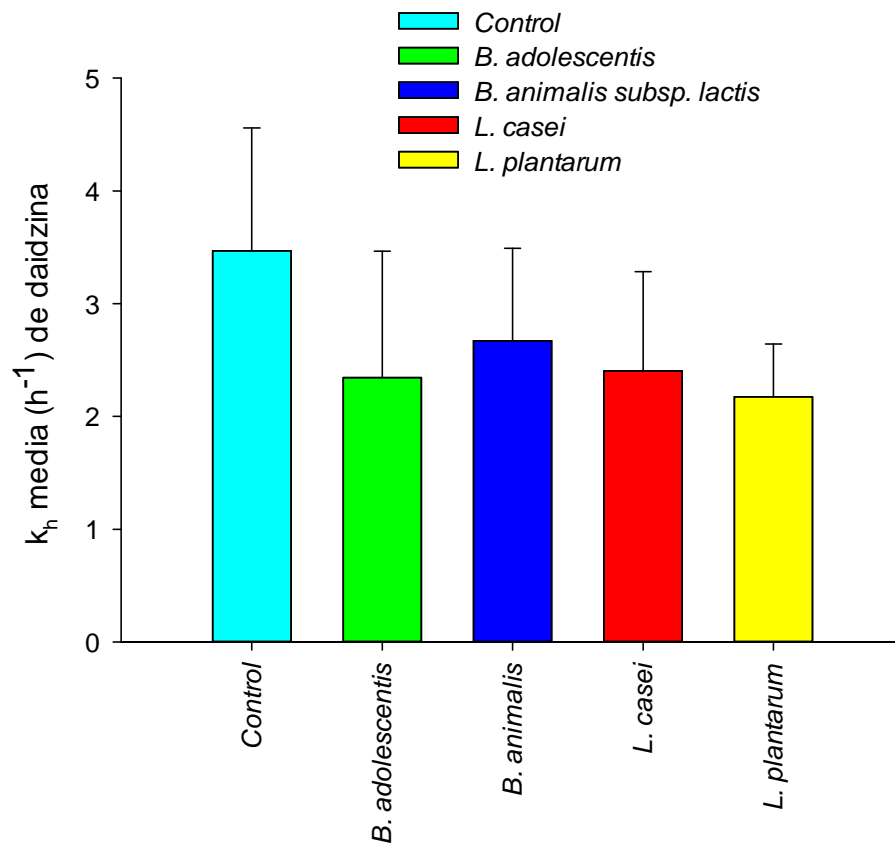


**Figura 4.33.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *L. casei*.

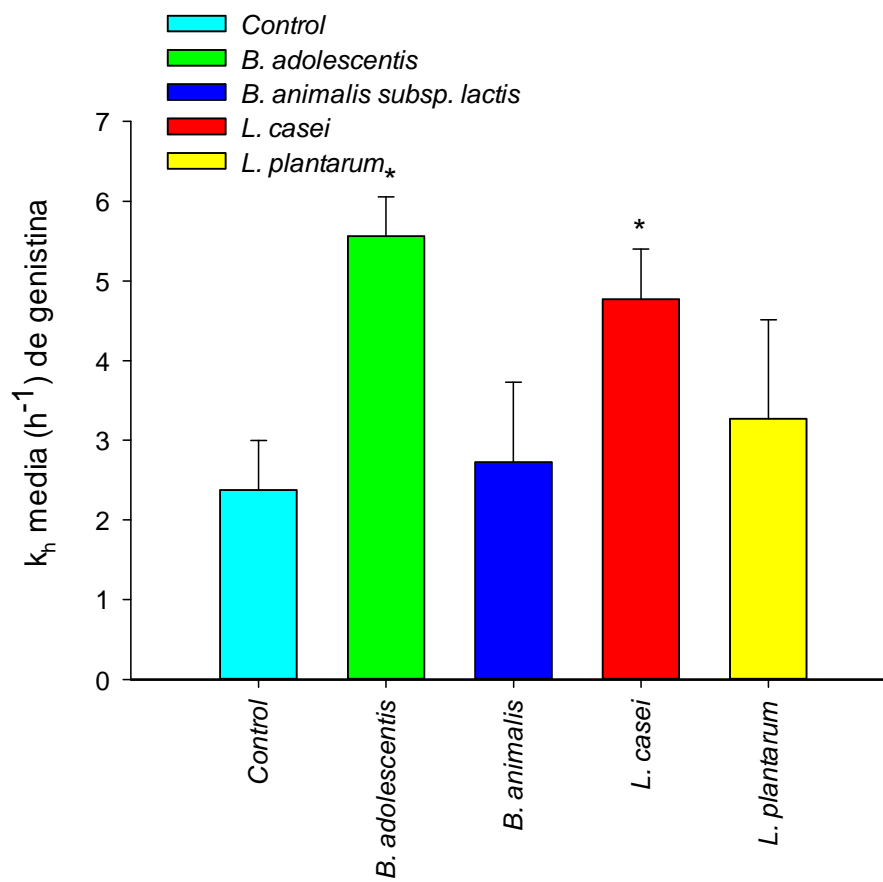


**Figura 4.34.** Cinética de la rata promedio de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *L. plantarum*.

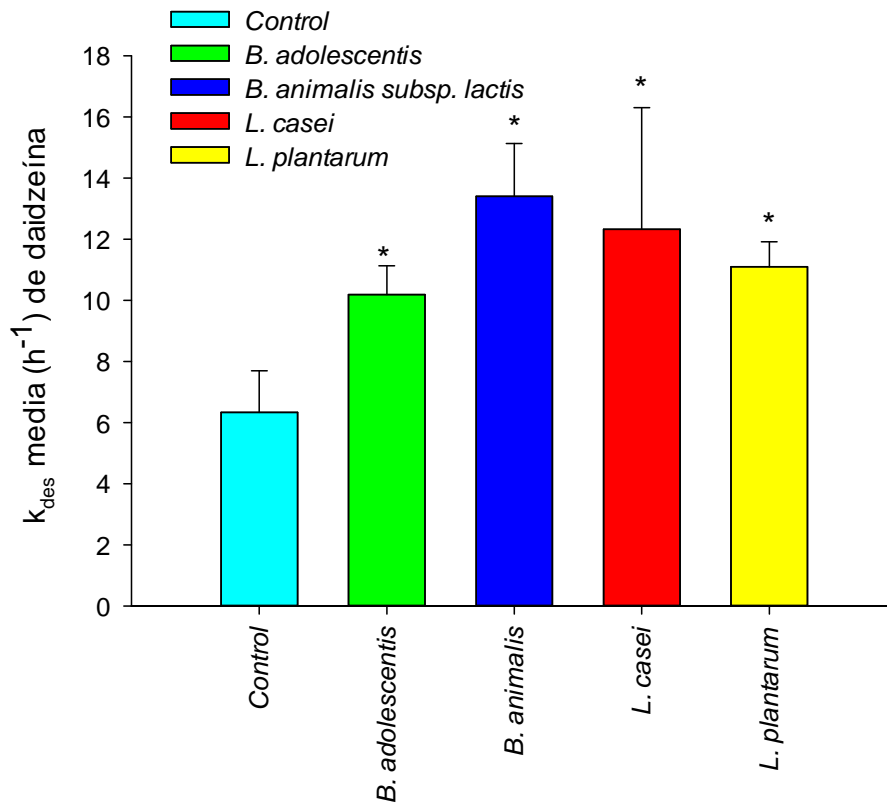
La comparación estadística de los valores de las constantes de hidrólisis y desaparición obtenidas en las distintas condiciones permite detectar si las diferencias entre ellas son significativas (Método 1, ver tablas 2.27 a 2.30 y método 2, ver tablas 2.31 a 2.34 del anexo 2.2.5). Las figuras 4.35 y 4.36 (glucósidos), y 4.37 y 4.38 (agliconas) muestran la comparación de las constantes según el método de tratamiento matemático 1, en presencia o ausencia de las cepas bacterianas y permiten visualizar las diferencias significativas.



**Figura 4.35.** Comparación de la constante de hidrólisis de la daidzina en intestino, tras la administración de cepas bacterianas. \*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).



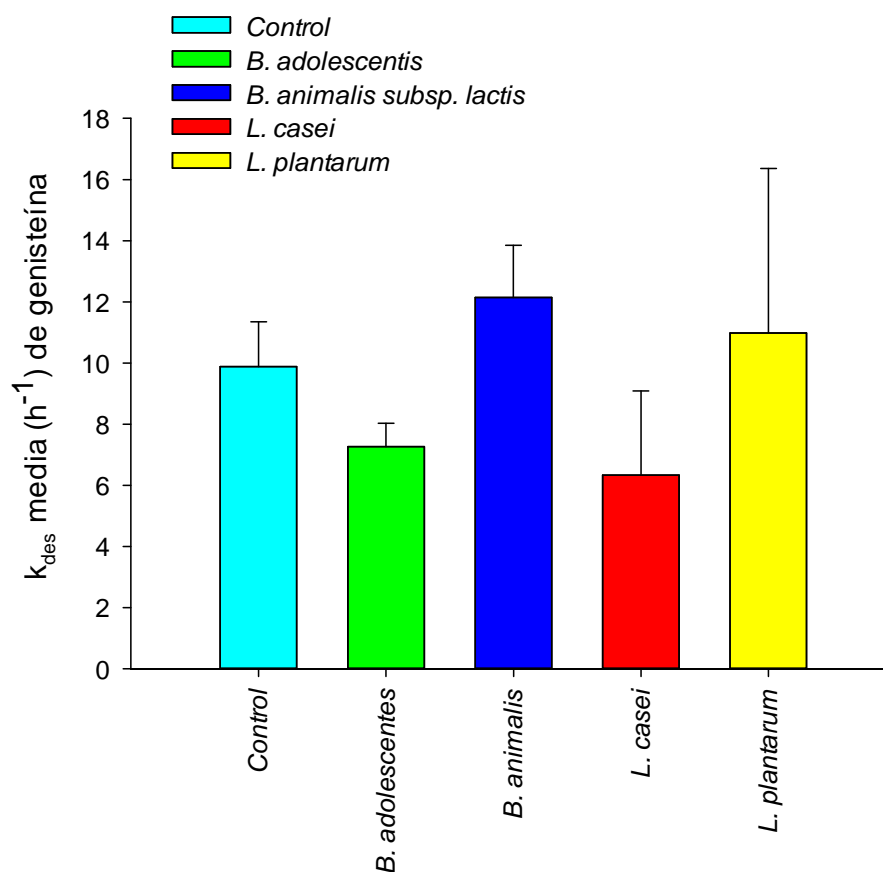
**Figura 4.36.** Comparación de la constante de hidrólisis de la genistina en intestino, tras la administración de cepas bacterianas. \*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).



**Figura 4.37.** Comparación de la constante de desaparición de la daidzeína en intestino, tras la administración de cepas bacterianas.

\*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).

En el caso de genisteína también se detectan diferencias significativas entre las constantes de absorción al someter a pretratamiento a los animales (figura 4.38).



**Figura 4.38.** Comparación de la constante de desaparición de la genisteína en intestino, tras la administración de cepas bacterianas. \*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).

La alternativa al análisis de varianza realizado sobre las constantes de velocidad de absorción individuales y promedias entre los grupos, control y cepas (Método 2) se muestran en las tablas 4.9 y 4.10 para los glucósidos y 4.11 y 4.12 para las agliconas.



Modelo	SC	Mejora en SC	g.l.	F	S
1 ordenada, 5 pendientes	762.70	759.15	24	1388.98	S
1 pendiente, 5 ordenadas	100.43	96.88	24	177.25	S
5 pendientes, 5 ordenadas	3.55		20		
			Ftabulada	3.89	

**Tabla 4.9.** Comparativa de modelos para la cinética de daidzina. SC= suma de cuadrados, g.l.=grados de libertad, S= Significación

Modelo	SC	Mejora en SC	g.l.	F	S
1 ordenada, 5 pendientes	1377.81	1377.70	24	80376.88	S
1 pendiente, 5 ordenadas	0.57	0.46	24	26.77	S
5 pendientes, 5 ordenadas	0.11		20		
			Ftabulada	3.89	

**Tabla 4.10.** Comparativa de modelos para la cinética de genistina. SC= suma de cuadrados, g.l.=grados de libertad, S= Significación.

Modelo	SC	Mejora en SC	g.l.	F	S
1 ordenada, 5 pendientes	630.04	605.81	24	162.49	S
1 pendiente, 5 ordenadas	83.63	59.40	24	15.93	S
5 pendientes, 5 ordenadas	24.23		20		
			Ftabulada	3.89	

**Tabla 4.11.** Comparativa de modelos para la cinética de daidzeína. SC= suma de cuadrados, g.l.=grados de libertad, S= Significación

Modelo	SC	Mejora en SC	g.l.	F	S
1 ordenada, 5 pendientes	1034.22	1023.17	24	601.78	S
1 pendiente, 5 ordenadas	34.41	23.35	24	13.74	S
5 pendientes, 5 ordenadas	11.05		20		
			Ftabulada	3.89	

**Tabla 4.12.** Comparativa de modelos para la cinética de genisteína. SC= suma de cuadrados, g.l.=grados de libertad, S= Significación.

### 4.3. Estudios *in vivo*

#### 4.3.1. Cinética plasmática de las isoflavonas

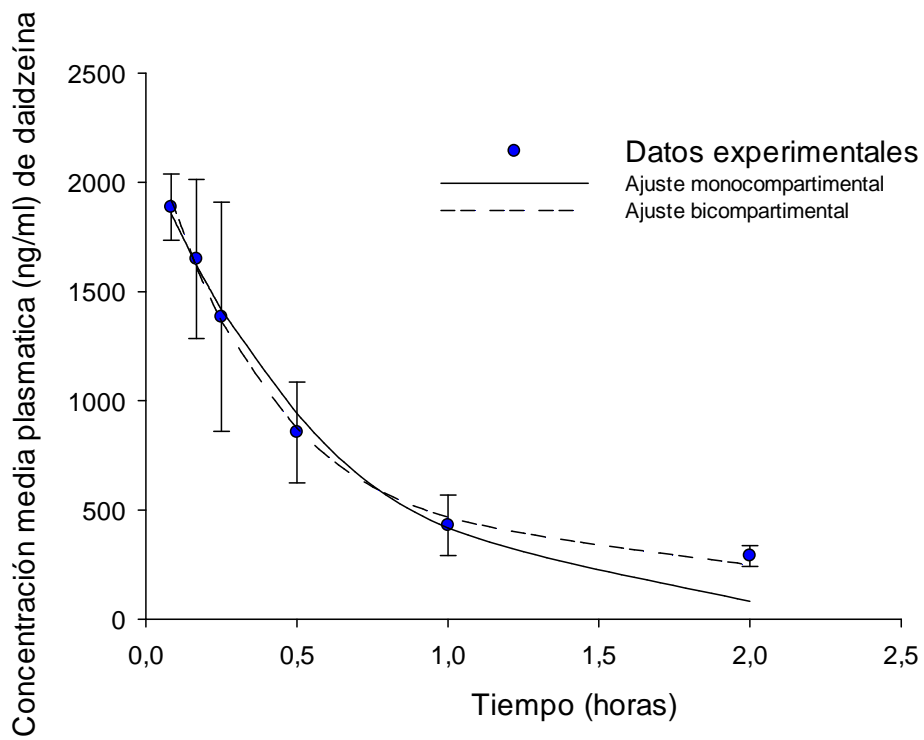
##### A. Grupo control

En la tabla 4.13 se presentan los parámetros cinéticos estimados junto con los índices de bondad del ajustado.

<u>Parámetro cinético</u>	Daidzeína	Genisteína
	<b>Monocompartimental</b>	
$k_{el} (h^{-1}) \pm DE$	1.56 $\pm$ 0.52	1.61 $\pm$ 0.45
$C_0 (ng/mL)$	2057.8 $\pm$ 343.6	1777.9 $\pm$ 456.7
AICm	66.14	110.02
$r^2$	0.96	0.93
	<b>Bicompartimental</b>	
$A(ng/mL) \pm DE$	1709.4 $\pm$ 786.5	7634.3 $\pm$ 2459.5
$\alpha(h^{-1}) \pm DE$	3.56 $\pm$ 2.93	9.45 $\pm$ 4.26
$B(ng/mL) \pm DE$	666.6 $\pm$ 105.5	662.2 $\pm$ 236.7
$\beta(h^{-1}) \pm DE$	0.37 $\pm$ 0.18	0.49 $\pm$ 0.46
AICb	51.18	45.25
$r^2$	0.99	0.99
<b>F Snedecor</b>	<b>5.21</b>	<b>1304</b>
<b>F tabulada</b>	<b>19.25</b>	<b>4.14</b>

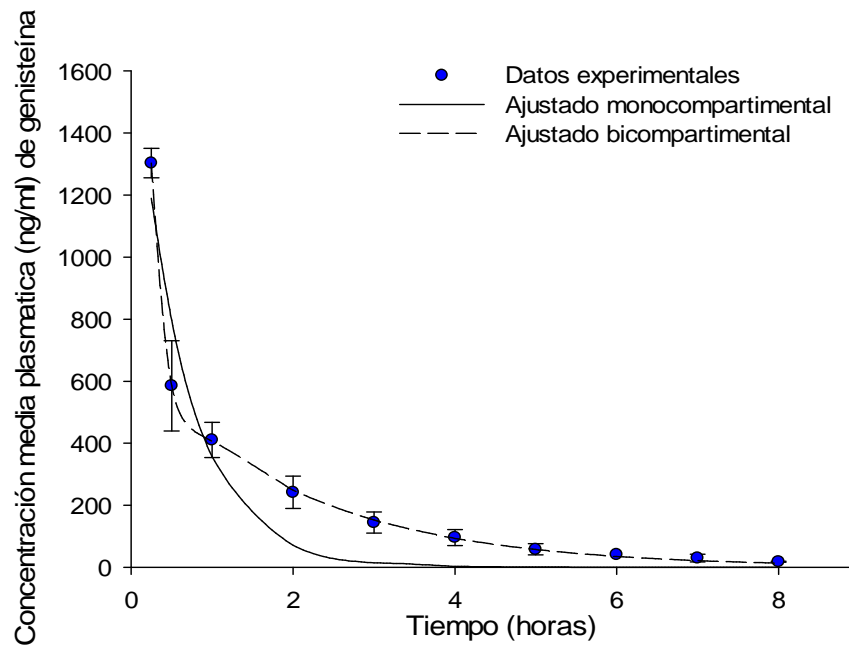
**Tabla 4.13.** Cuadro resumen de los parámetros cinéticos de daidzeína y genisteína en el grupo control.

Las curvas de nivel plasmático obtenidas tras la administración intravenosa de isoflavonas al grupo control se detallan en el anexo 2.3.1 (ver tablas 2.35 y 2.41). El ajustado de la rata media correspondiente a la vía intravenosa se presenta en la figura 4.39 para la daidzeína.



**Figura 4.39.** Ajustado de los niveles medios de daidzeína en el grupo control tras administración intravenosa

En la figura 4.40 se presenta los resultados del ajustado correspondiente a genisteína plasmática tras la administración intravenosa para el grupo control.



**Figura 4.40.** Ajustado de los niveles medios de genisteína en el grupo control tras administración intravenosa.

- **Estimación de la biodisponibilidad oral.**

La tabla 4.14 muestra el valor de AUC correspondiente a daidzeína y genisteína tras la administración por vía intravenosa.

<u>Parámetro cinético</u>	Daidzeína	Genisteína
<b><math>AUC_{0-8}</math> (ng/mL*h) <math>\pm</math> DE</b>	2560.85 $\pm$ 416.85	3657.14 $\pm$ 41.04

**Tabla 4.14.** Cuadro resumen del área bajo la curva tras la administración intravenosa

Los resultados expuestos permiten estimar la biodisponibilidad de daidzeína y genisteína tras su administración como extracto obtenido a partir de Fisiogen®. Los valores correspondientes se resumen en la Tabla 4.15:

<b>Daidzeína</b>	<b><math>AUC_{extravasal}(\text{ng/mL}\cdot\text{h})</math></b>	1347.91	<b>F=52.63%</b>
	<b><math>AUC_{iv}(\text{ng/mL}\cdot\text{h})</math></b>	2560.85	
<b>Genisteína</b>	<b><math>AUC_{extravasal}(\text{ng/mL}\cdot\text{h})</math></b>	1914.35	<b>F=51.93%</b>
	<b><math>AUC_{iv}(\text{ng/mL}\cdot\text{h})</math></b>	3686.26	

**Tabla 4.15.** Cuadro resumen de los parámetros cinéticos para la estimación de la biodisponibilidad oral de daidzeína y genisteína

En la tabla 4.16 se presentan los resultados del tratamiento no compartimental de las curvas de nivel plasmático de daidzeína frente al tiempo, correspondientes a los animales tratados con las cepas bacterianas.

Daidzeína	$AUC_{0-8}$ (ng/mL*h) $\pm$ DE	$C_{max} \pm DE$ (ng/mL)	$t_{max} \pm DE$ (h)
Control	1347.91 $\pm$ 432.00	557.92 $\pm$ 103.62	0.44 $\pm$ 0.13
<i>B. adolescentis</i>	662.60 $\pm$ 0.00	97.78 $\pm$ 0.00	8.00 $\pm$ 0.00
<i>B. animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	150.15 $\pm$ 0.00	92.99 $\pm$ 0.00	0.75 $\pm$ 0.00
<i>L. casei</i>	741.88 $\pm$ 84.43	130.02 $\pm$ 12.46	3.50 $\pm$ 2.29
<i>L. plantarum</i>	1159.94 $\pm$ 382.14	480.77 $\pm$ 186.36	0.31 $\pm$ 0.13

**Tabla 4.16.** Cuadro resumen de los parámetros cinéticos calculados para daidzeína.

En la tabla siguiente se muestran los parámetros no compartimentales estimados a partir de las curvas de nivel plasmático de genisteína tras la administración oral de Fisiogen® en animales pretratados con cepas bacterianas.

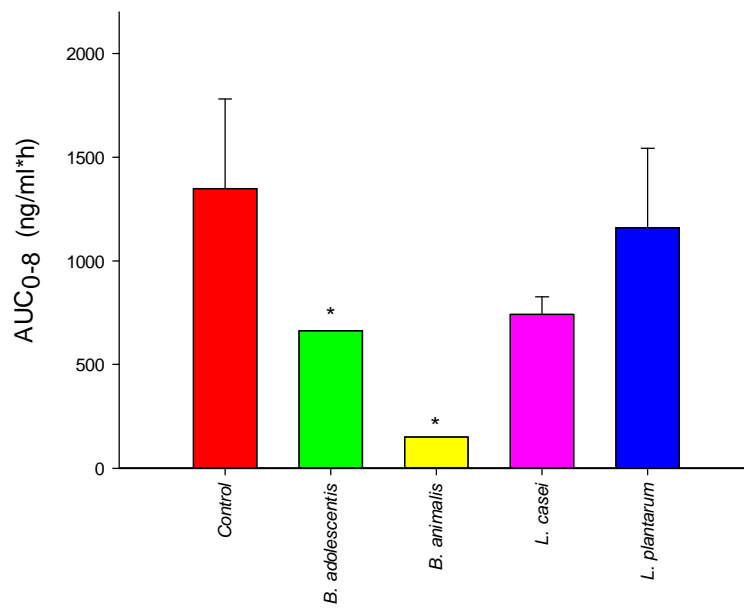
Genisteína	$AUC_{0-8}$ (ng/mL*h) ± DE	$C_{max} \pm DE$ (ng/mL)	$t_{max} \pm DE$ (h)
Control	1914.35±585.74	319.52±54.37	3.00±1.41
<i>B. adolescentis</i>	2103.71±155.77	356.80±80.78	1.88±2.10
<i>B. animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	1257.26±29.41	194.71±33.32	6.00±1.00
<i>L. casei</i>	1160.65±1074.77	251.39±170.50	0.92±0.35
<i>L. plantarum</i>	2345.95±309.17	378.02±64.29	1.88±2.76

**Tabla 4.17.** Cuadro resumen de los parámetros cinéticos calculados para genisteína.

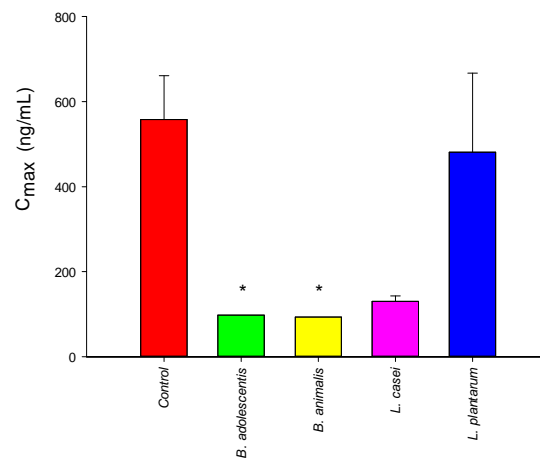
La prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, ver anexo 2.3.1.1) realizada a las concentraciones plasmáticas individuales obtenidas para cada tiempo y cepa ensayada mostró un valor Z de 3.04 y 1.44, asimismo la significación asintótica (bilateral) de 0.00 y 0.03, para daidzeína y genisteína.

Se han llevado a cabo comparaciones de estos parámetros entre sí y respecto al grupo control para estudiar la influencia del pretratamiento. Los resultados correspondientes a daidzeína se presentan en las figuras 4.41 ( $AUC$ ) y 4.42 ( $C_{max}$ ).



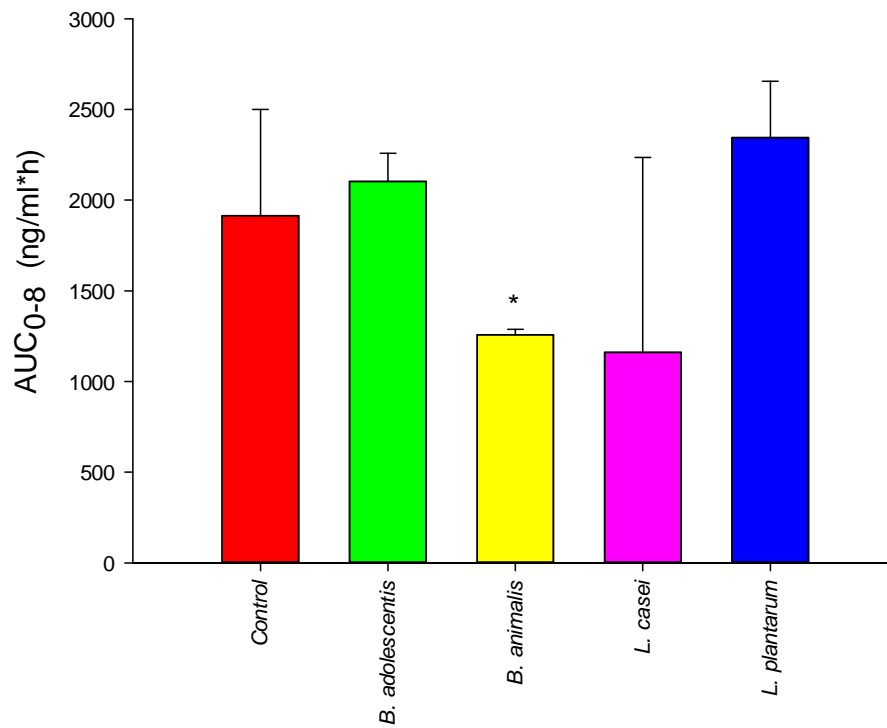


**Figura 4.41.** Comparación del  $AUC_{\text{parcial}}$  medio de la daidzeína en concentraciones plasmáticas, tras la administración de cepas bacterianas. \*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).

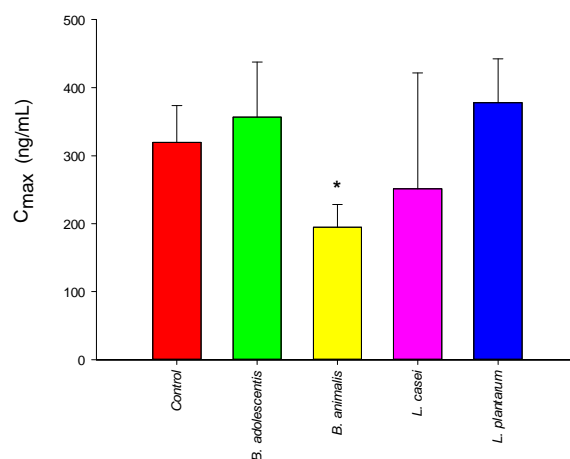


**Figura 4.42.** Comparación del C<sub>max</sub> medio de la daidzeína, tras la administración de cepas bacterianas. \*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).

De igual manera se ha procedido con los resultados de genisteína que se grafican en las figuras 4.43 (*AUC*) y 4.44 (*C<sub>max</sub>*).



**Figura 4.43.** Comparación del  $AUC_{\text{parcial}}$  medio de la genisteína, tras la administración de cepas bacterianas. \*diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).



**Figura 4.44.** Comparación del  $C_{max}$  medio de la genisteína, tras la administración de cepas bacterianas. \*Diferencias significativas frente a control ( $\alpha < 0.05$ ).

#### 4.3.2. Resumen.

En la tabla 4.18 se muestran conjuntamente los resultados obtenidos a partir de los ensayos *in situ* para los glucósidos y agliconas, tanto en el grupo control como en los grupos de animales sometidos a pretratamiento con las cepas bacterianas estudiadas.

<b>Parámetro cinético</b>	<b>Daidzina <math>k_h(h^{-1})\pm DE</math></b>	<b>Daidzeína <math>k_{des}(h^{-1})\pm DE</math></b>	<b>Genistina <math>k_h(h^{-1})\pm DE</math></b>	<b>Genisteína <math>k_{des}(h^{-1})\pm DE</math></b>
<b>Control</b>	3.47±1.09	6.34±1.36	2.38±0.62	9.88±1.47
<b><i>B. adolescentis</i></b>	2.34±1.12	10.20±0.93	4.45±0.43	9.12±0.18
<b><i>B. animalis</i></b>	2.67±0.82	13.41±1.72	2.72±1.01	12.14±1.71
<b><i>L. casei</i></b>	2.40±0.88	12.33±3.97	4.77±0.63	6.33±2.75
<b><i>L. plantarum</i></b>	2.17±0.47	11.10±0.82	3.27±1.24	10.98±5.38

**Tabla 4.18.** Cuadro resumen de los resultados obtenidos para las constantes de hidrolisis y desaparición para daidzina/daidzeína y genistina/genisteína.

En las tablas 4.19 y 4.20 se muestran el resumen de los resultados obtenidos en el grupo control y en los grupos de animales sometidos a pretratamiento con las cepas bacterianas estudiadas.

<u>Parámetro</u> <u>cinético</u>	$k_{des}$ <i>in situ</i> (h <sup>-1</sup> ) ±DE	$AUC_{0-8}$ (ng/mL*h) ± DE	$C_{max}$ ± DE (ng/mL)
<b>Control</b>	6.34±1.36	1347.91±432.00	557.92±103.62
<b><i>B. adolescentis</i></b>	10.20±0.93	662.60±0.00	97.78±0.00
<b><i>B. animalis</i></b>	13.41±1.72	150.15±0.00	92.99±0.00
<b><i>L. casei</i></b>	12.33±3.97	741.88±84.43	130.02±12.46
<b><i>L. plantarum</i></b>	11.10±0.82	1159.94±382.14	480.77±186.36

**Tabla 4.19.** Cuadro resumen de los resultados obtenidos para daidzeína.

<u>Parámetro</u> <u>cinético</u>	$k_{des}$ <i>in situ</i> (h <sup>-1</sup> ) ±DE	$AUC_{0-8}$ (ng/mL*h) ± DE	$C_{max}$ ± DE (ng/mL)
<b>Control</b>	9.88±1.47	1914.35±585.74	319.52±54.37
<b><i>B. adolescentes</i></b>	9.12±0.18	2103.71±155.77	356.80±80.78
<b><i>B. animalis</i></b>	12.14±1.71	1257.26±29.41	194.71±33.32
<b><i>L. casei</i></b>	6.33±2.75	1160.65±1074.77	251.39±170.50
<b><i>L. plantarum</i></b>	10.98±5.38	2345.95±309.17	378.02±64.29

**Tabla 4.20.** Cuadro resumen de los resultados obtenidos para genisteína.

Las tablas 4.21 a 4.22 muestran cuadros comparativos de los principales resultados para una mejor composición.

	$k_h$ daidzina	$k_{des}$ daidzeína	$k_h$ genistina	$k_{des}$ genisteína
<b><i>B. adolescentis</i></b>	↓	↑	↑	↓
<b><i>B. animalis</i></b>	↓	↑	↑	↑
<b><i>L. casei</i></b>	↓	↑	↑	↓
<b><i>L. plantarum</i></b>	↓	↑	↑	↑

Tabla 4.21. Cuadro comparativo de los resultados de la constante de hidrólisis y desaparición obtenidos (glucósidos y agliconas).

$k_h$ daidzina	$k_{des}$ daidzeína	$k_h$ genistina	$k_{des}$ genisteína
Control	<b><i>B. animalis</i></b>	<b><i>L. casei</i></b>	<b><i>B. animalis</i></b>
<b><i>B. animalis</i></b>	<b><i>L. casei</i></b>	<b><i>B. adolescentis</i></b>	<b><i>L. plantarum</i></b>
<b><i>L. casei</i></b>	<b><i>L. plantarum</i></b>	<b><i>L. plantarum</i></b>	Control
<b><i>B. adolescentis</i></b>	<b><i>B. adolescentis</i></b>	<b><i>B. animalis</i></b>	<b><i>B. adolescentis</i></b>
<b><i>L. plantarum</i></b>	Control	Control	<b><i>L. casei</i></b>

Tabla 4.22. Cuadro comparativo de la constante de hidrólisis y desaparición obtenidos, ordenados de mayor a menor.

	$k_{des}$ daidzeína	$AUC_{0-8}$ daidzeína	$k_{des}$ genisteína	$AUC_{0-8}$ genisteína
<b><i>B. adolescentes</i></b>	↑	↓	↓	↓
<b><i>B. animalis</i></b>	↑	↓	↑	↓
<b><i>L. casei</i></b>	↑	↓	↓	↓
<b><i>L. plantarum</i></b>	↑	↓	↑	↑

Tabla 4.23. Cuadro comparativo de los resultados obtenidos con respecto a control para daidzeína y genisteína

$k_{des}$ daidzeína	$AUC_{0-8}$ daidzeína	$k_{des}$ genisteína	$AUC_{0-8}$ genisteína
<b><i>B. animalis</i></b>	Control	<b><i>B. animalis</i></b>	<b><i>L. plantarum</i></b>
<b><i>L. casei</i></b>	<b><i>L. plantarum</i></b>	<b><i>L. plantarum</i></b>	Control
<b><i>L. plantarum</i></b>	<b><i>L. casei</i></b>	Control	<b><i>B. adolescentis</i></b>
<b><i>B. adolescentis</i></b>	<b><i>B. adolescentis</i></b>	<b><i>B. adolescentis</i></b>	<b><i>B. animalis</i></b>
Control	<b><i>B. animalis</i></b>	<b><i>L. casei</i></b>	<b><i>L. casei</i></b>

Tabla 4.24. Cuadro comparativo de los resultados cinéticos obtenidos con respecto a control para daidzeína y genisteína ordenados de mayor a menor



## **5. DISCUSIÓN**



### 5.1. Capacidad hidrolítica y selección de cepas bacterianas

En la figura 4.1 del apartado de resultados se analiza la capacidad hidrolítica sobre las isoflavonas en estudio y entre los *Lactobacillus* y *E. Faecium*. Queda patente que de las especies ensayadas son *L. casei* y *L. plantarum* las más interesantes desde el punto de vista de conversión de ambos glucósidos a sus respectivas agliconas. En cuanto al género *Bifidobacterium* (figura 4.2), las cepas que demostraron mayor capacidad hidrolítica fueron *B. adolescentis* y *B. animalis subsp lactis*. Estas 4 cepas son las que seleccionaron para los estudios posteriores.

### 5.2. Metodologías analíticas

Se estableció como paso previo a la realización de los experimentos *in situ* e *in vivo*, una selección de posibles metodologías para la cuantificación de las isoflavonas. En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica avanzada de metodologías acordes al proceso experimental. En el momento de dicha búsqueda se plantearon alternativas como son: la cuantificación por espectrofotometría ultravioleta, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección de fotodiodos, la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de masas. Razones de sensibilidad y coste aconsejaron la selección de un método de HPLC acoplado a un detector ultravioleta de fotodiodos y un detector de fluorescencia.

Esta metodología es de las más utilizadas por los investigadores para analizar las isoflavonas provenientes de la soja porque la detección de fotodiodos facilita la identificación e integración de patrones simultáneos con diferentes espectros ultravioleta<sup>109-111</sup>.

### 5.2.1. Estudios *in situ*

Los resultados confirman que el método es adecuado para el objetivo que se persigue ya que es lineal en el ámbito de concentraciones necesario. Las curvas de calibrado para los glucósidos (daidzina y genistina) son lineales ( $r > 0.999$ ), precisas ( $CV < 6.4\%$  en ambos casos) y exactas ( $ER < 10.1\%$ ). Por otro lado, el ajuste de las curvas de calibrado de las agliconas demuestran su linealidad ( $r > 0.999$ ), son precisas ( $CV < 15\%$  en ambos casos) y exactas ( $ER < 5.5\%$ ) (Ver epígrafe 4.2.1, tabla 4.1 y 4.2, figuras 4.1 a 4.12).

El límite de detección y cuantificación se encuentra en todos los casos por encima de las concentraciones estimadas en los ensayos realizados para cada una de las condiciones.

### 5.2.2. Estudios *in vivo*

Para los estudios *in vivo* fue necesario establecer dos ámbitos de concentraciones y las correspondientes validaciones de la metodología analítica ya que los resultados de las concentraciones de las muestras plasmáticas de la administración por vía intravenosa fueron superiores a las de la vía oral.

#### A. Vía de administración intravenosa

Los parámetros estimados permiten considerar satisfactoria la validación del método analítico en el ámbito de concentraciones que requieren estos ensayos. Los valores resultantes de la validación de la metodología muestran linealidad ( $r > 0.999$ ), una elevada precisión y exactitud ( $CV < 8.4\%$  y  $ER < 18.6\%$ , respectivamente). Se presentan en la tabla 4.3 y las figuras 4.13 a 4.16.

## **B. Vía de administración oral**

Los resultados confirman que el método es adecuado para el objetivo que se persigue ya que es lineal en el ámbito concentraciones necesario ( $r > 0.999$ ), es preciso ( $CV < 7.6\%$ ) y exacto ( $ER < 8.0\%$ ). Se muestran en la tabla 4.4 y las figuras 4.17 a 4.20.

Los resultados de la validación de los métodos analíticos corroboran la puesta a punto de los mismos, con lo cual el primer objetivo de la tesis, que era imprescindible para la realización del proyecto, se ha cubierto.

### **5.3. Estudios *in situ***

#### **5.3.1. Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado**

El experimento se desarrolló como paso previo al estudio de absorción, únicamente en el grupo control. Su objetivo era discriminar en qué medida se producía la hidrólisis de los glucósidos en condiciones normales en el intestino.

Los resultados para daidzina-daidzeína indican que la flora autóctona del intestino es capaz de producir hidrólisis de la daidzina. Este proceso de hidrólisis sigue una cinética de orden uno (tabla 4.5, figura 4.21). Paralelamente se observa la aparición de daidzeína (figura 4.23), seguida de una desaparición que indica una posterior degradación de la aglicona.

Sin embargo los resultados de genistina (tabla 4.6, figura 4.22) muestran una desaparición que podría atribuirse bien a un proceso de hidrólisis o a la entrada en la mucosa que se produce en los primeros

minutos de administración de los compuestos. Este proceso parece más acorde a los resultados ya que la concentración de genisteína se mantiene relativamente estable al menos durante el tiempo que dura el ensayo *in situ* (figura 4.24).

Estos resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores que describen cómo en presencia de la microbiota la metabolización es efectiva (ver epígrafe 1.4).

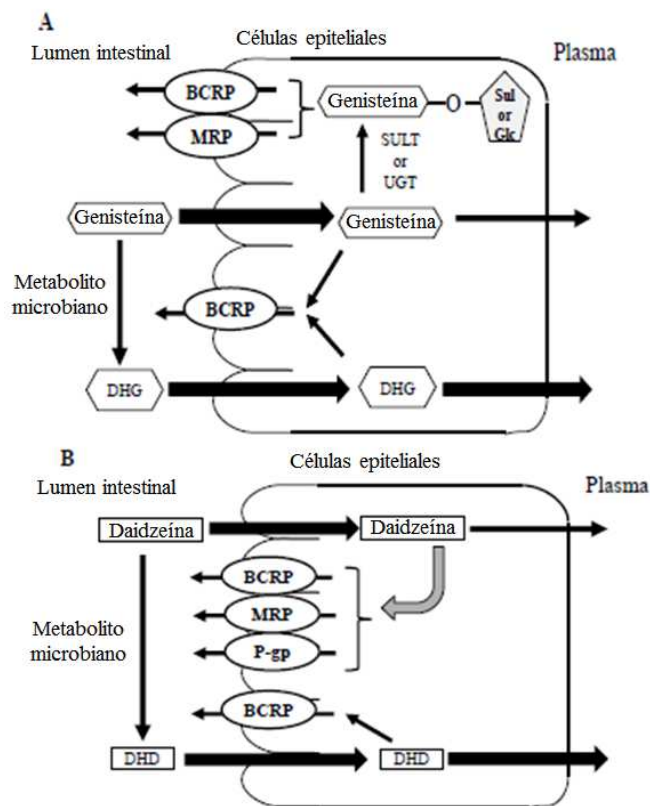
### **5.3.2. Ensayo de absorción**

La velocidad de absorción se ha determinado experimentalmente mediante el método de perfusión sin recirculación, originalmente descrito por Doluisio et al<sup>106</sup>. Esta técnica conserva la funcionalidad de la capa acuosa de difusión, reproduce las condiciones fisiológicas y permite obtener constantes suficientemente discriminativas entre diferentes compuestos.

Para estimar las constantes de velocidad que rigen el cambio de concentración en el lumen se asumió que los procesos implicados siguen una cinética de primer orden. En este aspecto es importante evitar la interferencia del proceso de dilución (por restos del líquido de lavado) y de adsorción a la membrana intestinal, por lo que la concentración de la solución perfundida no se considera como dato experimental en el ajuste matemático. Respecto al proceso de reabsorción de agua, que se produce simultáneamente, se corrigieron los datos de concentración remanente en lumen a cada tiempo de muestreo.

A pesar de que la técnica es muy discriminativa entre los valores de distintas sustancias y condiciones, en este proyecto ha sido necesario

partir de una serie de asunciones previas para interpretar los resultados, dado que coexisten numerosos procesos simultáneamente (Figura 5.1).



**Figura 5.1.** Vías propuestas para la absorción a corto plazo de la genisteína ingerida y DHG (A) y la daidzeína y DHD (B). BCRP, proteína de resistencia al cáncer de mama; DHG, dihidrogenisteína; DHD, dihidrodaidzeína; MRP, proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos; P-gp, P-glicoproteína (tomado de Kobayashii, S. 2013)<sup>112</sup>.

Tal como se ha descrito en Metodología, los ensayos de absorción se realizaron perfundiendo una disolución obtenida a partir de Fisiogen® que contiene mayoritariamente glucósidos. El perfil de concentración de los mismos sigue una cinética de primer orden descendiente en todo momento. Dado que se postula que no son capaces de absorberse<sup>30,113</sup>, su desaparición del lumen se ha relacionado con el proceso de hidrólisis a agliconas. En nuestro modelo matemático se comprueba claramente ya que se estiman constantes de hidrólisis bastante elevadas ( $3.47 \text{ h}^{-1}$  y  $2.38 \text{ h}^{-1}$ , para daidzina y genistina, respectivamente).

La evolución de los niveles de agliconas en el tiempo puede ser resultado de cuatro procesos simultáneos: la aparición por hidrólisis de los glucósidos y por secreción a nivel del enterocito y su desaparición por absorción o metabolización debido a la microbiota (Figura 3.6). En los perfiles de concentraciones remanentes, la concentración al primer tiempo de muestreo (5 min) es siempre inferior al siguiente, lo que confirma la existencia de procesos contrapuestos. Los valores correspondientes, por sí solos, no permiten caracterizar el proceso de aparición dado el escaso número de puntos experimentales en esta fase. Sin embargo, el ajustado conjunto de la cinética correspondiente a la desaparición del glucósido ha permitido su valoración. He aquí la primera de las asunciones, ya que la aglicona podría incrementar su concentración en lumen también por efecto de los fenómenos de secreción.

Estudios previos realizados *in vitro* por otros autores<sup>112,114,115</sup> en líneas celulares (Caco-2) parecen demostrar que la daidzeína se absorbe



por difusión pasiva de acuerdo a su lipofilia y es, a su vez, sustrato de los transportadores de secreción glicoproteína P, BCRP y MRP. Por su parte, la genisteína presenta el mismo mecanismo de difusión pasiva pero también es sustrato de transportadores de secreción como BCRP y MRP.

No obstante, la constante de desaparición obtenida en el grupo control para las agliconas ( $6.34 \text{ h}^{-1}$  y  $9.88 \text{ h}^{-1}$ ) respectivamente podría garantizar una absorción casi completa si correspondiera únicamente a un proceso de absorción. Como se ha comentado, existen evidencias obtenidas en otros modelos que apuntan a un fenómeno importante de metabolismo luminal.

Respecto a la influencia de las cepas bacterianas ensayadas, el comportamiento es variable según la isoflavona que se considere y la propia cepa, lo cual impide establecer una pauta general, como se describe más adelante. Por otra parte, se ha evidenciado una gran variabilidad, lo que dificulta el establecimiento de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros estimados del modelo mediante ANOVA. Por ello, como pauta general se habla de tendencia a incrementar o disminuir.

Las diferencias que se comentan están sustentadas, no obstante, por el análisis estadístico propuesto como método 2, que no asume ningún modelo biofísico. De acuerdo a este análisis, para ambas isoflavonas, el modelo estadísticamente mejor es el más complejo, es decir, aquel en que las ordenadas y las pendientes son diferentes en cada grupo (tablas 4.9-4.12). Según estos resultados, todos los parámetros son diferentes frente al grupo control ya que los intervalos de confianza

del 95% tanto de las ordenadas en cada grupo como de sus respectivas pendientes no se solapan con el valor obtenido para el grupo control.

En concreto, respecto a daidzina/daidzeína, la hidrólisis del glucósido se ve disminuída en presencia de las cuatro cepas ensayadas (tabla 4.7, figuras 4.25 a 4.29). Este resultado contrasta con los datos obtenidos *in vitro* en el ensayo previo, lo cual demuestra una vez más, que este tipo de metodología experimental no puede sustituir la comprobación en el animal entero, ya que hay muchos factores fisiológicos que se obvian en el mismo.

Todas las cepas ensayadas incrementan la constante de desaparición de la daidzeína (tabla 4.7, figuras 4.25 a 4.29), si bien en diferente medida. *B. animalis subsp lactis* produce el mayor incremento respecto al grupo control. Este aumento generalizado de la constante de desaparición no se puede atribuir a un único fenómeno, sino que podría deberse a múltiples factores tales como aumento de la permeabilidad después de la exposición crónica a las cepas bacterianas, disminución del nivel de expresión de los transportadores de secreción o incremento del metabolismo de la aglicona en el lumen.

Para la genistina, el proceso de hidrólisis se ve favorecido en presencia de las cepas bacterianas seleccionadas (tabla 4.8, figuras de 4.30 a 4.34). Corresponde, por tanto, a los resultados obtenidos en las experiencias *in vitro* descritas. No obstante, como ya se ha apuntado, no existe un paralelismo directo entre este incremento *in vitro* e *in situ*.

En cuanto a la desaparición de genisteína tras el pretratamiento con las cepas, los resultados son diversos, tanto respecto a especies

como género (tabla 4.8). Incrementan la constante las cepas *L. plantarum* y, sobre todo, *B. animalis*. Por el contrario, *B. adolescentis* y *L. casei* disminuyen la velocidad de desaparición del lumen. Tal como se ha comentado para daidzeína, estos datos pueden deberse a influencias contrapuestas sobre los procesos que gobiernan la desaparición y aparición de la aglicona.

En resumen, estos estudios muestran que las cepas bacterianas pueden influir sobre la evolución de las isoflavonas en el intestino de la rata Wistar y que el resultado neto es difícil de predecir.

#### **5.4. Estudios *in vivo***

##### **5.4.1. Cinéticas plasmáticas: grupo control**

###### **5.4.1.1. Elección del modelo cinético**

Desde el punto de vista conceptual, únicamente la administración intravenosa es concluyente respecto al modelo cinético característico de una sustancia porque elude la influencia de fenómenos como la liberación y la absorción. De ahí que se realizaran experiencias por esta vía.

Se realizó la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) sobre las concentraciones plasmáticas individuales obtenidas para cada tiempo. Dicha prueba no mostró evidencia estadística de que las concentraciones sigan una distribución diferente de la normal. Del mismo modo, esta prueba realizada sobre los parámetros individuales obtenidos permite suponer una distribución normal y estimar la media aritmética y la desviación estándar de los mismos, como medida de la variabilidad interindividual.

Como se observa en la figura 4.39 y la tabla 4.13, que representa las concentraciones promedias de daidzeína frente al tiempo, el modelo monocompartimental explica adecuadamente su proceso de disposición. Es estadísticamente superior al modelo bicompartimental.

Sin embargo, los ajustados correspondientes al modelo bicompartimental parecen corresponder a los datos también de forma satisfactoria. Si se observa los datos experimentales de daidzeína, el último punto experimental no queda bien reproducido por el ajuste monocompartimental y es probable que de haber tenido puntos experimentales más extendidos, la daidzeína se hubiese caracterizado como bicompartimental.

En el caso de la genisteína es aún más evidente el carácter bicompartimental de la sustancia como se observa en la figura 4.40. Asimismo, los índices de bondad de ajuste favorecen al modelo bicompartimental (tabla 4.13).

La genisteína presenta idéntico comportamiento cinético (figura 4.40) atendiendo a los criterios de bondad de ajuste.

#### **5.4.1.2. Estimación de la biodisponibilidad oral en el grupo control**

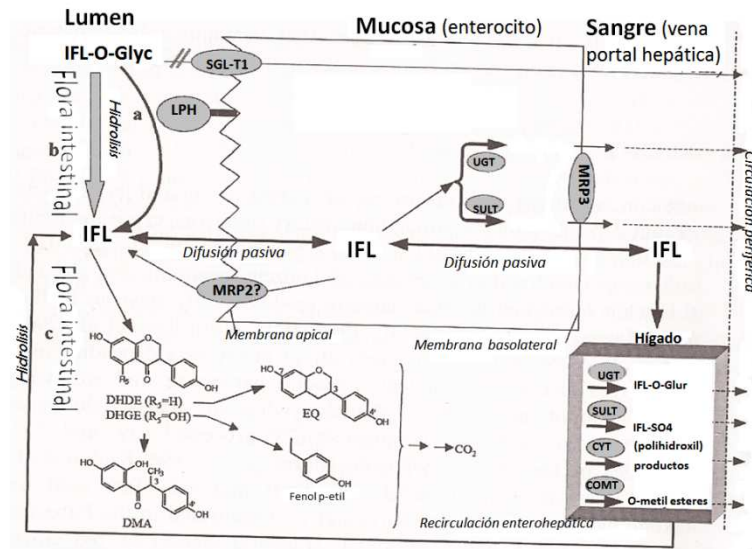
Numerosos grupos de investigación han intentado caracterizar la biodisponibilidad oral de los polifenoles, dentro de los cuales se destacan las isoflavonas. Se ha realizado diversos ensayos en los cuales se ha estudiado la vía de administración oral tanto en humanos<sup>49,116,117</sup> como en animales de experimentación<sup>118,119</sup>. En concreto, se han publicado resultados obtenidos en ratones Balb/c<sup>120</sup> y ratas Wistar<sup>121,122</sup>, en los que

se administran los glucósidos por vía oral a distintas dosis y se cuantifican las agliconas a nivel plasmático.

La determinación de la biodisponibilidad oral de estos compuestos no está exenta de dificultades, dado que los procesos de absorción y metabolismo de las isoflavonas son complejos (ver figura 5.3) y están sometidos, como se ha comentado, a una gran variabilidad interindividual. La absorción está mediada por diferentes transportadores, que actúan de manera directa e indirecta sobre los glucósidos de isoflavonas. Los glucósidos se hidrolizan por glucosidasas antes de su absorción. En el hígado, por la presencia del glucuronil y de las sulfotransferasas se forman los glucurónidos conjugados y sulfatos. Las isoflavonas conjugadas se excretan en el intestino donde son reabsorbidas tras su hidrólisis por la acción de la microflora intestinal. La presencia de recirculación enterohepática y el proceso de secreción al lumen complican el modelado matemático de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración oral.

Como se puede apreciar en los resultados presentados, las concentraciones plasmáticas presenta oscilaciones que sugieren fenómeno de recirculación enterohepática y fenómenos de secreción intestinal ya descritos en la bibliografía<sup>123-129</sup>.

Por todo ello, se ha procedido únicamente al estudio de los parámetros no compartimentales, con objeto de explorar las diferencias en ausencia y en presencia de las cepas bacterianas. En base a las concentraciones plasmáticas se calculó el  $AUC_{0-8}$  y el  $AUC_{8-\infty}$ . En todos los resultados individuales el  $AUC_{truncado}$  es mayor del 80% del  $AUC_{total}$ , por lo que se utilizó el  $AUC_{0-8 h}$ .



**Figura 5.3.** Absorción, transporte y metabolismo de los glucósidos de isoflavonas administrado. Ver texto para detalles. IFL-O-Glyc = isoflavona –O-Glucósido; IFL = aglicona de isoflavona; IFL-O-Glur = Isoflavona –O-Glucuronido; IFL-SO4 = Sulfato de Isoflavona; LPH = Lactato hidrolizado de piroldin; SDGLT1 = Transportador 1 de glucosa dependiente de sodio; COMT = Transferasa de Orto Metil Catecolamina; MRP2/3 = Proteína asociada a resistencia de multifarmacos 2/3; UGT = Glucuroniltransferasa de UDP; SULT= sulfotransferasas; DHDH = Dihydrodaidzeína; DHGE = Hidrogenisteína; DMA = O-Desmetilangolensina (Tomado de Franke, AA. 2009)<sup>125</sup>

En la tabla 4.15 de resultados se aprecian los datos obtenidos de biodisponibilidad para las isoflavonas en forma de aglicona (daidzeína y genisteína). Este valor es muy semejante para ambas y moderadamente bajo respecto al previsible en función de su constante de desaparición. Esto refleja el efecto de primer paso que sufren ambas sustancias,

compatible con su intenso metabolismo y sustenta la hipótesis que se plantea de que su desaparición no obedece solo al proceso de absorción.

#### **5.4.1.3. Influencia del pretratamiento con cepas bacterianas en la biodisponibilidad**

La influencia del pretratamiento no sigue una pauta general. Este resultado es compatible con los datos recogidos en la bibliografía, pues numerosos autores han demostrado que los efectos dependen del género e incluso la especie bacteriana considerada y la isoflavona de referencia.

En el caso de daidzeína (tabla 4.16) existen diferencias entre  $AUC_{0-8}$  (ng/mL\*h) de control y las obtenidas tras administrar los *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* ensayados. En todos los casos, los resultados indican que disminuye la biodisponibilidad. El fenómeno no puede explicarse en base a la influencia de las cepas sobre la desaparición ya que el pretratamiento conduce a un incremento de la desaparición de aglicona. En este caso, pues, únicamente cabe considerar la influencia de las cepas administradas sobre el efecto de primer paso intestinal.

En este aspecto también existen numerosos estudios que demuestran la influencia de la microbiota sobre el metabolismo. En general, sin embargo, aluden a un efecto producido en el lumen que en nuestro estudio se ha eludido en las experiencias *in situ* gracias al diseño experimental.

Como se ha descrito detalladamente, antes de llevar a cabo el procedimiento en el animal, se sustituye el contenido del lumen intestinal por suero salino tamponado en el proceso de lavado. Obviamente, en el

caso de los estudios de biodisponibilidad este factor ya entra en juego y probablemente contrarresta el efecto sobre la permeabilidad en el propio enterocito.

El análisis de la biodisponibilidad en velocidad, por otra parte, no aporta datos especialmente destacables ya que los parámetros de referencia ( $C_{max}$  y  $t_{max}$ ) están muy influenciados por el esquema de toma de muestra y ello repercute en una gran variabilidad. Incluso así, los resultados corroboran las hipótesis avanzadas para la biodisponibilidad en magnitud.

Es importante recordar, no obstante, que numerosos metabolitos, no cuantificados en nuestro estudio, presentan actividad, en uno u otro sentido, como ya se ha considerado ampliamente en el capítulo de Introducción.

Si se considera detenidamente el efecto producido sobre la genisteína (tabla 4.17), todas las cepas generan un efecto similar sobre la misma excepto *B. adolescentis* y *L. plantarum*, que aumentan la biodisponibilidad oral.

En este trabajo se ha relacionado la biodisponibilidad oral con la capacidad hidrolítica de las cepas pero hay otros muchos factores que se podrían considerar para explicar los resultados experimentales. En la tabla 5.1 se muestra algunas propiedades individuales podrían tener incidencia finalmente en la biodisponibilidad, como la tolerancia al ácido gástrico o la capacidad de adherencia de las cepas.



Cepa	Tolerancia a la exposición con HCl	Adherencia al lumen intestinal
<i>B. animalis</i>	Buena <sup>130</sup>	Buena <sup>131</sup>
<i>B. adolescentis</i>	Pobre <sup>132</sup>	Pobre <sup>132</sup>
<i>L. casei</i>	Buena <sup>102</sup>	Buena <sup>102</sup>
<i>L. plantarum</i>	Buena <sup>133</sup>	Buena <sup>44</sup>

**Tabla 5.1.** Cuadro comparativo de las propiedades individuales de las cepas bacterianas empleadas.

Por todo ello, podemos concluir que la ingesta de cepas bacterianas con fines terapéuticos o beneficiosos para la salud debe ir debidamente contrastada con los ensayos científicos ya que los beneficios potenciales que se les atribuyen no se pueden asegurar hasta que se comprueban con los ensayos pertinentes.

En nuestro caso, solo *B. adolescentis* y *L. plantarum*, de entre las cepas bacterianas seleccionadas por su elevada capacidad hidrolítica, fueron capaces de producir un aumento de la biodisponibilidad de la genisteína contenida en el Fisiogen®



## **6. CONCLUSIONES**



Al partir de los objetivos del proyecto se pueden definir las conclusiones en los siguientes términos:

- 1- La validación de los métodos analíticos demuestra la puesta a punto de los mismos y garantiza la correcta cuantificación de las isoflavonas de Fisiogen en muestras intestinales y plasma de rata.
- 2- Los estudios realizados en órgano aislado demuestran que la flora habitual del intestino es capaz de producir cierto grado de hidrólisis de la daidzina asociada a la aparición de daidzeína. En el caso de la genistina los resultados parecen indicar un proceso de carga de la mucosa.
- 3- Los estudios *in vitro* muestran que las cepas bacterianas seleccionadas favorecen la hidrólisis de los glucósidos y la mayor formación de agliconas.
- 4- La hidrólisis de los glucósidos determinada *in vitro* no siempre se observa en el ensayo *in situ* en rata Wistar.
- 5- En presencia de la mayoría de las cepas bacterianas, la constante de desaparición de las agliconas del lumen intestinal se incrementa respecto al control.
- 6- La desaparición de agliconas del lumen intestinal no produce un incremento de los niveles plásmaticos de las mismas, excepto en el caso de *B. adolescentis* y *L. plantarum* para genisteína. Esto sugiere que no se produce una mayor absorción de las agliconas sino que éstas se degradan en el lumen.

## 174 Conclusiones

- 7- La administración conjunta de isoflavonas con cepas bacterianas no es un método que se pueda utilizar de forma general para incrementar la biodisponibilidad oral de isoflavonas.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**





1. Bowling A. *Research methods in health: Investigating health and health services*. McGraw-Hill International; 2009.
2. Houghton JR, Rowe G, Frewer L, et al. The quality of food risk management in europe: Perspectives and priorities. *Food Policy*. 2008;33(1):13-26.
3. Van Kleef E, Frewer LJ, Chryssochoidis GM, et al. Perceptions of food risk management among key stakeholders: Results from a cross-european study. *Appetite*. 2006;47(1):46-63.
4. Kuh D, Shlomo YB. *A life course approach to chronic disease epidemiology*. Vol 2. Oxford University Press; 2004.
5. Willett W. *Nutritional epidemiology*. Vol 40. Oxford University Press; 2012.
6. de Sanidad LG. Ley 14/1986, de 25 de abril. *Boletín Oficial del Estado*. 1986;102:15207-15224.
7. Comisión europea. Directiva 2002/46/CE del parlamento europeo y del consejo, de 10 de junio de 2002, relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de complementos alimenticios. *Official Journal*. 2002;183:0051-0057.
8. BOE (2009). Real decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. BOE 244 de 9 de octubre de 2009. . :85.370-85.378.
9. Juárez M, Olano A, Morais F. *Alimentos funcionales*. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT); 2005.

10. Verbeke W. Consumer acceptance of functional foods: Socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food quality and preference*. 2005;16(1):45-57.
11. Siro I, Kapolna E, Kapolna B, Lugasi A. Functional food. product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite*. 2008;51(3):456-467.
12. Mitchell HL, Aggett PJ, Richardson DP, Stowell JD. Food & health forum meeting: Evidence-based nutrition. *Br J Nutr*. 2011;105(02):322-328.
13. Nash DT. Nutritional and exercise aspects of cognitive impairment. *Journal of Clinical Lipidology*. 2007;1(4):242-247.
14. Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) no. 109/2008 del parlamento europeo y del consejo de 15 de enero de 2008 por el que se modifica el reglamento (CE) no. 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea de*. 13-2-2008;L39:14-15.
15. Coppens P, Delmulle L, Gulati O, et al. Use of botanicals in food supplements. *Annals of nutrition and metabolism*. 2006;50(6):538-554.
16. Richardson DP. The scientific substantiation of health claims with particular reference to the grading of evidence. *Eur J Nutr*. 2005;44(5):319-324.
17. Marais J, Deavours B, Dixon R, Ferreira D, Grotewold E. The science of flavonoids. *Springer, New York, 2006*,"*The Stereochemistry of Flavonoids*. 2006:1-46.

18. Kim M, Han J, Kim SU. Isoflavone daidzein: Chemistry and bacterial metabolism. *J Appl Biol Chem*. 2008;51:253-261.
19. Zamora-Ros R, Knaze V, Luján-Barroso L, et al. Dietary intakes and food sources of phytoestrogens in the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) 24-hour dietary recall cohort. *Eur J Clin Nutr*. 2012;66(8):932-941.
20. Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, et al. Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a spanish adult population (EPIC-spain). *J Am Diet Assoc*. 2010;110(3):390-398.
21. Laggiou P, Samoli E, Laggiou A, et al. Flavonoid classes and risk of peripheral arterial occlusive disease: A case-control study in greece. *Eur J Clin Nutr*. 2005;60(2):214-219.
22. Rossi M, Garavello W, Talamini R, et al. Flavonoids and the risk of oral and pharyngeal cancer: A case-control study from italy. *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*. 2007;16(8):1621-1625.
23. Dilis V, Trichopoulou A. Antioxidant intakes and food sources in greek adults. *J Nutr*. 2010;140(7):1274-1279.
24. Mulligan A, Welch A, McTaggart A, Bhaniani A, Bingham S. Intakes and sources of soya foods and isoflavones in a UK population cohort study (EPIC-norfolk). *Eur J Clin Nutr*. 2006;61(2):248-254.
25. Hirose K, Imaeda N, Tokudome Y, et al. Soybean products and reduction of breast cancer risk: A case-control study in japan. *Br J Cancer*. 2005;93(1):15-22.

26. Iwasaki M, Hamada GS, Nishimoto IN, et al. Isoflavone, polymorphisms in estrogen receptor genes and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Science*. 2009;100(5):927-933.
27. Lee S, Wen W, Xiang Y, et al. Assessment of dietary isoflavone intake among middle-aged Chinese men. *J Nutr*. 2007;137(4):1011-1016.
28. Frankenfeld CL, Lampe JW, Shannon J, et al. Frequency of soy food consumption and serum isoflavone concentrations among Chinese women in Shanghai. *Public Health Nutrition-Cab International*. 2004;7(6):765-772.
29. Cotterchio M, Boucher BA, Kreiger N, Mills CA, Thompson LU. Dietary phytoestrogen intake—lignans and isoflavones—and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes & Control*. 2008;19(3):259-272.
30. Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr*. 2007;137(5):1244-1252.
31. Bandera EV, Williams MG, Sima C, et al. Phytoestrogen consumption and endometrial cancer risk: A population-based case-control study in New Jersey. *Cancer Causes & Control*. 2009;20(7):1117-1127.
32. Hedelin M, Klint Å, Chang ET, et al. Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: The Cancer Prostate Sweden Study (Sweden). *Cancer Causes & Control*. 2006;17(2):169-180.
33. Ward HA, Kuhnle GG, Mulligan AA, Lentjes MA, Luben RN, Khaw K. Breast, colorectal, and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition—Norfolk in relation to phytoestrogen

intake derived from an improved database. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(2):440-448.

34. Colacurci N, Chiantera A, Fornaro F, et al. Effects of soy isoflavones on endothelial function in healthy postmenopausal women. *Menopause.* 2005;12(3):299-307.

35. Ho SC, Chan AS, Ho YP, et al. Effects of soy isoflavone supplementation on cognitive function in chinese postmenopausal women: A double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause.* 2007;14(3 Pt 1):489-499.

36. Petri Nahas E, Nahás Neto J, De Luca L, Traiman P, Pontes A, Dalben I. Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas.* 2004;48(4):372-380.

37. Lukaczer D, Darland G, Tripp M, et al. Clinical effects of a proprietary combination isoflavone nutritional supplement in menopausal women: A pilot trial. *Alternative Therapies in Health & Medicine.* 2005;11(5).

38. Nahas EA, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Carvalho EP, Oliveira ML, Dias R. Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Maturitas.* 2007;58(3):249-258.

39. Howes LG, Howes JB, Knight DC. Isoflavone therapy for menopausal flushes: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas.* 2006;55(3):203-211.

40. Clair RS, Anthony M. Soy, isoflavones and atherosclerosis. In: *Atherosclerosis: Diet and drugs.* Springer; 2005:301-323.

41. Clarke D, Lloyd A. Dietary exposure estimates of isoflavones from the 1998 UK total diet study. *Food Addit Contam.* 2004;21(4):305-316.
42. Peñalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chem.* 2004;87(2):297-305.
43. Nielsen ILF, Williamson G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutr Cancer.* 2007;57(1):1-10.
44. Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol.* 2005;183(1):45-55.
45. Wiseman H, Andersen ØM, Markham K. Isoflavonoids and human health. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications.* 2006:371-396.
46. Heald C, Ritchie M, Bolton-Smith C, Morton M, Alexander F. Phytoestrogens and risk of prostate cancer in scottish men. *Br J Nutr.* 2007;98(2):388-396.
47. Silberberg M, Morand C, Mathevon T, et al. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr.* 2006;45(2):88-96.
48. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *J Nutr.* 2007;137(3):751S-755S.
49. Cassidy A. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans. *J AOAC Int.* 2006;89(4):1182-1188.

50. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):230S-242S.
51. Nielsen ILF, Williamson G. Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans. *Nutr Cancer.* 2007;57(1):1-10.
52. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Fernández EG, Fernández CR, Pérez MS. *Brock biología de los microorganismos.* Vol 10. SciELO Espana; 2004.
53. Cebra J, Jiang H, Boiko N, Tlaskalova-Hogenova H. The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system. *Mucosal Immunology.* 2005:335-368.
54. Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity.* 2008;28(6):740-750.
55. Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari K, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable Products—A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(6):641-658.
56. Nieswandt B, Moser M, Pleines I, et al. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 2007;204(13):3113-3118.
57. Brandtzaeg P, Johansen F. Mucosal B cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* 2005;206(1):32-63.

58. Borsutzky S, Cazac BB, Roes J, Guzmán CA. TGF- $\beta$  receptor signaling is critical for mucosal IgA responses. *The Journal of Immunology*. 2004;173(5):3305-3309.
59. Cunningham-Rundles S, Ahrné S, Johann-Liang R, et al. Effect of probiotic bacteria on microbial host defense, growth, and immune function in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Nutrients*. 2011;3(12):1042-1070.
60. Brandtzaeg P, Carlsen HS, Halstensen TS. The B-cell system in inflammatory bowel disease. In: *Immune mechanisms in inflammatory bowel disease*. Springer; 2006:149-167.
61. Weirich A, Hoffmann GF. Ernst moro (1874–1951)—A great pediatric career started at the rise of university-based pediatric research but was curtailed in the shadows of nazi laws. *Eur J Pediatr*. 2005;164(10):599-606.
62. Rambaud J. *Flore microbienne intestinale: Physiologie et pathologie digestives*. John Libbey Eurotext; 2004.
63. Flamm H. Der österreichische pädiater theodor escherich als bakteriologe und sozialhygieniker: Zur 100. wiederkehr seines todestages am 15. feber 1911. *Wien Klin Wochenschr*. 2011;123(5-6):157-171.
64. Metchnikoff I. *The prolongation of life: Optimistic studies* (reprinted edition 1907). . 2004.
65. Kollath W. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1953;8(11):Suppl 7-16.
66. Vergin F. Antibiotics and probiotics. *Hippokrates*. 1954;25(4):116-119.



67. Kolb H. Die behandlung acuter infekte unter dem gesichtswinkel der prophylaxe chronischer leiden. über die behandlung mit physiologischen bakterien. *Microecology and Therapy*. 1955;1:15-19.
68. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965;147(3659):747-748.
69. Sperti GS. *Probiotics*. AVI Publishing Company; 1971.
70. Fujii A, Cook ES. Probiotics. antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of. omega.-amino-and. omega.-guanidinoalkanesulfonic acids. *J Med Chem*. 1975;18(5):502-505.
71. Parker R. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*. 1974;29(2).
72. Fuller R. History and development of probiotics. In: *Probiotics*. Springer; 1992:1-8.
73. Havenaar R, Huis JH. Probiotics: A general view. In: *The lactic acid bacteria volume 1*. Springer; 1992:151-170.
74. Salminen S. Uniqueness of probiotic strains. *Newsletters of the International Dairy Federation*. 1996:18-18.
75. Schaafsma G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *Newsletters of the International Dairy Federation*. 1996:23-23.
76. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee Y. Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci Technol*. 1999;10(3):107-110.
77. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2):361s-364s.

78. Araya M, Morelli L, Reid G, et al. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada.* 2002.
79. Vasiljevic T, Shah N. Probiotics—from metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* 2008;18(7):714-728.
80. Candela M, Seibold G, Vitali B, Lachenmaier S, Eikmanns BJ, Brigidi P. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens. *Res Microbiol.* 2005;156(8):887-895.
81. Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Probióticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española.* 2003;61(9):476-482.
82. Gordon D, Macrae J, Wheeler DM. A lactobacillus preparation for use with antibiotics. *Lancet.* 1957;272(6975):899-901.
83. Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel M, Doucet-Populaire F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(1):38-44.
84. Del Piano M, Morelli L, Strozzi G, et al. Probiotics: From research to consumer. *Digestive and Liver Disease.* 2006;38:S248-S255.
85. Salminen M, Rautelin H, Tynkkynen S, et al. Lactobacillus bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clinical Infectious Diseases.* 2006;42(5):e35.

86. Leonard HP. Nutracéuticos: Componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 2006;40(3):20-28.
87. Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ. *Prescott, harley, and klein microbiología*. McGraw-Hill; 2009.
88. Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion*. 2006;73 Suppl 1:5-12.
89. Sanz Y, Sánchez E, Marzotto M, Calabuig M, Torriani S, Dellaglio F. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;51(3):562-568.
90. Grönlund M, Gueimonde M, Laitinen K, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 2007;37(12):1764-1772.
91. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *J Nutr*. 2004;134(2):465-472.
92. Collado MC, Isolauri E, Salminen S, Sanz Y. The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab*. 2009;10(1):68-78.
93. Medina C, Santana A, Llopis M, et al. Induction of colonic transmural inflammation by bacteroides fragilis. implication of matrix metalloproteinases. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(2):99-105.

94. Turróni F, van Sinderen D, Ventura M. Bifidobacteria: From ecology to genomics. *Front Biosci.* 2009;14:4673-4684.
95. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JC, McMurdo ME, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing bifidobacterium bifidum, bifidobacterium lactis, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clinical infectious diseases.* 2005;40(1):28-37.
96. Foligne B, Nutten S, Grangette C, et al. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology.* 2007;13(2):236.
97. Turróni F, Foroni E, Pizzetti P, et al. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(6):1534-1545.
98. Wall R, Hussey SG, Ryan CA, et al. Presence of two lactobacillus and bifidobacterium probiotic strains in the neonatal ileum. *The ISME journal.* 2007;2(1):83-91.
99. Gueimonde M, Delgado S, Mayo B, Ruas-Madiedo P, Margolles A, de los Reyes-Gavilán, Clara G. Viability and diversity of probiotic lactobacillus and bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. *Food Res Int.* 2004;37(9):839-850.
100. Masco L, Huys G, De Brandt E, Temmerman R, Swings J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int J Food Microbiol.* 2005;102(2):221-230.

101. Dellaglio F, Felis GE, Torriani S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Llesell 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(1):285-287.
102. Mishra V, Prasad D. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol.* 2005;103(1):109-115.
103. du Toit M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S. *Lactobacillus*: The next generation of malolactic fermentation starter cultures—an overview. *Food and Bioprocess Technology.* 2011;4(6):876-906.
104. Van Den Broek, Lambertus AM, Voragen AG. *Bifidobacterium* glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2008;9(4):401-407.
105. Llanea P, González C, Fernández-Iñarrea J, Alonso A, Díaz F, Pérez-López F. Soy isoflavones improve insulin sensitivity without changing serum leptin among postmenopausal women. *Climacteric.* 2012;15(6):611-620.
106. Doluisio JT, Tan GH, Billups NF, Diamond L. Drug absorption II: Effect of fasting on intestinal drug absorption. *J Pharm Sci.* 1969;58(10):1200-1202.
107. Parasuraman S, Raveendran R. Measurement of invasive blood pressure in rats. *J Pharmacol Pharmacother.* 2012;3(2):172-177.
108. Razali NM, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics.* 2011;2(1):21-33.

109. Bernal J, Mendiola J, Ibáñez E, Cifuentes A. Advanced analysis of nutraceuticals. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(4):758-774.
110. Gasparetto J, Smolarek F, de Francisco T, Miranda L, Pontarolo R, Siqueira P. Development and validation of an HPLC–DAD method for analysis of the six major isoflavones in extracts from soybean processing. *J Am Oil Chem Soc.* 2012;89(7):1211-1222.
111. Wu Q, Wang M, Simon JE. Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds. *Journal of Chromatography B.* 2004;812(1):325-355.
112. Kobayashi S, Shinohara M, Nagai T, Konishi Y. Transport mechanisms of soy isoflavones and their microbial metabolites dihydrogenistein and dihydrodaidzein across monolayers and membranes. *Pharmaceut Anal Acta.* 2013;4(4):2-7. doi: 10.4172/2153-2435.1000227.
113. Xiao J, Cao H, Wang Y, Zhao J, Wei X. Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. *J Agric Food Chem.* 2009;57(15):6642-6648.
114. Chen J, Lin H, Hu M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal caco-2 model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(2):159-169.
115. Steensma A, Noteborn HP, Kuiper HA. Comparison of caco-2, IEC-18 and HCEC cell lines as a model for intestinal absorption of genistein, daidzein and their glycosides. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2004;16(3):131-139.

116. Xiao CW. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *J Nutr.* 2008;138(6):1244S-9S.
117. Jäger AK, Saaby L. Flavonoids and the CNS. *Molecules.* 2011;16(2):1471-1485.
118. Qiu F, Song B, Zhong D. Influence of dosage forms on pharmacokinetics of daidzein and its main metabolite daidzein-7-O-glucuronide in rats<sup>1</sup>. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(9):1145-1152.
119. Steensma A, Faassen-Peters MA, Noteborn HP, Rietjens IM. Bioavailability of genistein and its glycoside genistin as measured in the portal vein of freely moving unanesthetized rats. *J Agric Food Chem.* 2006;54(21):8006-8012.
120. Andrade JE, Twaddle NC, Helferich WG, Doerge DR. Absolute bioavailability of isoflavones from soy protein isolate-containing food in female BALB/c mice. *J Agric Food Chem.* 2010;58(7):4529-4536.
121. Hertrampf T, Ledwig C, Kulling S, et al. Responses of estrogen sensitive tissues in female wistar rats to pre-and postnatal isoflavone exposure. *Toxicol Lett.* 2009;191(2):181-188.
122. Yang Z, Kulkarni K, Zhu W, Hu M. Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: Mechanistic studies on its ADME. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents).* 2012;12(10):1264-1280.
123. Davies NM, Takemoto JK, Brocks DR, Yáñez JA. Multiple peaking phenomena in pharmacokinetic disposition. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(6):351-377.

124. Gao Y, Shao J, Jiang Z, et al. Drug enterohepatic circulation and disposition: Constituents of systems pharmacokinetics. *Drug Discov Today*. 2013.
125. AA Franke, BM Halm, K Kakazu, X Li. Metabolism, Bioavailability, and Analysis of Dietary Isoflavones. In: *Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology*. Vol 1. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009:215.
126. TDM, Therapeutic Drug Monitoring Center. Plasma levels of genistein following a single dose of soy extract capsule in indian women. *Indian J Med Res*. 2007;125:534-541.
127. Zhou S, Hu Y, Zhang B, et al. Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. *J Agric Food Chem*. 2008;56(18):8354-8359.
128. Yang Z, Zhu W, Gao S, Yin T, Jiang W, Hu M. Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites: Reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein. *Drug Metab Disposition*. 2012;40(10):1883-1893.
129. Zhu W, Xu H, Wang SWJ, Hu M. Breast cancer resistance protein (BCRP) and sulfotransferases contribute significantly to the disposition of genistein in mouse intestine. *The AAPS journal*. 2010:1-12.
130. Russell D, Ross R, Fitzgerald G, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol*. 2011;149(1):88-105.



131. Barrangou R, Briczinski EP, Traeger LL, et al. Comparison of the complete genome sequences of bifidobacterium animalis subsp. lactis DSM 10140 and bl-04. *J Bacteriol.* 2009;191(13):4144-4151.
132. Canzi E, Guglielmetti S, Mora D, Tamagnini I, Parini C. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005;88(3-4):207-219.
133. de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos WM. < l> lactobacillus plantarum— survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J.* 2006;16(9):1018-1028.
134. Otieno DO, Ashton JF, Shah NP. Role of microbial strain and storage temperatures in the degradation of isoflavone phytoestrogens in fermented soymilk with selected  $\beta$ -glucosidase producing< i> lactobacillus casei strains. *Food Res Int.* 2007;40(3):371-380.
135. Sestelo A, Poza M, Villa T. B-glucosidase activity in a lactobacillus plantarum wine strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2004;20(6):633-637.
136. Branca F, Lorenzetti S. Health effects of phytoestrogens. 2005.



## **8. GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y TÉRMINOS**



**ABREVIATURAS:**

- **A-ER:** Receptores de estrógenos (ER) alfa
- **β-ER:** Receptores de estrógenos (ER) beta
- **AUC:** Área bajo la curva
- ***B. adolescentis:*** *Bifidobacterium adolescentis*
- ***B. animalis subsp. lactis:*** *Bifidobacterium animalis subsp. lactis.*
- **Bolus:** Administración vía intravenosa
- **BCRP:** Breastcancer resistance protein
- **CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de calcio
- **Cl:** Depuración
- **C<sub>max</sub>:** Concentración máxima
- **C<sub>o</sub>:** Concentración inicial de fármaco
- **C.s.p.:** Cantidad suficiente para
- **CV:** Coeficiente de Variación
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **EDTA:** Etylen diamine tetraacetil acid. Ácido etilendiaminotetraacético
- **EFSA:** European Food Safety Authory
- **ER:** Error Relativo
- **F:** Biodisponibilidad
- **g:** Gramo
- **HPLC:** Cromatografo líquido de alta eficiencia
- ***In situ:*** Técnica de perfusión
- **k<sub>app</sub>:** Constante de absorción aparente
- **k<sub>des</sub>:** Constante de desaparición
- **k<sub>h</sub>:** Constante de hidrólisis
- **Kg:** Kilogramo

- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**: Fosfato potásico dibásico anhidro
- ***L. casei***: *L. casei*
- **LDC**: Límite de cuantificación
- **LDD**: Límite de detección
- **LLC**: Líquido de lavado corto
- **LLL**: Líquido de lavado largo
- ***L. plantarum***: *L. plantarum*
- **M**: Molar
- **MDR**: Multidrug resistance
- **MRP**: Multidrug resistance protein
- **MRS**: Man Rogosa Sharpe medium
- **Min**: Minuto
- **mL**: Mililitro
- **mM**: Milimolar
- **mTorr**: Militorr. Medida de Presión
- **nm**: nanómetro
- **NaCl**: Cloruro de sodio
- **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O**: Fosfato de sodio dibásico dihidratado
- **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**: Fosfato de sodio monobásico
- **PTFE**: Politetrafluoretileno
- **p/v**: peso/volumen
- **r**: Coeficiente de correlación
- **r<sup>2</sup>**: Coeficiente de correlación al cuadrado
- **r.p.m.**: Revoluciones por minuto
- **SM**: Solución madre patrón
- **Stopcock**: Tipo de válvula
- **Subsp.**: Subespecie

- **t:** Tiempo
- **t<sub>max</sub>:** Tiempo máximo.
- **t<sub>1/2</sub>:** Vida media o semivida.
- **μL:** microlitro.
- **Vd:** Volumen de distribución.
- **x:** Variable independiente.
- **y:** Variable dependiente.

### TÉRMINOS:

Según la IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) (2006), los **alimentos funcionales o enriquecidos** son aquellos que aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un efecto positivo en la salud tanto en el mantenimiento del estado de salud como en la reducción del riesgo de padecer una enfermedad<sup>86</sup>.

Según Sloan, E. (1996), los **nutracéuticos** son sustancias químicas o biológicas activas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos. Se presenta en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), y que administrada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presume un efecto favorable sobre la salud, mayor al que posee el alimento normal. Por ende, los productos nutracéuticos tienen la capacidad de fortalecer las condiciones saludables, sirviendo como auxiliar en el cuidado y mantenimiento de la salud, así como en la prevención de enfermedades y en la mejora de las funciones fisiológicas

del organismo<sup>86</sup>. Los nutracéuticos se diferencian de los medicamentos en que éstos últimos no tienen un origen biológico natural, difieren de los extractos e infusiones de hierbas y similares en la concentración de sus componentes y no tienen por qué tener una acción terapéutica<sup>86</sup>. En esencia, los nutracéuticos son micronutrientes que mejoran productos ya existentes y que permiten diversificar el mercado, ya que abarcan una amplia gama de productos<sup>86</sup>.

Según Vallejo, A. (2006), los **complementos alimenticios** o **suplementos dietéticos** son aquellos a los que se le adiciona algún componente beneficioso para la salud: leche con adición de calcio o ácidos omega-3, margarinas enriquecidas con componentes vegetales anticolesterol, entre otro. Es válido aclarar que muchos complementos alimenticios pueden ser considerados nutracéuticos, siempre y cuando las sustancias que aporten sean de origen natural<sup>86</sup>.

Según Branza y Lorenzetti (2005), los **fitoestrógenos** son naturales fitoquímicos derivados de las plantas, cuyo común biológico papeles es proteger las plantas del estrés o actuar como parte del mecanismo de defensa de la planta. Estos han demostrado que se unen a los receptores de estrógeno en forma agonista/antagonista débil, en animales y seres humanos. Los fitoestrógenos incluyen principalmente isoflavonas, cumestanos y lignanos<sup>136</sup>.

Según Neff y Holman (1997), los **nutrientes** son elementos o componentes esenciales para el crecimiento de animales o plantas, es decir azúcares o grasas<sup>86</sup>.



Según Fuller (1992), los **probióticos** son complemento alimenticio microbiano vivo, que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal<sup>79</sup>



## **9. ANEXOS**



## 1. Materiales y métodos

### 1.1. Reactivos utilizados

- **Acetonitrilo.** J.T.Baker. Ref. 9012
- **Acetato de amonio.** Scharlau. Ref. AM02550250
- **Acetato de sodio.** Scharlau. Ref. SO00351000
- **Ácido ascórbico.** Scharlau. Ref. AC05150250
- **Ácido acético glacial.** Panreac. Ref. 131008
- **Ácido bórico.** Scharlau. Ref. AC05780500
- **Ácido clorhídrico.** Scharlau. Ref. AC07411000
- **Ácido orto-fosfórico.** Scharlau. Ref. AC1098
- **Ácido trifluoroacético.** Scharlau. Ref. AC31410100
- **Ácido sulfúrico.** Panreac. Ref. 141058.1612.
- **Cartuchos Sep-Pak, VacRC 500 mg.** Waters. Ref. WAT036945
- **Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).** Guinama. Ref. QC-00127074
- **Cloruro de sodio (NaCl).** Scharlau. Ref. SO0227
- **Dimetil Sulfóxido (DMSO).** Sigma Aldrich. Ref. D4540
- **EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).** Scharlau. Ref. AC09650250
- **Formononetina.** Sigma Aldrich. Ref. 47752
- **Fosfato de sodio dibásico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).** Scharlau. Ref. 31471/3038
- **Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).** Scharlau. Ref. 73861
- **Fosfato potásico dibásico anhidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).** Scharlau. Ref. PO02601000
- **Glucoronidasa+sulfatasa.** Sigma Aldrich. Ref.G7017
- **Hidróxido de sodio.** Merck. Ref.1.06498.5000

- **Heparina sódica.** Hospira Productos Farmacéuticos y hospitalarios S.L. Ref. 671945.9
- **Isoflorano.** Esteve. Uso Veterinario. C.N. 571329.8
- **2-propanol.** J.T.Baker. Ref. 8175
- **Ketamina (Imagelne®).** Merial. Ref. 03661103001888
- **Medetomidina (Domtor®).** Esteve Veterinaria. Ref. GTIN 06432100017529.
- **Metanol.** J.T.Baker. Ref. 8402
- **Man Rogosa Sharpe Medium (MRS).** Sharlau Chemie S.A
- **Povidona yodada (Desinpor®).** AGB. Ref. 01-114
- **Propilenglicol (1,2-propanodiol).** Sigma Aldrich. Ref. 13436-8
- **Suero salino Vitalia®.** Laboratorios ERN S.A. Ref. 005/440254/1103
- **Tubos de silicona Silclear™.** Degagra Silicone. Ref. 2110060149
- **Trietilamina.** Scharlau. Ref. TR02151000

## 1.2. Estudios *in situ*

### 1.2.1. Soluciones de trabajo

#### 1.2.1.1. Solución anestésica

La solución anestésica que se empleó es una mezcla de ketamina (50 mg/mL, Imagelne®) y medetomidina (1 mg/mL, Domtor®), cuya dosis utilizada en la rata es de 75.0 mg/kg y 0.5 mg/kg respectivamente. La ketamina se almacena en refrigerador entre 4 y 8°C y la medetomidina a temperatura ambiental. Antes de ser inyectada se atempera a 37°C y se

administra por vía intraperitoneal. Para lograr la anestesia profunda de la mezcla se requiere 30 min antes de la realización del procedimiento quirúrgico.

### 1.2.1.2. Solución de lavado intestinal

#### 1.2.1.2.1. Solución de LLL

La solución de lavado intestinal es el vehículo isotónico que permite eliminar los restos que pudieran quedar en la luz intestinal, cuya composición cuantitativa es la siguiente:

NaCl	9.00 g
KCL	0.34 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.19 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.76 g
H <sub>2</sub> O destilada	c.s.p.1000 mL

#### 1.2.1.2.2. Solución de LLC

Es una solución que consiste en suero fisiológico regulado con solución tampón fosfato a pH 7.00, a razón de 10 mL de tampón por litro de solución (según Sørensen). La composición cuantitativa consiste en:

NaCl	9.00 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O. 1/15M	3.90 mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1/15M	6.10 mL
H <sub>2</sub> O destilada	c.s.p.1000 mL

### **1.2.1.3. Solución de perfusión**

En un matraz aforado de 250 mL se adiciona el polvo triturado de Fisiogen®, para ser disuelto con 2.5 mL DMSO (Sigma-Aldrich) y luego se enrasa a 250 mL con LLC. El experimento se realiza con 2 comprimidos de fármaco. Para finalizar se filtra la suspensión por medio de vacío un filtro de tamaño de poro de 0.45 µm. En todo momento se comprueba el pH de la solución como variable físico-química de control. Las soluciones se atemperan en un baño a 37°C durante 10 min antes de la administración.

### **1.2.2. Condiciones de cultivo**

El medio de cultivo utilizado para las cuatro cepas fue el Man Rogosa Sharpe (MRS) de Laboratorios Scharlau Chemie S.A. El medio MRS contiene peptona de caseína 10.00 (g/L), extracto de carne 8.00(g/L), extracto de levadura 4.00 (g/L), D(+)-glucosa 20.00 (g/L), fosfato de potasio dibásico 2.00 (g/L), Tween®80 1.00 (g/L), citrato de amonio dibásico 2.00 (g/L), acetato de sodio 5.00 (g/L), sulfato de magnesio 0.20 (g/L) y sulfato de manganeso 0.04(g/L).

## **1.3. Estudios *in vivo***

### **1.3.1. Solución de suero fisiológico heparinizado**

Se prepara por adición de 2 mL de heparina sódica al 5% a un 1 Litro de solución estéril de NaCl al 0.9% (suero salino). La mezcla obtenida contiene 20 U.I/mL de heparina sódica, que se utiliza para mantener la cánula en las condiciones adecuadas para su funcionamiento. También se utiliza para reponer fluidos después de cada extracción y mantener la volemia del animal.



### **1.3.2. Solución a administrar**

Se pulverizan cuatro comprimidos de Fisiogen® Al polvo se adiciona 3 mL de 1,2-propanodiol (Sigma®) y 7 mL suero salino (solución estéril de NaCl al 0.9%). La suspensión producida se homogeniza y filtra a 0.22 µm a vacío. El volumen administrado del filtrado por vía oral fue 2.0 mL y por vía intravenosa (bolus) 0.5 mL. La dosis administrada fue de 2 comprimidos.

### **1.3.3. Material de canulación**

Se utiliza un tubo de silicona (Silclear™ tubing®, Medical Grade Silicone Tubing, de 0.025"x0.047") para la preparación del catéter que luego será introducido en la vena del animal. Del tubo de silicona se secciona un trozo de unos 20 cm de longitud, haciendo uno de sus extremos en forma de bisel para facilitar la colocación en la vena yugular. Con hilo de seda se fija una distancia de 3.6 cm desde este extremo con la ayuda de un sellador de silicona (Orbasil®). El hilo servirá para mantener unido el catéter a la musculatura anexa a la vena de la rata. El catéter así preparado se mantiene en estufa a 40°C durante unas 4 h, para que se evapore el disolvente de la silicona y se endurezca.

### 1.3.4. Soluciones para la extracción de isoflavonas en muestras plasmáticas

Nombre de Reactivo	Concentración/pH
Acetato de Sodio	0.10 M/ pH 5
Ácido Ascórbico	0.10% p/v
EDTA	0.01% p/v
Glucoronidasa+sulfatasa	8 $\mu$ L

**Tabla 1.1.** Cantidades de la solución tamponada de hidrólisis

Nombre de Reactivo	Volumen/Concentración/pH
Agua destilada	120 $\mu$ L
Acetato de amonio	75 $\mu$ L / 1 mL / pH 7
Tampón trimetilamonio sulfato (1.5M): 41.00 mL ácido sulfúrico concentrado + 210.75 mL trietilamina ajustar a 500 mL con agua destilada. Ajustar pH a 7.00 con trietilamina.	83 $\mu$ L / 3 M/ pH 7

**Tabla 1.2.** Cantidades en  $\mu$ L de las soluciones para la disociación de las isoflavonas

## 2. Resultados

### 2.1. Capacidad hidrolítica y selección de cepas bacterianas

	Daidzina media	Genistina media	Daidzeína media	Genisteína media
FG	79.97±1.31	28.93±0.25	4.89±0.32	1.89±0.11
<i>L. plantarum</i> + FG	36.79±2.52	11.94±1.71	36.04±2.00	7.32±0.55
<i>L. plantarum</i>	0	0	0	0
FG	79.97±1.31	28.93±0.25	4.89±0.32	1.89±0.11
<i>L.reuteri</i> + FG	75.34±1.87	26.61±0.93	5.92±0.37	2.50±0.12
<i>L.reuteri</i>	0	0	0	0
FG	79.97±1.31	28.93±0.25	4.89±0.32	1.89±0.11
<i>L. casei</i> + FG	56.47±0.87	4.57±0.09	31.39±0.56	20.84±1.61
<i>L. casei</i>	0	0	0	0
FG	79.97±1.31	28.93±0.25	4.89±0.32	1.89±0.11
<i>E. faecium</i> + FG	78.73±8.84	32.09±5.87	5.95±0.76	5.72±0.66
<i>E. faecium</i>	0	0	0	0

**Tabla 2.1.** Resultados de la capacidad hidrolítica ( $\mu\text{g/ml}$ ) *in vitro* de algunos *Lactobacillus*.

	Daidzina media	Genistina media	Daidzeína media	Genisteína media
FG	137.61±5.40	52.78±2.18	8.17±0.41	8.07±0.49
<i>B. adolescentis</i> + FG	0	1.00±0.34	81.90±9.36	22.25±2.86
<i>B. adolescentis</i>	0	0.79±0.01	1.19±0.13	2.29±0.25
FG	137.61±5.40	52.78±2.18	8.17±0.41	8.07±0.49
<i>B. animalis</i> + FG	97.14±5.19	9.44±0.24	31.94±2.48	33.58±1.59
<i>B. animalis</i>	0	0.62±0.08	0.50±0.07	1.90±0.20
FG	137.61±5.40	52.78±2.18	8.17±0.41	8.07±0.49
<i>B. animalis lactis</i> + FG	64.58±4.81	1.62±0.40	55.02±0.65	16.62±0.47
<i>B. animalis lactis</i>	0	0	1.27±0.08	1.50±1.30
FG	137.61±5.40	52.78±2.18	8.17±0.41	8.07±0.49
<i>B. bifidum</i> + FG	117.09±3.96	48.51±2.12	6.71±0.48	6.24±0.24
<i>B. bifidum</i>	0	0	0	0
FG	137.61±5.40	52.78±2.18	8.17±0.41	8.07±0.49
<i>B. catenulatum</i> + FG	45.23±2.38	1,81±0.14	61.36±3.84	25.89±0.68
<i>B. catenulatum</i>	0	0	1.23±0.01	2.10±0.25
FG	137.61±5.40	52.78±2.18	8.17±0.41	8.07±0.49
<i>B. longum</i> + FG	97.90±5.89	26.27±2.09	14.10±0.31	12.62±0.67
<i>B. longum</i>	0	0	0.305±0.01	0.96±0.15

**Tabla 2.2.** Resultados de la capacidad hidrolítica ( $\mu\text{g/ml}$ ) *in vitro* de algunos *bifidobacterium*

## 2.2. Estudios de absorción *in situ*.

### 2.2.1. Validación de la metodología analítica. Estudios *in situ*.

Concentración de daidzina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de daidzina
122.87	118.99	115.67	116.36	120.89	117.98 $\pm$ 2.41
61.44	59.26	57.01	56.62	56.56	57.36 $\pm$ 1.28
30.72	29.26	29.20	29.94	29.34	29.43 $\pm$ 0.34
15.36	14.76	14.58	14.46	14.58	14.59 $\pm$ 0.12
3.84	3.74	3.63	3.63	3.71	3.68 $\pm$ 0.06
$r^2$	> 0.999				
CV (%)	$\leq$ 2.23%				
ER (%)	$\leq$ 7.51%				
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	2.78				
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	5.59				

**Tabla 2.3.** Parámetros de validación del método analítico en el rango de interés para la evolución de los componentes de Fisiogen en órgano aislado.

Concentración de genistina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de genistina
33.80	49.37	48.08	46.89	48.61	48.24 $\pm$ 1.04
16.90	26.35	24.27	26.16	24.27	25.26 $\pm$ 1.15
8.45	11.38	12.00	11.42	11.53	11.58 $\pm$ 0.28
4.23	5.70	5.45	5.46	5.48	5.52 $\pm$ 0.12
1.06	1.45	1.49	1.46	1.46	1.46 $\pm$ 0.02
$r^2$	> 0.999				
CV (%)	$\leq$ 4.55%				
ER (%)	$\leq$ 9.06%				
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	1.67				
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	5.06				

**Tabla 2.4.** Parámetros de validación del método analítico en el rango de interés para la evolución de los componentes de Fisiogen en órgano aislado.

Concentración de daidzina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de daidzina
65.08	62.18	62.45	62.49	62.84	62.49 $\pm$ 0.27
16.27	15.41	15.64	15.67	15.50	15.55 $\pm$ 0.12
4.07	3.74	3.78	3.73	3.80	3.76 $\pm$ 0.03
1.02	0.94	0.95	0.93	0.92	0.93 $\pm$ 0.01
0.25	0.12	0.14	0.14	0.14	0.13 $\pm$ 0.01
$r^2$	> 0.999				
CV (%)	$\leq$ 6.43%				
ER (%)	$\leq$ 9.07%				
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.15				
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.25				

**Tabla 2.5.** Parámetros de validación del método analítico en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*.

Concentración de genistina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de genistina
6.28	8.96	9.04	8.93	8.91	8.96 $\pm$ 0.05
1.57	2.19	2.28	2.28	2.22	2.24 $\pm$ 0.04
0.78	1.10	1.14	1.10	1.10	1.11 $\pm$ 0.02
0.20	0.25	0.26	0.25	0.25	0.25 $\pm$ 0.01
0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06 $\pm$ 0.00
$r^2$	> 0.999				
CV (%)	$\leq$ 2.48%				
ER (%)	$\leq$ 10.14%				
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.03				
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.09				

**Tabla 2.6.** Parámetros de validación del método analítico en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*



Concentración de daidzeína (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de daidzeína
90.53	166.59	162.16	125.13	127.05	145.23±22.19
45.26	80.32	80.25	63.03	63.34	71.74±9.87
22.63	39.70	39.62	36.16	36.15	37.91±2.02
11.32	18.20	17.34	17.40	17.19	17.53±0.45
5.66	9.01	9.05	9.35	9.13	9.14±0.15
$r^2$	> 0.9997				
CV (%)	≤ 15.3%				
ER (%)	≤ 4.18%				
LOD (µg/mL)	2.28				
LOQ (µg/mL)	4.67				

**Tabla 2.7.** Parámetros de validación del método analítico en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*.

Concentración de genisteína (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de genisteína
64.25	120.38	119.11	108.23	107.92	113.91±6.76
32.13	60.04	59.65	53.52	52.74	56.49±3.90
16.06	28.10	28.32	26.69	26.24	27.34±1.03
8.03	14.59	14.67	13.30	13.24	13.95±0.79
4.02	7.12	7.06	6.78	6.89	6.96±0.16
$r^2$	> 0.9999				
CV (%)	≤ 6.90%				
ER (%)	≤ 5.49				
LOD (µg/mL)	0.89				
LOQ (µg/mL)	2.70				

**Tabla 2.8.** Parámetros de validación del método analítico en el rango de interés para la técnica de absorción *in situ*.

## 2.2.2. Validación de la metodología analítica. Estudio *in vivo*

### A. Vía de administración intravenosa

Concentración de daidzeína (ng/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de daidzeína
4650.46	7.19	7.21	7.76	7.68	7.46±0.30
1162.61	1.57	1.58	1.80	1.80	1.69±0.13
581.31	0.81	0.81	0.90	0.89	0.85±0.05
290.65	0.26	0.26	0.26	0.25	0.26±0.00
$r^2$	> 0.999				
CV (%)	≤ 7.65%				
ER (%)	≤ 16.27%				
LOD (µg/mL)	141.94				
LOQ (µg/mL)	297.50				

**Tabla 2.9.** Parámetros validación de la metodología analítica aplicada en la cuantificación de las isoflavonas tras su administración por vía intravenosa.

Concentración de genisteína (ng/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de genisteína
2584.90	4.49	4.48	4.62	4.73	4.58±0.12
1292.45	2.22	2.22	2.53	2.60	2.39±0.20
323.11	0.69	0.67	0.68	0.69	0.68±0.01
161.56	0.33	0.31	0.32	0.34	0.32±0.01
40.39	0.12	0.12	0.13	0.13	0.13±0.00
$r^2$	0.999				
CV (%)	≤ 8.40%				
ER (%)	≤ 18.55				
LOD (µg/mL)	87.04				
LOQ (µg/mL)	160.06				

**Tabla 2.10.** Parámetros validación de la metodología analítica aplicada en la cuantificación de las isoflavonas tras su administración por vía intravenosa

**B. Vía de administración oral**

Concentración de daidzeína (ng/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de daidzeína
1116.18	1.77	1.77	1.81	1.81	1.79±0.02
558.09	0.77	0.78	0.88	0.89	0.83±0.06
279.05	0.42	0.42	0.41	0.40	0.41±0.01
139.52	0.20	0.20	0.19	0.20	0.20±0.00
69.76	0.06	0.07	0.07	0.07	0.06±0.00
r <sup>2</sup>	> 0.999				
CV (%)	≤ 7.61%				
ER (%)	≤ 8.04%				
LOD (µg/mL)	47.05				
LOQ (µg/mL)	96.53				

**Tabla 2.11.** Parámetros de la validación de la metodología analítica para muestras plasmáticas de las isoflavonas en estudio

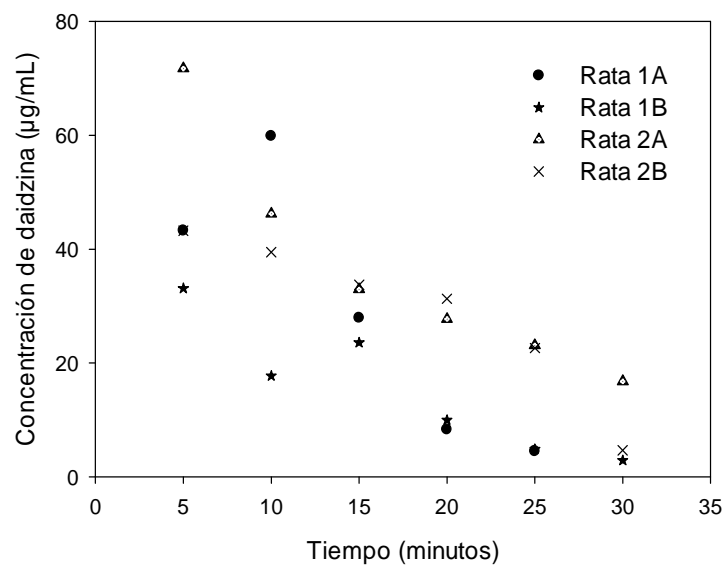
Concentración de genisteína (ng/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área media de genisteína
763.26	1.39	1.36	1.34	1.32	1.35±0.03
381.63	0.63	0.62	0.61	0.63	0.62±0.01
190.81	0.28	0.30	0.31	0.30	0.30±0.01
47.70	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03±0.00
r <sup>2</sup>	0.999				
CV (%)	≤ 4.33%				
ER (%)	≤ 6.44%				
LOD (µg/mL)	26.10				
LOQ (µg/mL)	64.47				

**Tabla 2.12.** Parámetros de la validación de la metodología analítica para muestras plasmáticas de las isoflavonas en estudio.

### 2.2.3. Evolución de los componentes de Fisiogen® en órgano aislado.

Tiempo (min)	Concentraciones de daidzina en Fisiogen® (µg/mL)				
	Rata 1A	Rata 1B	Rata 2A	Rata 2B	Media±DE
5	43.25	33.09	71.70	43.24	47.82±16.63
10	59.85	17.72	46.21	39.46	40.81±17.57
15	27.89	23.57	32.92	33.73	29.53±4.74
20	8.33	9.96	27.71	31.27	19.32±11.85
25	4.51	4.84	26.21	22.61	13.76±10.49
30	-	2.87	16.77	4.65	8.10±7.57
Páram.	Rata				
<b>Ec. orden 0</b>	C= 67.46 - 2.58*t	C=35.68 - 1.16*t	C=71.32 - 2.00*t	C=53.76 - 1.41*t	C=55.55- 1.66*t
<b>Ec. orden 1</b>	lnC= 4.91 - 0.13*t	lnC= 4.11 - 0.10*t	lnC= 4.43 - 0.05*t	lnC= 4.47 - 0.07*t	lnC= 4.36 - 0.07*t

**Tabla 2.13.** Resultados de la evolución de daidzina del Fisiogen® en órgano aislado. Ec.= Ecuación

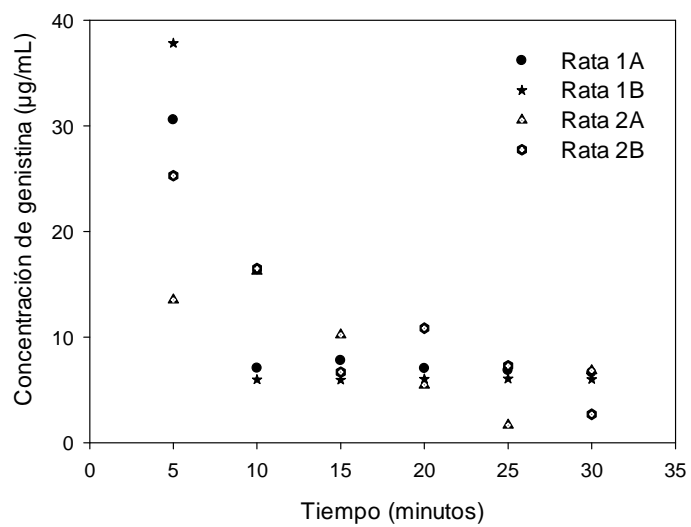


**Figura 2.1.** Evolución de daidzina del Fisiogen® en órgano aislado.



Tiempo (min)	Concentraciones de genistina en Fisiogen® (µg/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
5	30.56	37.82	13.53	25.28	26.80±10.23
10	7.05	5.97	16.25	16.49	11.44±5.71
15	7.78	5.95	10.20	6.67	7.65±1.86
20	7.02	6.02	5.47	10.83	7.34±2.42
25	6.85	6.06	1.67	7.28	5.46±2.58
30	6.63	6.00	6.82	2.69	5.54±1.93
Páram.	Rata				
<b>Ec. orden 0</b>	C= 23.09 - 0.69*t	C=27.18 - 0.91*t	C=17.19 - 0.47*t	C=25.19 - 0.78*t	C=23.16- 0.71*t
<b>Ec. orden 1</b>	lnC= 0.45 - 0.02*t	lnC= 0.59 - 0.03*t	lnC= 0.61 - 0.03*t	lnC= 0.35 - 0.02*t	lnC= 3.21 - 0.06*t

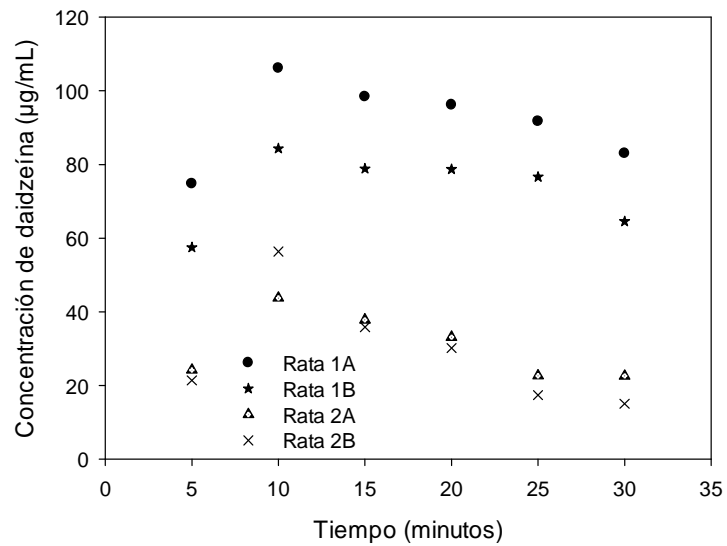
**Tabla 2.14.** Resultados de la evolución de genistina del Fisiogen® en órgano aislado. Ec.= Ecuación



**Figura 2.2.** Evolución de genistina del Fisiogen® en órgano aislado.

Tiempo (min)	Concentraciones de daidzeína en Fisiogen® (µg/mL)				
	Rata 1A	Rata 1B	Rata 2A	Rata 2B	Media±DE
5	74.81	57.48	24.19	21.40	44.47±26.03
10	106.15	84.37	43.73	56.40	72.66±28.05
15	98.42	78.87	37.82	35.90	62.75±30.95
20	96.21	78.72	33.13	30.15	59.55±33.03
25	91.74	76.64	22.63	17.38	52.10±37.63
30	83.03	64.57	22.62	15.06	46.32±32.76

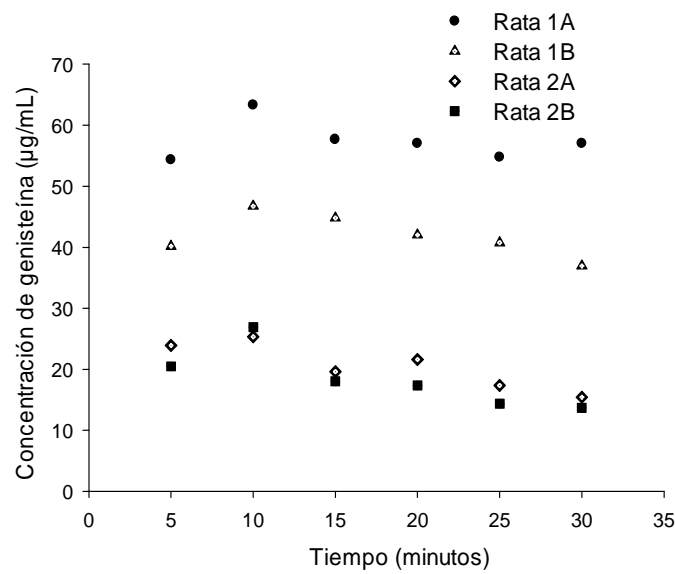
**Tabla 2.15.** Resultados de la evolución de daidzeína del Fisiogen® en órgano aislado.



**Figura 2.3.** Evolución de daidzeína del Fisiogen® en órgano aislado.

Tiempo (min)	Concentraciones de genisteína en Fisiogen® (µg/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
5	54.30	40.17	23.90	20.48	34.71±15.63
10	63.29	46.75	25.33	26.92	40.57±18.01
15	57.67	44.81	19.63	18.04	35.04±19.44
20	57.01	42.03	21.60	17.34	34.49±18.48
25	54.75	40.74	17.37	14.39	31.81±19.31
30	57.01	36.96	15.44	13.69	30.77±20.44

**Tabla 2.16.** Resultados de la evolución de genisteína del Fisiogen® en órgano aislado.

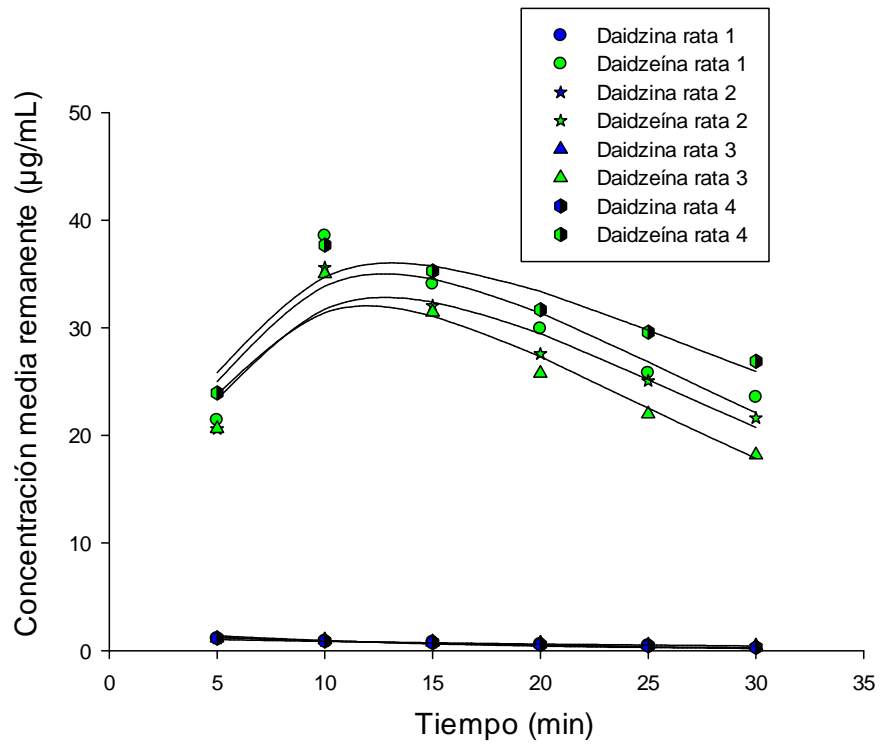


**Figura 2.4.** Evolución de genisteína del Fisiogen® en órgano aislado

2.2.4. Determinación de  $k_{des}$  y  $k_h$  por la técnica de doluisio.

Tiempo (min)	Daidzina en Fisiogen® ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	1.14	1.13	1.16	1.17	1.15 $\pm$ 0.02
10	0.91	0.88	1.02	0.89	0.92 $\pm$ 0.06
15	0.80	0.76	0.83	0.73	0.78 $\pm$ 0.04
20	0.62	0.63	0.71	0.55	0.63 $\pm$ 0.06
25	0.49	0.47	0.54	0.44	0.48 $\pm$ 0.04
30	-	0.37	0.45	0.30	0.37 $\pm$ 0.07
Tiempo (min)	Daidzeína en Fisiogen® ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	21.42	20.60	20.63	23.96	21.65 $\pm$ 1.58
10	38.56	35.59	35.02	37.69	36.72 $\pm$ 1.68
15	34.08	32.05	31.48	35.30	33.23 $\pm$ 1.64
20	29.92	27.59	25.79	31.69	28.75 $\pm$ 3.02
25	25.81	25.08	21.99	29.62	25.62 $\pm$ 3.14
30	23.57	21.61	18.20	26.90	22.57 $\pm$ 3.64
Páram.	Rata				
V(mL)	5.40	6.30	5.80	5.30	5.70 $\pm$ 0.45
$k_{des}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	5.94	5.75	5.32	8.24	6.34 $\pm$ 1.36
$k_h$ ( $\text{h}^{-1}$ )	3.93	3.63	4.68	2.03	3.47 $\pm$ 1.09

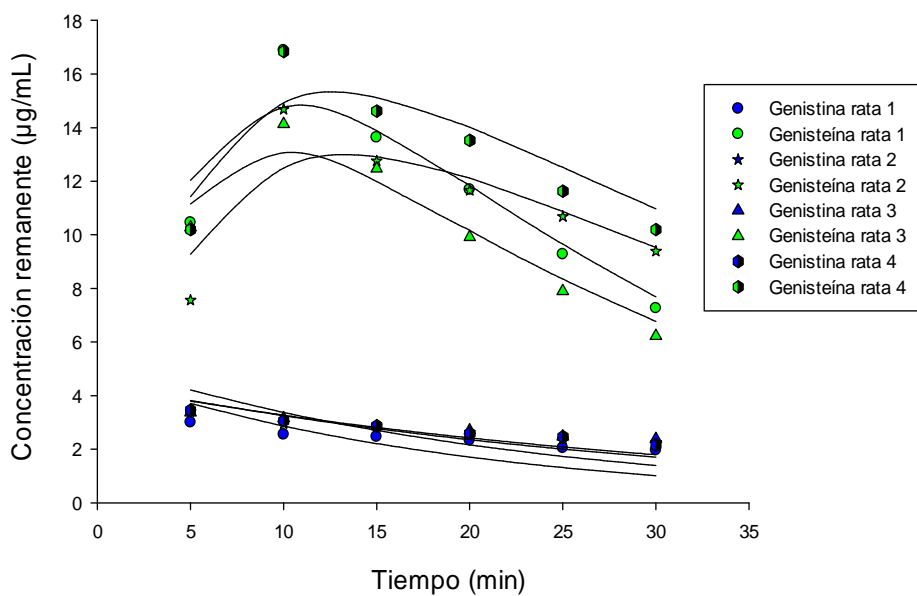
**Tabla 2.17.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes y parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de daidzina/daidzeína *in situ*.



**Figura 2.5.** Cinética individual de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino en ausencia de pretratamiento (grupo control).

Tiempo (min)	Genistina en Fisiogen® (µg/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
5	3.00	3.40	3.37	3.45	3.31±0.21
10	2.55	2.96	3.15	3.06	2.93±0.27
15	2.47	2.86	2.86	2.87	2.76±0.20
20	2.33	2.62	2.70	2.59	2.56±0.16
25	2.04	2.37	2.48	2.46	2.34±0.20
30	1.97	2.25	2.38	2.15	2.19±0.17
Tiempo (min)	Genisteína en Fisiogen® (µg/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
5	10.46	7.56	10.28	10.19	9.62±1.38
10	16.88	14.69	14.14	16.84	15.63±1.43
15	13.63	12.75	12.47	14.62	13.37±0.97
20	11.69	11.66	9.92	13.53	11.70±1.47
25	9.28	10.69	7.90	11.63	9.87±1.64
30	7.26	9.39	6.22	10.20	8.27±1.84
Páram.	Rata				
V(mL)	5.40	6.30	5.80	5.30	5.70±0.45
k <sub>des</sub> (h <sup>-1</sup> )	9.45	8.43	11.93	9.71	9.88±1.47
k <sub>h</sub> (h <sup>-1</sup> )	3.11	1.93	2.66	1.80	2.38±0.62

**Tabla 2.18.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes y parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de genistina/genisteína *in situ*.

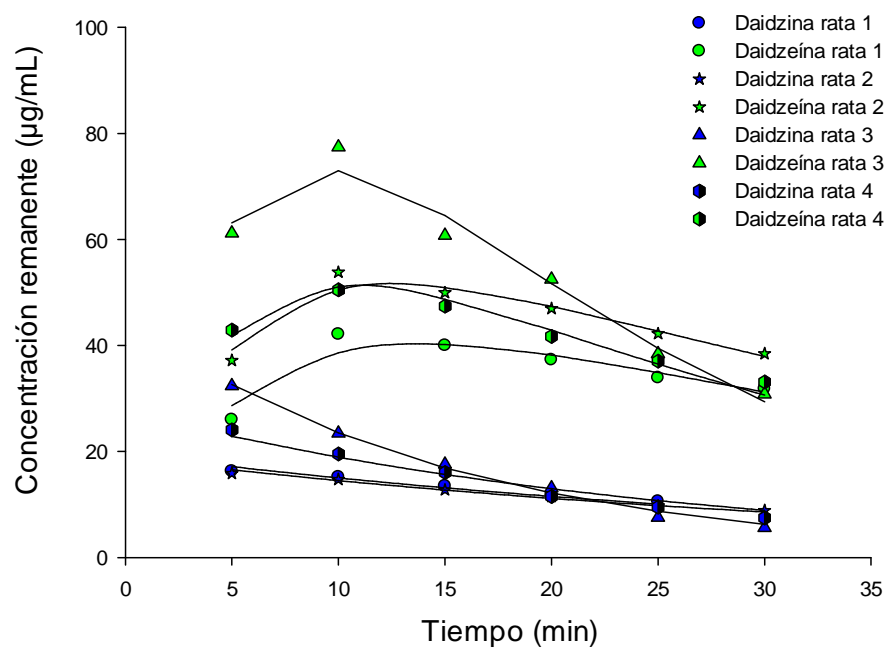


**Figura 2.6.** Cinética individual de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino en ausencia de pretratamiento (grupo control).



Tiempo (min)	Daidzina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. adolescentis</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	16.30	15.88	32.38	24.08	22.16 $\pm$ 7.79
10	15.21	14.72	23.46	19.56	18.24 $\pm$ 4.11
15	13.48	12.76	17.60	16.04	14.97 $\pm$ 2.25
20	11.74	11.52	13.14	11.54	11.99 $\pm$ 0.78
25	10.59	9.74	7.56	9.49	9.34 $\pm$ 1.28
30	-	8.88	5.64	7.50	7.34 $\pm$ 1.62
Tiempo (min)	Daidzeína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. adolescentis</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	25.98	37.16	61.21	42.89	41.81 $\pm$ 14.72
10	42.12	53.83	77.45	50.51	55.98 $\pm$ 15.14
15	39.98	49.96	60.78	47.43	49.54 $\pm$ 8.61
20	37.30	46.98	52.48	41.69	44.61 $\pm$ 6.57
25	33.87	42.22	38.39	37.04	37.88 $\pm$ 3.46
30	31.78	38.43	30.84	33.12	33.54 $\pm$ 3.39
Páram.	Rata				
V(mL)	6.00	6.50	6.50	7.50	6.63 $\pm$ 0.63
$k_{\text{des}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	9.02	10.62	9.94	11.19	10.20 $\pm$ 0.93
$k_{\text{h}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	1.59	1.57	3.95	2.27	2.34 $\pm$ 1.12

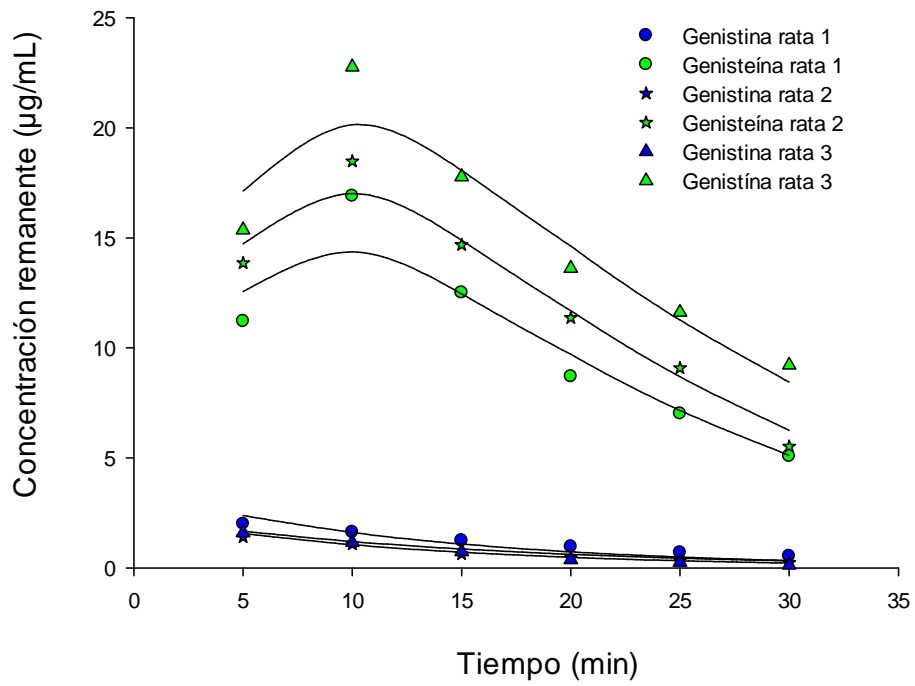
**Tabla 2.19.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *B. adolescentis*, y parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de daidzina/daidzeína *in situ*.



**Figura 2.7.** Cinética individual de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *B. adolescentis*.

Tiempo (min)	Genistina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. adolescentis</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	2.00	1.40	1.59	1.66 $\pm$ 0.31
10	1.62	1.07	1.16	1.29 $\pm$ 0.30
15	1.24	0.63	0.74	0.87 $\pm$ 0.33
20	0.97	0.45	0.38	0.60 $\pm$ 0.32
25	0.70	0.33	0.26	0.43 $\pm$ 0.23
30	0.54	0.24	0.14	0.31 $\pm$ 0.21
Tiempo (min)	Genisteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. adolescentis</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	11.22	13.86	15.36	13.48 $\pm$ 1.87
10	16.90	18.48	22.77	19.38 $\pm$ 1.11
15	12.51	14.68	17.78	14.99 $\pm$ 1.54
20	8.70	11.37	13.62	11.23 $\pm$ 1.89
25	7.01	9.09	11.62	9.24 $\pm$ 1.47
30	5.09	5.52	9.22	6.61 $\pm$ 0.31
Páram.	Rata			
V(mL)	6.00	6.50	7.50	6.67 $\pm$ 0.76
$k_{\text{des}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	9.11	8.85	9.40	9.12 $\pm$ 0.18
$k_{\text{h}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	4.71	4.68	3.95	4.45 $\pm$ 0.43

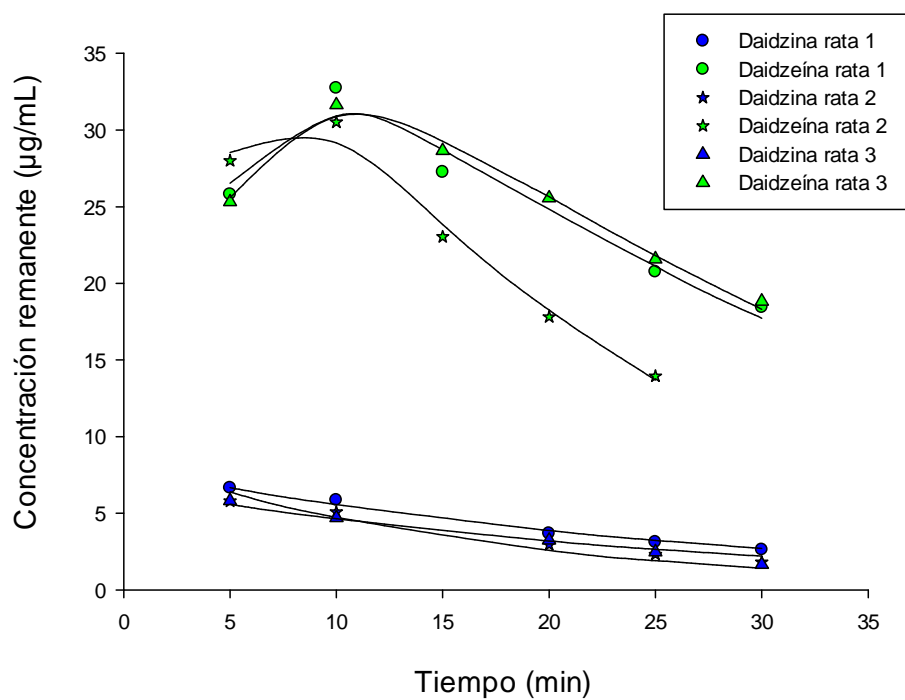
**Tabla 2.20.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *B. adolescentis*, y parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de genistina/genisteína *in situ*.



**Figura 2.8.** Cinética individual de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *B. adolescentis*.

Tiempo (min)	Daidzina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. animalis subsp lactis</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	6.65	5.79	6.22	6.22 $\pm$ 0.43
10	5.86	5.09	4.70	5.22 $\pm$ 0.59
15	-	-	-	-
20	3.68	2.95	3.24	3.29 $\pm$ 0.37
25	3.11	2.32	2.48	2.64 $\pm$ 0.42
30	2.64	1.81	1.66	2.04 $\pm$ 0.53
Tiempo (min)	Daidzeína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. animalis subsp lactis</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	25.81	27.99	25.31	26.37 $\pm$ 1.42
10	32.73	30.51	31.64	31.63 $\pm$ 1.11
15	27.25	23.04	28.65	26.31 $\pm$ 2.92
20	-	17.82	25.57	21.70 $\pm$ 5.48
25	20.76	13.94	21.59	18.76 $\pm$ 4.20
30	18.43	-	18.83	18.63 $\pm$ 0.28
Páram.	Rata			
V(mL)	5.00	6.50	5.50	5.67 $\pm$ 0.76
$k_{\text{des}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	13.30	15.18	11.74	13.41 $\pm$ 1.72
$k_{\text{h}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	2.16	3.62	2.23	2.67 $\pm$ 0.82

**Tabla 2.21.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *B. animalis subsp lactis*, y parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de daidzina/daidzeína *in situ*.



**Figura 2.9.** Cinética individual de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *B. animalis subsp lactis*

Tiempo (min)	Genistina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. animalis subsp lactis</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	0.71	0.32	0.22	0.72	0.49 $\pm$ 0.26
10	0.54	0.21	0.17	0.58	0.37 $\pm$ 0.21
15	0.39	-	0.12	0.43	0.31 $\pm$ 0.17
20	0.31	0.07	0.09	0.32	0.20 $\pm$ 0.13
25	0.24	0.05	-	0.24	0.17 $\pm$ 0.11
30	0.16	0.02	0.06	-	0.08 $\pm$ 0.07

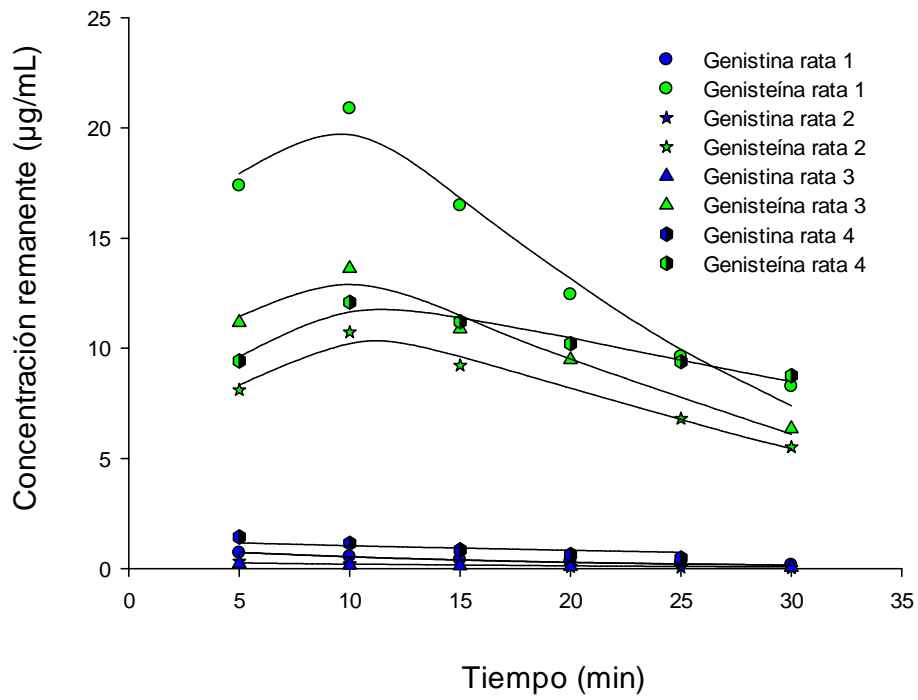
  

Tiempo (min)	Genisteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>B. animalis subsp lactis</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	17.37	8.11	11.17	9.43	11.52 $\pm$ 4.10
10	20.88	10.72	13.63	12.10	14.33 $\pm$ 4.53
15	16.48	9.22	10.88	11.21	11.95 $\pm$ 3.14
20	12.44	-	9.48	10.21	10.71 $\pm$ 1.54
25	9.61	6.80	-	9.39	8.60 $\pm$ 1.56
30	8.26	5.52	6.35	8.76	7.22 $\pm$ 1.54

Páram.	Rata				
V(mL)	5.00	6.50	5.50	6.50	5.58 $\pm$ 0.75
$k_{des}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	11.99	9.81	13.02	13.75	12.14 $\pm$ 1.71
$k_h$ ( $\text{h}^{-1}$ )	3.77	2.94	2.84	1.35	2.72 $\pm$ 1.01

**Tabla 2.22.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *B. animalis subsp lactis*, parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de genistina/genisteína *in situ*.

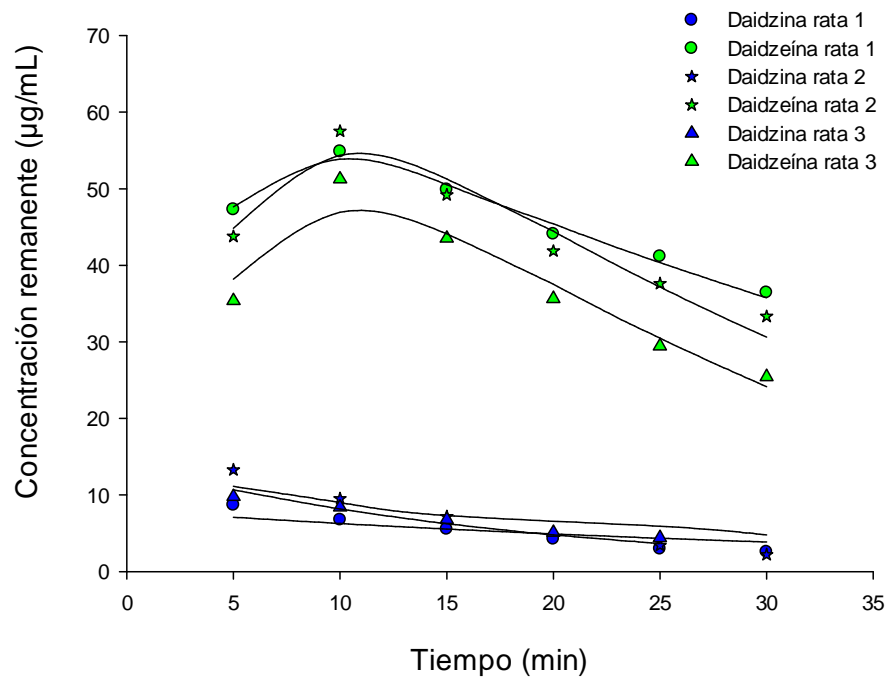


**Figura 2.10.** Cinética individual de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *B. animalis subsp lactis*



Tiempo (min)	Daidzina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. casei</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	8.68	13.25	9.78	7.93 $\pm$ 5.63
10	6.75	9.51	8.38	6.16 $\pm$ 4.26
15	5.50	7.15	6.79	4.86 $\pm$ 3.32
20	4.25	-	5.09	3.11 $\pm$ 2.73
25	2.95	3.39	4.40	2.69 $\pm$ 1.89
30	2.56	2.17	9.78	1.58 $\pm$ 1.38
Tiempo (min)	Daidzeína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. casei</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	47.30	43.78	35.38	42.15 $\pm$ 6.12
10	54.84	57.51	51.26	54.54 $\pm$ 3.14
15	49.88	49.18	43.52	47.53 $\pm$ 3.49
20	44.09	41.85	35.65	42.97 $\pm$ 1.58
25	41.15	37.60	29.45	36.07 $\pm$ 6.00
30	36.43	33.32	25.44	30.94 $\pm$ 7.77
Páram.	Rata			
V(mL)	6.00	6.50	5.00	5.83 $\pm$ 0.76
$k_{des}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	16.81	10.95	9.23	12.33 $\pm$ 3.97
$k_h$ ( $\text{h}^{-1}$ )	1.47	2.53	3.22	2.40 $\pm$ 0.88

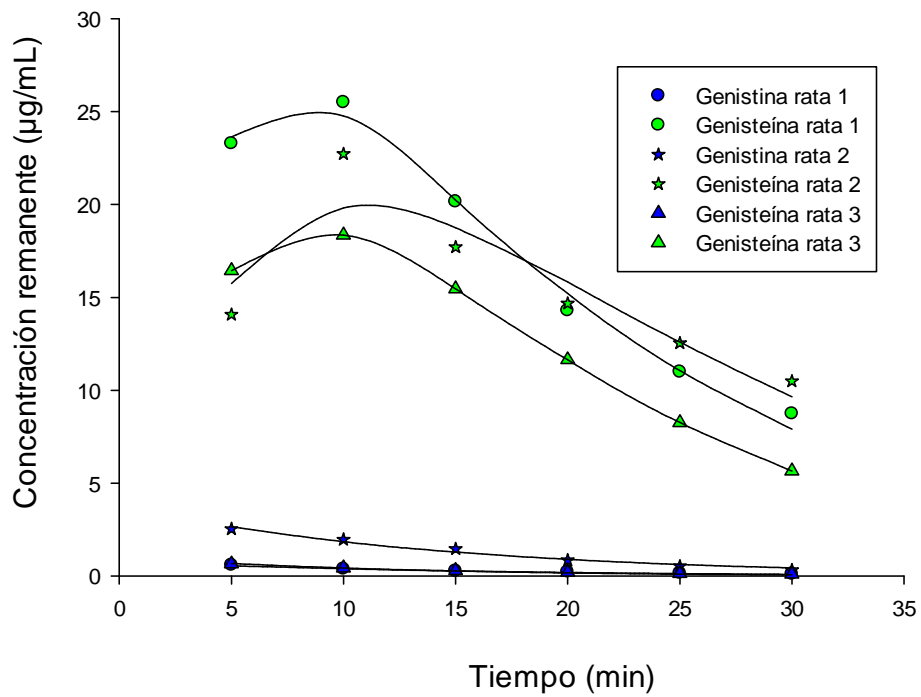
**Tabla 2.23.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *L. casei*, parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de daidzina/daidzeína *in situ*.



**Figura 2.11.** Cinética individual de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *L. casei*.

Tiempo (min)	Genistina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. casei</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	0.59	2.53	0.66	1.26 $\pm$ 1.10
10	0.39	1.97	0.45	0.93 $\pm$ 0.89
15	0.28	1.46	0.31	0.68 $\pm$ 0.67
20	0.23	0.85	0.21	0.43 $\pm$ 0.37
25	0.16	0.53	0.14	0.28 $\pm$ 0.22
30	0.12	0.33	0.11	0.19 $\pm$ 0.12
Tiempo (min)	Genisteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. casei</i>			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media $\pm$ DE
5	23.29	14.07	15.86	17.74 $\pm$ 4.89
10	25.51	22.73	19.75	22.66 $\pm$ 2.88
15	20.16	17.71	14.30	16.00 $\pm$ 2.94
20	14.30	14.68	11.88	14.49 $\pm$ 1.52
25	10.99	12.53	8.05	12.53 $\pm$ 2.28
30	8.74	10.49	5.94	7.34 $\pm$ 2.30
Páram.	Rata			
V(mL)	6.00	6.50	5.00	5.83 $\pm$ 0.76
$k_{\text{des}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	12.86	6.96	8.72	9.51 $\pm$ 3.03
$k_{\text{h}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	4.19	4.33	5.49	4.67 $\pm$ 0.72

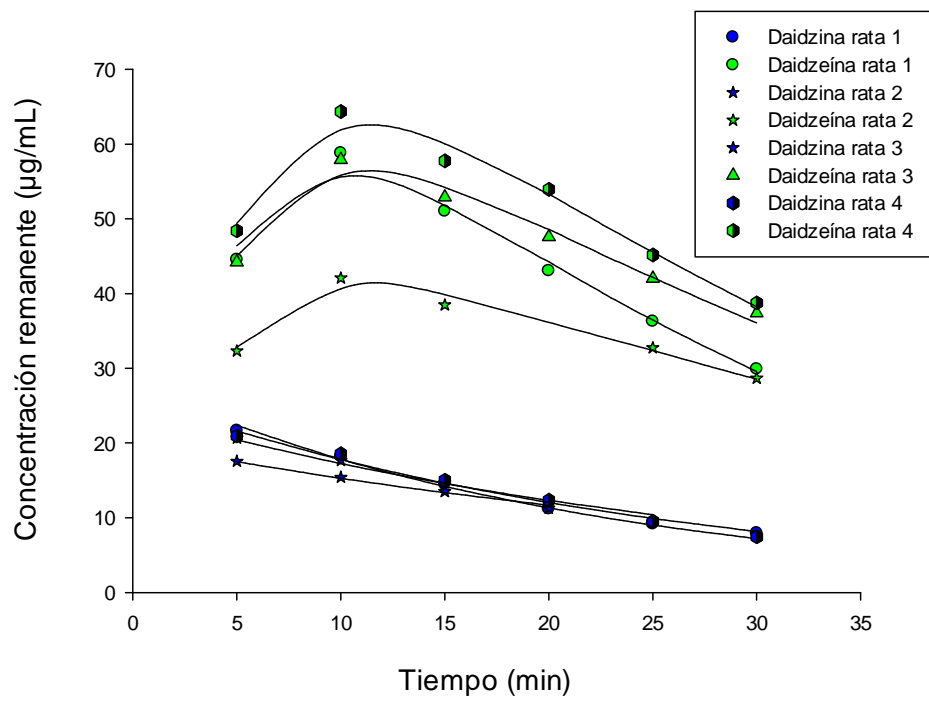
**Tabla 2.24.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *L. casei*, parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de genistina/genisteína *in situ*.



**Figura 2.12.** Cinética individual de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *L. casei*

Tiempo (min)	Daidzina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. plantarum</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	21.62	17.53	20.66	20.94	20.19 $\pm$ 1.82
10	18.21	15.41	17.66	18.56	17.46 $\pm$ 1.42
15	14.47	13.48	14.66	15.02	14.41 $\pm$ 0.66
20	11.18	11.27	11.97	12.34	11.69 $\pm$ 0.56
25	9.16	-	9.46	9.52	9.38 $\pm$ 0.19
30	7.91	-	-	7.44	7.67 $\pm$ 0.33
Tiempo (min)	Daidzeína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. plantarum</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	44.53	32.31	44.22	48.40	42.36 $\pm$ 6.97
10	58.80	42.07	57.91	64.33	55.78 $\pm$ 9.57
15	51.00	38.48	52.89	57.77	50.03 $\pm$ 8.21
20	43.05	-	47.57	53.94	48.19 $\pm$ 5.47
25	36.27	32.74	42.04	45.15	39.05 $\pm$ 5.59
30	29.86	28.64	37.39	38.76	33.66 $\pm$ 5.15
Páram.	Rata				
V(mL)	6.00	6.50	6.00	6.50	6.25 $\pm$ 0.29
$k_{\text{des}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	10.96	12.14	11.17	10.15	11.10 $\pm$ 0.82
$k_{\text{h}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	2.72	1.62	2.02	2.34	2.17 $\pm$ 0.47

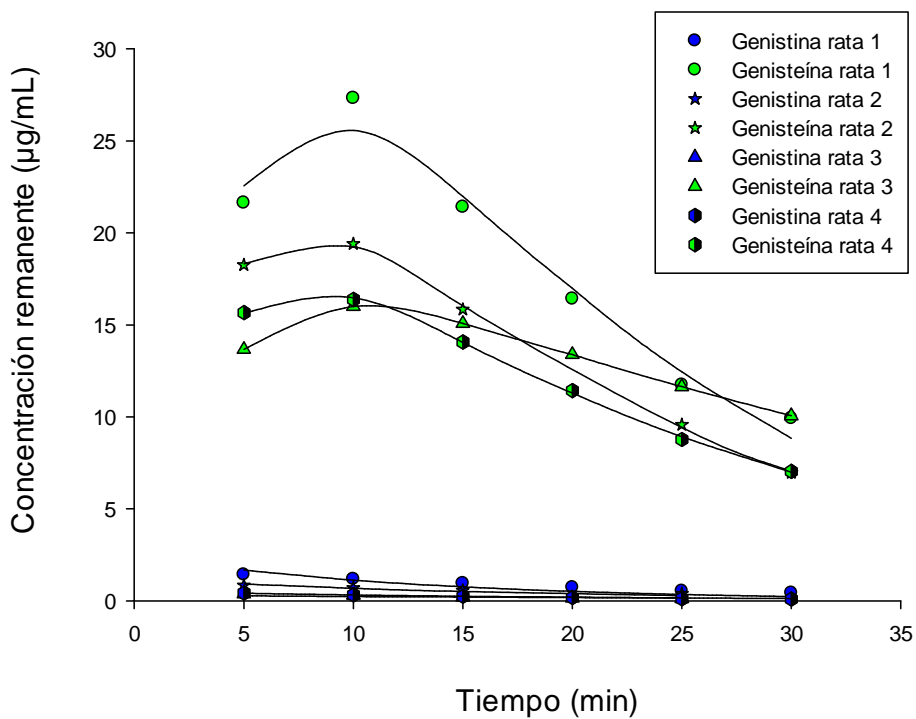
**Tabla 2.25.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *L. plantarum*, parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de daidzina/daidzeína *in situ*.



**Figura 2.13.** Cinética individual de hidrólisis de daidzina y niveles de daidzeína en intestino tras la administración de *L. plantarum*.

Tiempo (min)	Genistina ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. plantarum</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	1.42	0.84	0.36	0.43	0.76 $\pm$ 0.48
10	1.18	0.70	0.30	0.32	0.62 $\pm$ 0.41
15	0.94	0.56	0.21	0.24	0.49 $\pm$ 0.34
20	0.72	-	0.16	0.17	0.35 $\pm$ 0.32
25	0.53	0.37	0.13	0.11	0.29 $\pm$ 0.20
30	0.43	-	-	0.09	0.26 $\pm$ 0.24
Tiempo (min)	Genisteína ( $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia de la cepa <i>L. plantarum</i>				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media $\pm$ DE
5	21.64	18.26	13.39	15.67	17.24 $\pm$ 3.55
10	27.33	19.41	16.83	16.39	19.99 $\pm$ 5.07
15	21.41	15.85	14.54	14.08	16.47 $\pm$ 3.38
20	16.42	-	12.95	11.43	13.60 $\pm$ 2.56
25	11.74	9.57	11.92	8.77	10.50 $\pm$ 1.57
30	9.92	6.97	10.28	7.03	8.55 $\pm$ 1.80
Páram.	Rata				
V(mL)	6.00	6.50	6.00	6.50	6.25 $\pm$ 0.29
$k_{\text{des}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	9.30	14.14	14.04	15.59	10.98 $\pm$ 5.39
$k_{\text{h}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	4.76	3.56	1.81	2.96	3.27 $\pm$ 1.24

**Tabla 2.26.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones remanentes en presencia de la cepa *L. plantarum*, parámetros cinéticos de la hidrólisis y la desaparición de genistina/genisteína *in situ*.



**Figura 2.14.** Cinética individual de hidrólisis de genistina y niveles de genisteína en intestino tras la administración de *L. plantarum*.



## 2.2.5. Análisis estadístico

### 2.2.5.1. Método 1. ANOVA de las constantes de desaparición obtenidas.

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

$k_{des}$			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4.24	4	13	0.02

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	106.45	4	26.61	7.25	0.00
Intra-grupos	47.69	13	3.67		
Total	154.15	17	-		

Cepas Bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	3.86*	1.35	0.05	0.08	7.63
2.00	0.00	7.07*	1.46	0.00	2.99	11.15
3.00	0.00	5.99*	1.46	0.00	1.91	10.07
4.00	0.00	4.77*	1.35	0.01	0.99	8.54

**Tabla 2.27.** Comparativa ANOVA de  $k_{des}$  ( $\alpha \leq 0.05$ ) de daidzeína. 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum.

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

$k_h$			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0.44	4	13	0.78

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4.11	4	1.03	1.23	0.35
Intra-grupos	10.89	13	0.84	-	-
Total	15.00	17	-	-	-

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	-1.12	0.65	0.30	-2.93	0.68
2.00	0.00	-0.80	0.70	0.64	-2.75	1.15
3.00	0.00	-1.06	0.70	0.40	-3.01	0.89
4.00	0.00	-1.29	0.65	0.20	-3.10	0.51

**Tabla 2.28.** Comparativa ANOVA de  $k_h$  ( $\alpha \leq 0.05$ ) de daidzina. 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum

## Prueba de homogeneidad de varianzas

K <sub>des</sub>			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.81	4	13	0.19

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	47.99	4	12.00	2.77	0.07
Intra-grupos	56.33	13	4.33	-	-
Total	104.32	17	-	-	-

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	-0.76	1,59	0.97	-5.19	3.67
2.00	0.00	2.26	1,47	0.39	-1.84	6.37
3.00	0.00	-0.37	1,59	1.00	-4.80	4.07
4.00	0.00	3.39	1,47	0.12	-0.71	7.49

**Tabla 2.29.** Comparativa ANOVA de K<sub>des</sub> ( $\alpha \leq 0.05$ ) de genisteína. 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum.

## Prueba de homogeneidad de varianzas

$k_h$			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0.72	4	13	0.60

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14.21	4	3.55	4.57	0.02
Intra-grupos	10.11	13	0.78	-	-
Total	24.32	17	-	-	-

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	2.07*	0.67	0.03	0.19	3.95
2.00	0.00	0.35	0.62	0.95	-1.39	2.09
3.00	0.00	2.30*	0.67	0.02	0.42	4.17
4.00	0.00	0.90	0.62	0.45	-0.84	2.64

**Tabla 2.30.** Comparativa ANOVA de  $k_h$  ( $\alpha \leq 0.05$ ) de genistina. 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum

**2.2.5.2. Método 2. Análisis de varianzasobre las constantes de velocidad de absorción individuales**

	Parámetro
Ordenada control	1.26
Ordenada 1	24.38
Ordenada 2	6.94
Ordenada 3	8.78
Ordenada 4	22.42
Pendiente Control	-0.03
Pendiente 1	-0.59
Pendiente 2	-0.17
Pendiente 3	-0.25
Pendiente 4	-0.51

**Tabla 2.31.** Parámetros modelo completo de daidzina

	Parámetro
Ordenada control	3.44
Ordenada 1	1.80
Ordenada 2	0.55
Ordenada 3	1.39
Ordenada 4	0.83
Pendiente Control	-0.04
Pendiente 1	-0.05
Pendiente 2	-0.02
Pendiente 3	-0.04
Pendiente 4	-0.02

**Tabla 2.32.** Parámetros modelo completo de genistina

	Parámetro
Ordenada control	1.26
Ordenada 1	24.38
Ordenada 2	6.94
Ordenada 3	8.78
Ordenada 4	22.42
Pendiente Control	-0.03
Pendiente 1	-0.59
Pendiente 2	-0.17
Pendiente 3	-0.25
Pendiente 4	-0.51

**Tabla 2.33.** Parámetros modelo completo de daidzeína

	Parámetro
Ordenada control	43.74
Ordenada 1	66.92
Ordenada 2	36.82
Ordenada 3	65.87
Ordenada 4	67.43
Pendiente Control	-0.72
Pendiente 1	-1.13
Pendiente 2	-0.67
Pendiente 3	-1.17
Pendiente 4	-1.10

**Tabla 2.34.** Parámetros modelo completo de genisteína

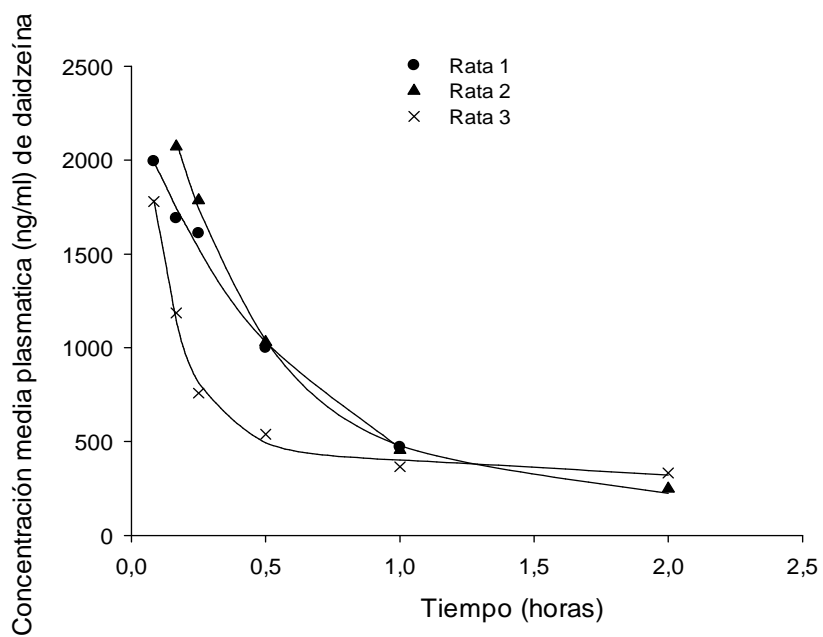


## 2.3. Estudios *in vivo*

### 2.3.1. Cinética plasmática de las isoflavonas

Tiempo (min)	Daidzeína (ng/mL) tras la administración intravenosa			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media±DE
0.08	1994.05	-	1780.06	1887.06±151.31
0.17	1690.38	2072.76	1185.84	1649.66±444.86
0.25	1610.09	1786.46	758.41	1384.99±549.75
0.50	998.00	1029.34	538.93	855.43±274.54
1.00	470.23	454.50	366.04	430.25±56.17
2.00	-	248.31	331.71	290.01±58.97
Páram.	Rata			
$AUC_{0-8}$ (ng/mL*h)	2284.56	3052.93	2153.34	2496.94±485.95

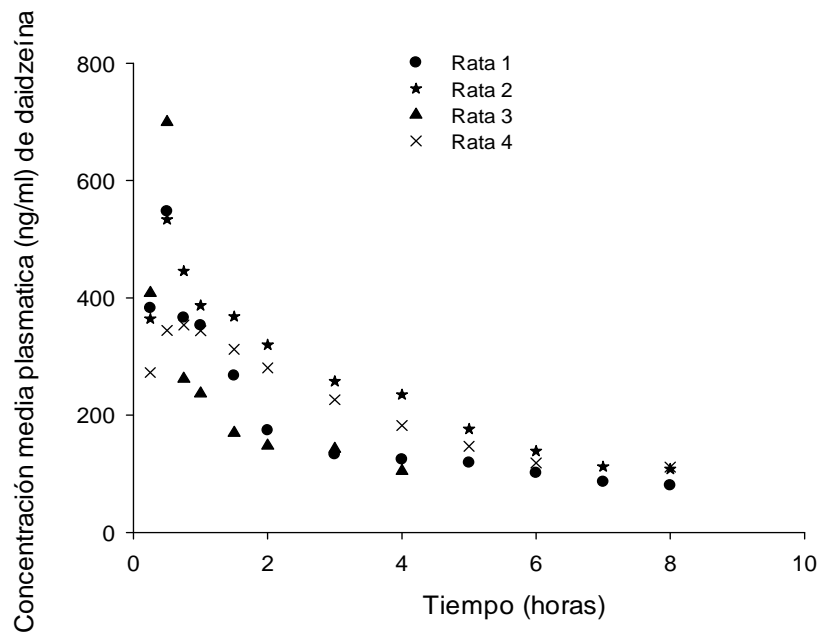
**Tabla 2.35.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de daidzeína tras administración intravenosa de Fisiogen



**Figura 2.15.** Cinética de las concentraciones plasmática de daidzeína tras administración intravenosa

Tiempo (min)	Daidzeína (ng/mL) tras la administración oral				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
0.25	382.64	364.31	408.20	451.00	401.54±37.57
0.50	547.41	533.63	699.62	372.14	538.20±133.84
0.75	366.13	445.84	261.95	308.51	345.61±79.25
1.00	352.83	387.14	236.75	283.14	314.97±67.76
1.50	266.93	368.38	169.49	242.89	261.92±82.19
2.00	173.86	319.69	147.63	241.37	220.63±76.94
3.00	132.63	257.58	142.35	211.62	186.04±59.25
4.00	124.50	234.93	104.34	208.64	168.10±63.45
5.00	118.61	176.16	-	172.03	155.60±32.10
6.00	101.18	138.46	-	169.73	136.46±34.32
7.00	86.19	112.17	-	-	99.18±18.37
8.00	80.00	108.04	-	-	94.02±19.83
Páram.	Rata				
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	547.41	533.63	699.62	451.00	557.92±103.62
<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	1323.33	1878.40	821.21	1368.72	1347.91±432.00

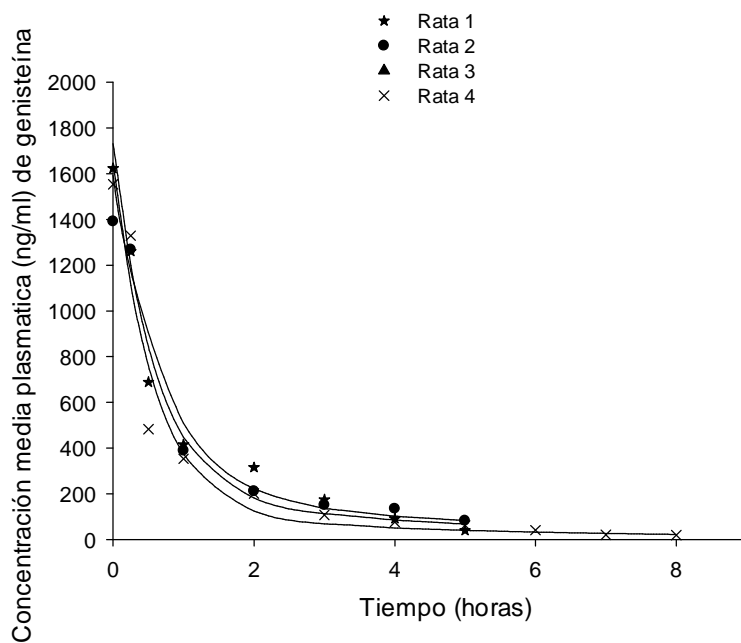
**Tabla 2.36.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de daidzeína tras administración oral de Fisiogen



**Figura 2.16.** Cinética de las concentraciones plasmática de daidzeína tras administración oral

Tiempo (min)	Genisteína (ng/mL) tras la administración intravenosa				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
0.25	1260.75	1267.07	1328.94	1357.32	1303.52±47.25
0.50	688.36	-	482.59	-	585.48±145.50
1.00	415.26	387.92	353.28	486.95	410.85±56.72
2.00	315.42	210.98	200.53	240.40	241.83±51.88
3.00	174.74	150.55	107.58	-	144.29±34.01
4.00	91.84	134.18	77.02	82.19	96.31±25.98
5.00	39.33	81.27	62.03	49.90	58.13±18.00
6.00	-	-	41.17	-	41.17±0.00
7.00	-	-	21.30	38.82	30.06±12.39
8.00	-	-	19.17	17.45	18.31±1.22
Páram.	Rata				
<i>AUC</i> <sub>0-8</sub> (ng/mL*h)	3726.59	3839.89	3653.98	3524.59	3686.26±93.69

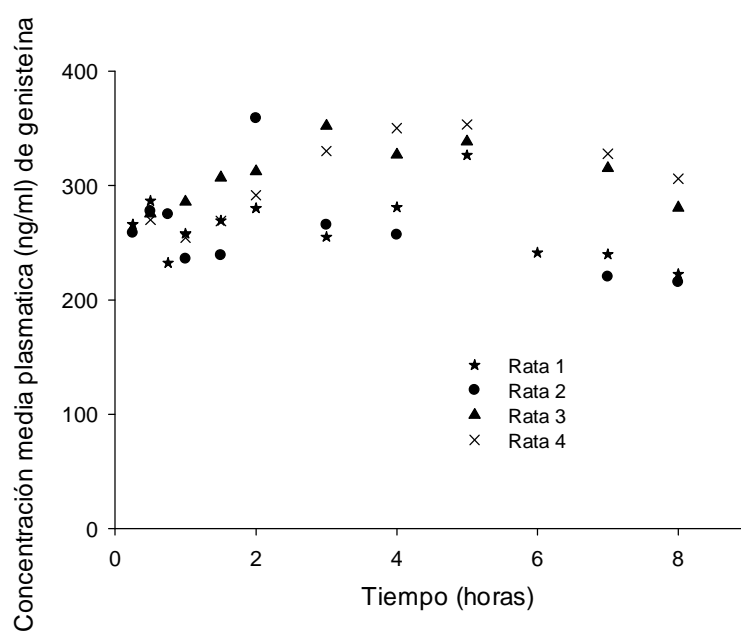
**Tabla 2.37.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de genisteína tras la administración intravenosa de Fisiogen



**Figura 2.17.** Cinética de las concentraciones plasmática de daidzeína tras administración intravenosa.

Tiempo (min)	Genisteína (ng/mL) tras la administración oral				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
0.25	266.05	258.59	-	167.56	230.73±54.84
0.50	286.62	277.53	275.52	147.81	246.87±66.22
0.75	232.39	274.77	-	134.01	213.72±72.21
1.00	257.88	235.86	285.81	130.92	227.62±67.63
1.50	269.36	239.05	306.91	132.17	236.87±75.12
2.00	280.23	358.81	312.43	240.67	298.04±50.03
3.00	255.07	265.73	352.05	115.82	247.17±97.74
4.00	281.10	256.91	326.94	125.46	247.60±86.45
5.00	326.56	-	338.46	173.41	279.48±92.05
6.00	241.38	-	-	97.86	169.62±101.48
7.00	239.92	220.16	315.19	112.36	221.91±83.73
8.00	222.49	215.56	280.67	111.33	207.51±70.45
Páram.	Rata				
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	326.56	358.81	352.05	240.67	319.52±54.37
<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	2093.09	2007.45	2468.25	1088.60	1914.35±585.74

**Tabla 2.38.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de genisteína tras administración oral de Fisiogen

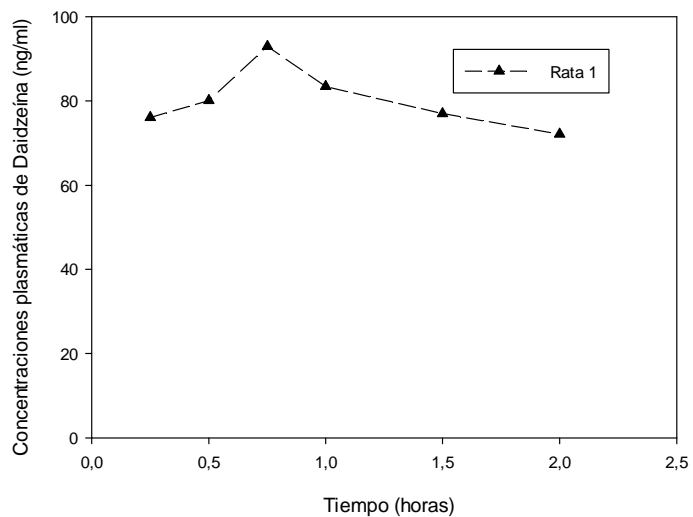
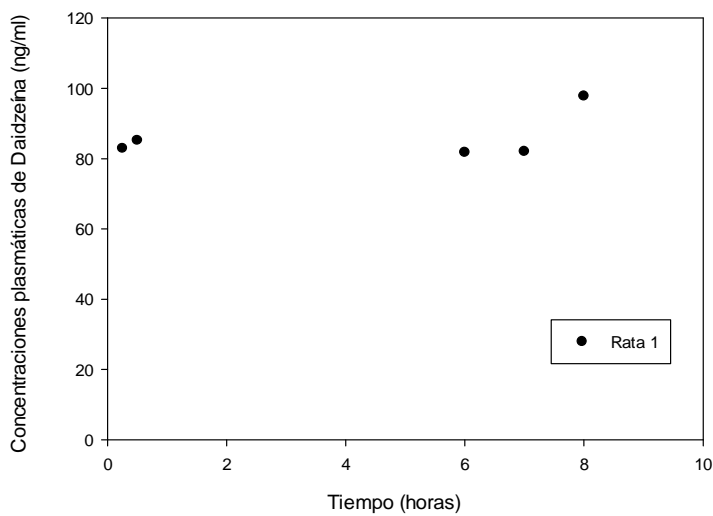


**Figura 2.18.** Cinética de las concentraciones plasmática de daidzeína tras administración intravenosa



Tiempo (h)	Daidzeína en presencia de la cepa <i>B. adolescentis</i> (ng/mL) tras administración oral	Tiempo (h)	Daidzeína en presencia de la cepa <i>B. animalis subsp lactis</i> (ng/mL) tras administración oral
	Rata 1		Rata 1
0.25	82.97	0.25	76.11
0.50	85.22	0.50	80.12
6.00	81.82	0.75	92.99
7.00	82.06	1.00	83.46
8.00	97.78	1.50	77.02
		2.00	72.16
Páram.	Rata	Páram.	Rata
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	97.78	<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	92.99
<b>t<sub>máx</sub></b> (h)	8.00	<b>t<sub>máx</sub></b> (h)	0.75
<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	662.60	<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	150.15

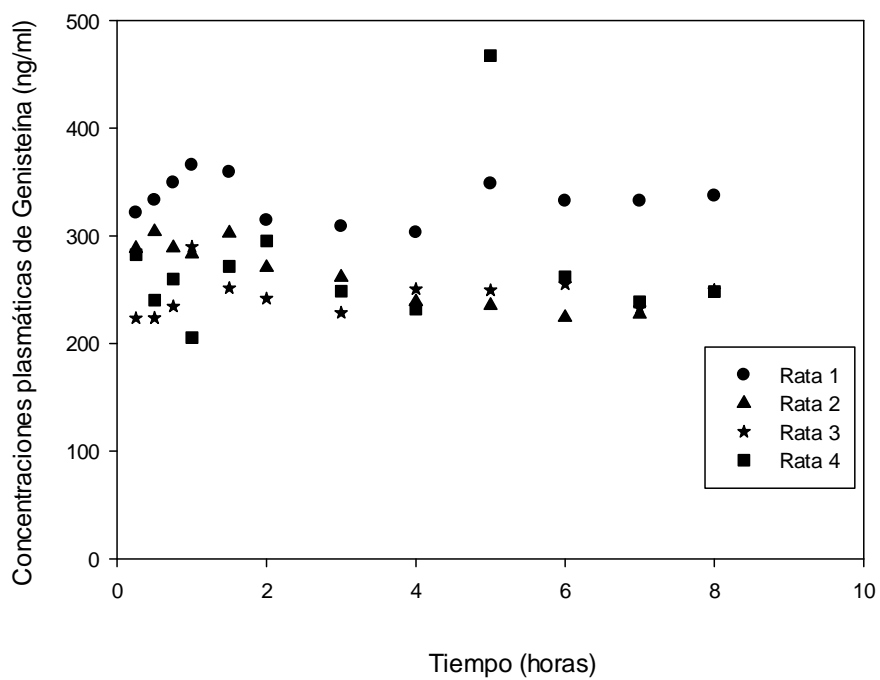
**Tabla 2.39.** Resultados individuales de las concentraciones plasmáticas de daidzeína en presencia de *B. adolescentis* y *B. animalis subsp lactis* tras la administración oral.



**Figura 2.19.** Cinética individual de absorción plasmática de daidzeína en Fisiogen® en presencia de la cepa *B. adolescentis* (●) y *B. animalis subsp lactis* (▲) (ng/mL).

Tiempo (h)	Genisteína en presencia de la cepa <i>B. adolescentis</i> (ng/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
0.25	321.42	288.35	223.41	282.51	278.92±40.78
0.50	333.27	304.04	223.57	240.35	275.31±51.91
0.75	349.50	288.89	234.45	259.94	283.20±49.48
1.00	365.68	283.37	289.97	205.39	286.10±65.50
1.50	359.30	302.64	251.60	271.79	296.33±46.93
2.00	314.49	270.71	241.86	295.33	280.60±31.43
3.00	308.70	261.67	228.60	248.68	261.91±34.03
4.00	303.12	238.89	250.52	231.96	256.12±32.36
5.00	348.47	235.48	249.55	467.48	325.25±107.33
6.00	332.35	224.33	255.23	262.00	268.48±45.63
7.00	332.35	227.47	232.93	238.78	257.88±49.86
8.00	337.27	-	249.66	248.25	278.39±51.00
Páram.	Rata				
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	365.58	304.04	289.97	467.48	3356.80±80.78
<b>t<sub>máx</sub></b> (h)	1.00	0.50	1.00	5.00	1.88±2.10
<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	2262.51	2021.23	5.00	2203.13	2103.71±155.77

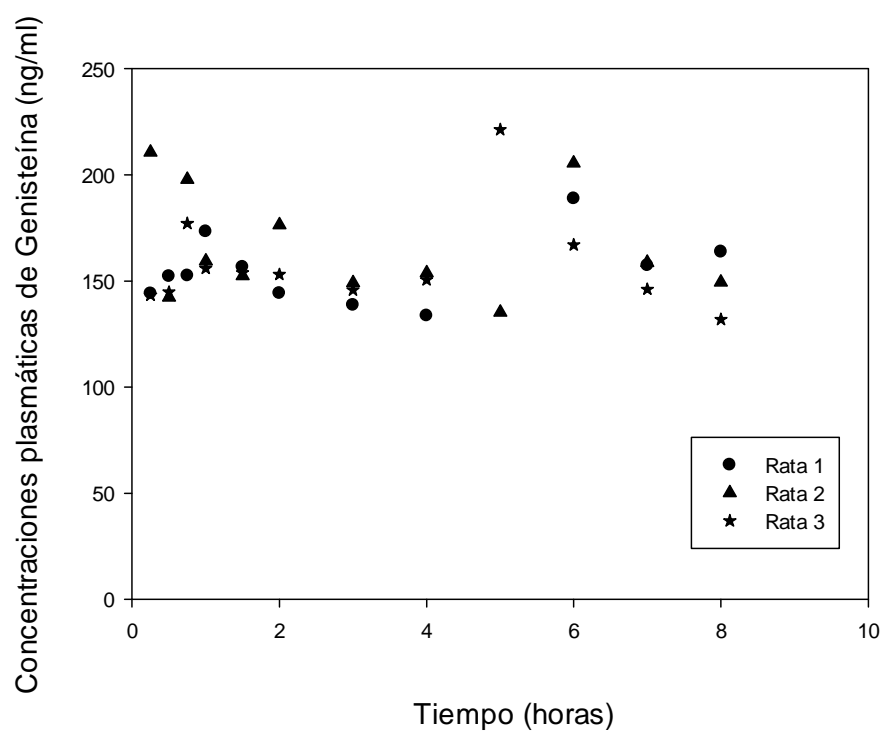
**Tabla 2.40.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de genisteína tras la administración oral de *B. adolescentis*.



**Figura 2.20.** Cinética individual de absorción plasmática de genisteína en Fisiogen® en presencia de la cepa *B. adolescentis* (ng/mL)

Tiempo (h)	Genisteína en presencia de la cepa <i>B. animalis subsp lactis</i> (ng/mL)			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media±DE
0.25	144.18	210.69	143.37	166.08±38.64
0.50	152.25	142.34	144.78	146.45±5.16
0.75	152.62	197.92	177.14	175.89±22.67
1.00	173.24	159.33	155.87	162.82±9.19
1.50	156.63	152.52	153.92	154.36±2.09
2.00	144.24	176.44	153.11	157.93±16.63
3.00	138.72	149.21	145.75	144.56±5.35
4.00	133.68	153.81	150.51	146.00±10.80
5.00	-	135.20	221.30	178.25±60.88
6.00	188.77	205.50	167.02	187.10±19.29
7.00	157.33	158.74	146.08	154.05±6.94
8.00	163.77	149.43	131.90	148.37±15.96
Páram.	Rata			
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	157.33	205.50	221.30	194.71±33.32
<b>t<sub>máx</sub></b> (h)	7.00	6.00	5.00	6.00±1.00
<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	1225.34	1283.25	1263.18	1257.26±29.41

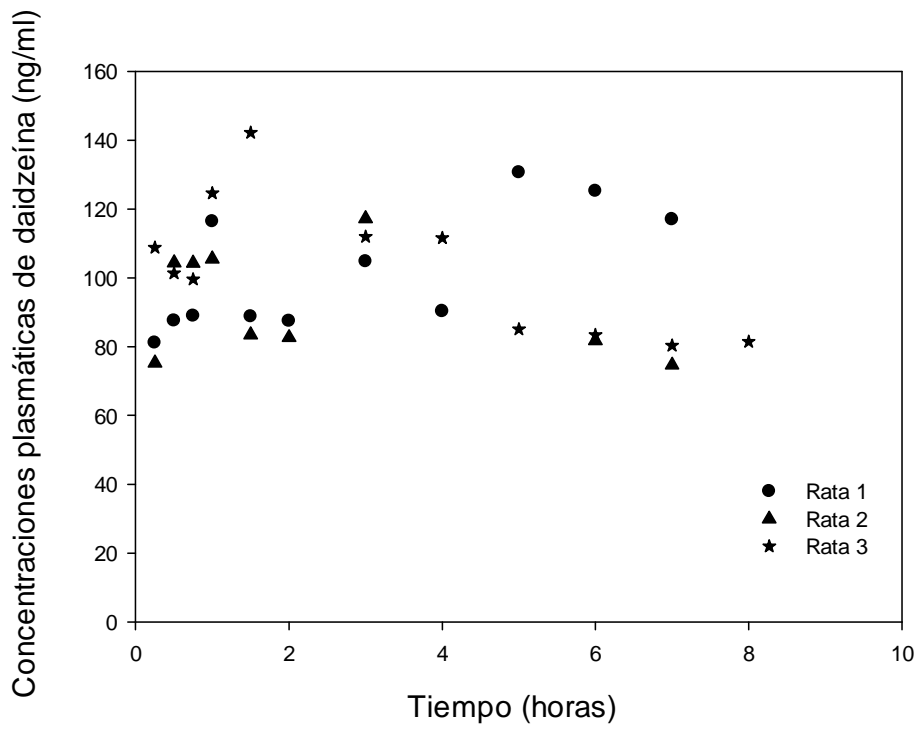
**Tabla 2.41.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de genisteína en presencia de *B. animalis subsp lactis*, tras la administración oral.



**Figura 2.21.** Cinética individual de absorción plasmática de genisteína en presencia de la cepa *B. animalis subsp lactis* (ng/mL).

Tiempo (h)	Daidzeína en presencia de la cepa <i>L. casei</i> (ng/mL)			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media±DE
0.25	81.09	75.32	108.83	88.41±17.92
0.50	87.52	104.40	101.37	97.76±9.00
0.75	88.92	104.28	99.55	97.58±7.87
1.00	116.36	105.50	124.62	115.49±9.59
1.50	88.74	83.46	142.16	104.79±32.48
2.00	87.46	82.73	-	85.10±3.35
3.00	104.77	117.27	111.93	111.32±6.28
4.00	90.32	-	111.63	100.97±15.07
5.00	130.63	-	85.04	107.83±32.24
6.00	125.23	81.76	83.40	96.79±24.64
7.00	116.97	74.65	80.30	90.64±22.98
8.00	-	-	81.45	81.45±0.00
Páram.	Rata			
<b>C<sub>máx</sub> (ng/mL)</b>	130.63	117.27	142.16	130.02±12.46
<b>t<sub>máx</sub> (h)</b>	6.00	3.00	1.50	3.50±2.29
<b>AUC<sub>0-8</sub> (ng/mL*h)</b>	815.51	649.72	760.40	741.88±84.43

**Tabla 2.42.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de daidzeína en presencia de *L. casei*, tras la administración oral.

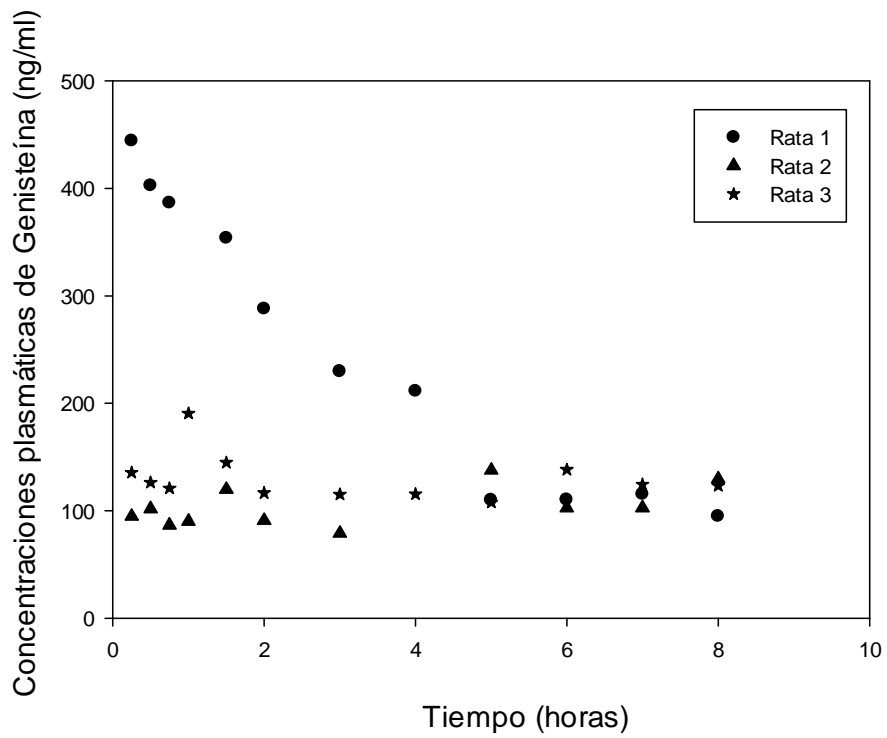


**Figura 2.22.** Cinética individual de absorción plasmática de daidzeína en presencia de la cepa *L. casei* (ng/mL).



Tiempo (h)	Genisteína en presencia de la cepa <i>L. casei</i> (ng/mL)			
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Media±DE
0.25	443.99	94.83	135.41	224.74±190.96
0.50	402.59	101.65	126.21	210.15±167.11
0.75	386.41	86.60	120.86	197.96±164.10
1.00	-	90.06	190.40	140.23±70.95
1.50	353.78	119.77	144.67	206.07±128.52
2.00	287.92	90.98	116.53	165.14±107.09
3.00	229.63	78.97	115.07	141.22±78.66
4.00	211.12	-	115.34	163.23±67.73
5.00	109.87	137.69	107.54	118.37±16.77
6.00	110.09	102.62	138.23	116.98±18.78
7.00	115.34	102.62	124.37	114.11±10.93
8.00	94.83	129.57	123.18	115.86±18.49
Páram.	Rata			
<b>C<sub>máx</sub> (ng/mL)</b>	443.99	119.77	190.40	251.39±170.50
<b>t<sub>máx</sub> (h)</b>	0.25	1.50	1.00	0.92±0.35
<b>AUC<sub>0-8</sub> (ng/mL*h)</b>	1666.37	827.68	988.89	1160.65±1074.77

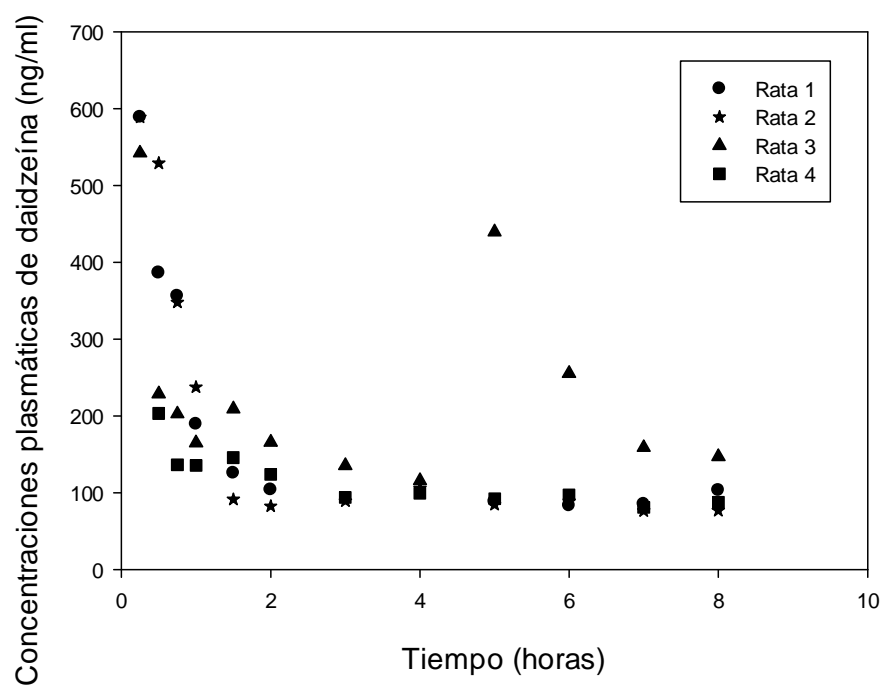
**Tabla 2.43.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de genisteína de *L. casei*, tras la administración oral.



**Figura 2.23.** Cinética individual de absorción plasmática de genisteína en presencia de la cepa *L. casei* (ng/mL).

Tiempo (h)	Daidzeína en presencia de <i>L. plantarum</i> (ng/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
0.25	588.82	588.82	542.25	-	573.30±26.88
0.50	386.53	529.08	228.68	203.18	336.87±151.65
0.75	356.36	347.79	202.57	136.22	260.73±108.95
1.00	189.16	237.48	164.81	135.61	181.76±43.12
1.50	125.71	91.41	209.19	145.63	142.98±49.49
2.00	103.86	82.42	165.78	124.01	119.02±35.50
3.00	-	89.16	135.18	93.84	106.06±25.33
4.00	-	105.86	115.69	99.30	106.95±8.25
5.00	88.56	84.49	439.77	92.26	176.27±175.70
6.00	83.46	88.92	255.33	97.24	131.24±39.24
7.00	85.22	76.41	159.04	81.03	100.43±39.24
8.00	103.25-	76.84	147.02	87.52	103.66±30.88
Páram.	Rata				
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	588.82	588.82	542.25	203.18	480.77±186.36
<b>t<sub>máx</sub></b> (h)	0.25	0.25	0.25	0.50	0.31±0.13
<b>AUC<sub>0-8</sub></b> (ng/mL*h)	1045.87	1046.27	1713.25	834.35	1159.94±382.14

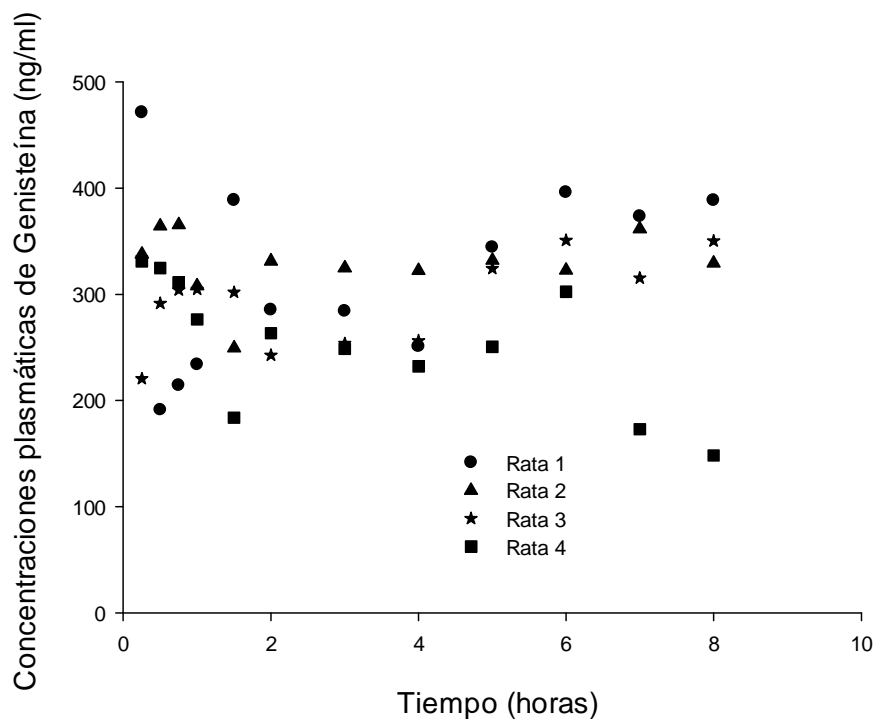
**Tabla 2.44.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de daidzeína de *L. plantarum*, tras la administración oral



**Figura 2.24.** Cinética individual de absorción plasmática de daidzeína en presencia de *L. plantarum* (ng/mL).

Tiempo (h)	Genisteína en presencia de la cepa <i>L. plantarum</i> (ng/mL)				
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Media±DE
0.250	471.11	337.71	220.43	331.05	340.07±102.58
0.500	191.05	364.33	291.49	324.83	292.92±74.16
0.750	214.21	365.47	304.04	311.24	298.74±62.67
1.000	233.91	307.94	304.80	276.44	280.77±34.31
1.500	388.63	249.55	301.88	183.80	280.96±86.52
2.000	285.27	331.32	242.68	263.35	280.65±37.99
3.000	284.13	324.77	253.61	248.68	277.80±35.02
4.000	250.79	322.28	256.26	232.23	265.39±39.30
5.000	344.31	332.02	324.18	250.52	312.76±42.31
6.000	395.94	322.66	350.69	302.53	342.96±40.47
7.000	373.37	361.68	315.30	172.97	305.83±92.05
8.000	388.47	329.32	350.21	148.19	304.04±106.75
Páram.	Rata				
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	471.11	365.47	359.69	324.83	378.02±64.29
t <sub>máx</sub> (h)	0.25	0.75	6.00	0.50	1.88
AUC <sub>0-8</sub> (ng/mL*h)	2557.84	2583.69	2326.38	1915.89	2345.95±309.17

**Tabla 2.45.** Resultados individuales y promedio de las concentraciones plasmáticas de genisteína de *L. plantarum*, tras la administración oral.



**Figura 2.25.** Cinética individual de absorción plasmática de genisteína en presencia de la cepa *L. plantarum* (ng/mL).

**2.3.1.1. Prueba de Kolmogorov – Smirnov para una muestra  
(concentraciones individuales)**

		Concentración plasmática daidzeína
N		116
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	192.13
	Desviación típica	154.09
Diferencias más extremas	Absoluta	0.28
	Positiva	0.28
	Negativa	-0.23
Z de Kolmogorov-Smirnov		3.04
Sig. asintót. (bilateral)		0.00

**Tabla 2.46.** Prueba de Kolmogorov –Smirnov para daidzeína ( $\alpha \leq 0.05$ ).

		Concentración plasmática genisteína
N		158
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	231.49
	Desviación típica	77.73
Diferencias más extremas	Absoluta	0.12
	Positiva	0.12
	Negativa	-0.07
Z de Kolmogorov-Smirnov		1.44
Sig. asintót. (bilateral)		0.03

**Tabla 2.47.** Prueba de Kolmogorov –Smirnov para genisteína ( $\alpha \leq 0.05$ )

## 2.3.1.2. Comparaciones de los parámetros cinéticos (ANOVA)

## Prueba de homogeneidad de varianzas

AUC\_daidzeína

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.18	4	11	,133

## ANOVA

AUC\_daidzeína

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2982175.56	4	745543.89	8.84	0.00
Intra-grupos	1012221.23	12	84351.77		
Total	3994396.80	16			

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	-685.32*	221.82	0.03	-13120.2	-58.61
2.00	0.00	-1197.77*	221.82	0.00	-1824.47	-571.06
3.00	0.00	-606.04	221.82	0.06	-1232.74	20.66
4.00	0.00	-187.98	205.37	0.78	-768.19	392.23

**Tabla 2.48.** Comparativa ANOVA de AUC para daidzeína ( $\alpha \leq 0.05$ ). 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L. plantarum



## Prueba de homogeneidad de varianzas

C<sub>max</sub>\_daidzeína

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.084	4	12	0.06

## ANOVA

C<sub>max</sub>\_daidzeína

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	542310,258	4	135577,564	5,464	,010
Intra-grupos	297779,237	12	24814,936		
Total	840089,495	16			

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	-347.73*	120.32	0.04	-687.64	-7.81
2.00	0.00	-352.52*	120.32	0.04	-692.43	-12.60
3.00	0.00	-315.49	120.31	,071	-655.40	24.43
4.00	0.00	35.26	111.39	,993	-279.44	349.96

**Tabla 2.49.** Comparativa ANOVA de C<sub>max</sub> para daidzeína ( $\alpha \leq 0.05$ ). 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

*AUC\_genisteína*

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.08	4	12	0.058

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4065253.51	4	1016313.38	13.91	0.00
Intra-grupos	876522.38	12	73043.53		
Total	4941775.89	16			

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	-85.89	206.42	0.98	-662.52	490.75
2.00	0.00	-932.34*	220.67	0.00	-1548.79	-315.89
3.00	0.00	-1028.95*	220.67	0.00	-1645.40	-412.50
4.00	0.00	156.35	206.42	0.85	-420.28	732.99

**Tabla 2.52.** Comparativa ANOVA de *AUC* para genisteína ( $\alpha \leq 0.05$ ). 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum

## Prueba de homogeneidad de varianzas

C<sub>max</sub> genisteína

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4.07	4	12	0.03

## ANOVA

C<sub>max</sub> genisteína

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	81177.02	4	20294.25	2.62	0.09
Intra-grupos	92915.72	12	7742.98		
Total	174092.74	16			

Cepas bacterianas	Control	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	0.00	10.99	67.21	1.00	-176.76	198.73
2.00	0.00	-151.10	71.85	0.16	-351.80	49.61
3.00	0.00	-94.42	71.85	0.51	-295.12	106.28
4.00	0.00	32.22	67.21	1.00	-155.52	219.96

**Tabla 2.53.** Comparativa ANOVA de C<sub>max</sub> para genisteína ( $\alpha \leq 0.05$ ). 0=Control, 1=B. adolescentis, 2=B. animalis subsp lactis, 3=L. casei, 4=L.plantarum