



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera Licenciatura en Ciencias Químicas

Determinación del contenido de BCAA  
en suplementos dietarios

N° 1384

Malco F. B. Bracco<sup>1</sup>

Tutor: PhD Pablo R. Castello<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Licenciatura en Ciencias Químicas (1401) de la  
Universidad de Belgrano. Matrícula: 1408.

<sup>2</sup> Profesor Titular de la Universidad de Belgrano.  
Investigador Independiente CONICET.  
Email: pablo.castello@comunidad.ub.edu.ar

Departamento de Investigaciones  
Fecha defensa de tesina: 8 de marzo de 2018

Universidad de Belgrano  
Zabala 1837 (C1426DQ6)  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina  
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533  
e-mail: invest@ub.edu.ar  
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

## Dedicatoria

A mis padres, por darme la posibilidad de elegir y desarrollar mi carrera, por todo su apoyo y por estar siempre.

A mi hermano, por acompañarme desde los inicios de mi carrera, desde mi llegada a Buenos Aires, hasta hoy.

A mis abuelos, que sé que estarían muy orgullosos en este momento y que nunca dejaron de acompañarme.

## Agradecimientos

Al Dr. Pablo Castello, por transmitirme sus conocimientos y brindarme su ayuda con muy buena predisposición durante todo el proceso de desarrollo de esta tesina.

A los profesores, que nos transmiten todos sus saberes y experiencias y nos entusiasman a seguir aprendiendo.

A mi compañera de estos últimos años, por todo su cariño.

## Índice

Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Abreviaturas.....	7
<b>1. Resumen.....</b>	<b>10-11</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Objetivos generales</b>	
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	
<b>3. Introducción.....</b>	<b>13-15</b>
<b>3.1 Los suplementos dietarios de BCAA en mercado argentino.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Valoración analítica de aminoácidos en suplementos dietarios de BCAA.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Antecedentes.....</b>	<b>16-17</b>
<b>5. Marco Teórico.....</b>	<b>18-47</b>
<b>5.1 Importancia de la suplementación con aminoácidos de cadena ramificada...18</b>	
5.1.1 Efectos nutracéuticos de los BCAA	
5.1.2 Efectos de la suplementación con aminoácidos sobre la función muscular, dolor muscular, fatiga y recuperación post-ejercicio	
<b>5.2 Catabolismo de los BCAA.....30</b>	
5.2.1 Regulación del catabolismo de BCAA	
5.2.2 Especificidad tisular del catabolismo de BCAA en animales	
5.2.3 La importancia de la baja actividad del complejo BCKDH en el músculo esquelético para la síntesis de proteínas	
5.2.4 El ejercicio físico mejora el catabolismo de los BCAA	
<b>5.3 Química y mecanismos de reacciones de la ninhidrina.....33</b>	
5.3.1 $\alpha$ -aminoácidos	
5.3.2 Estequiometría de formación y estabilidad del púrpura de Ruhemann	
5.3.3 Aminoácidos polifuncionales	
5.3.4 Espectro de absorción de púrpura de Ruhemann	
5.3.5 Otros productos de reacción con ninhidrina	
5.3.6 Productos fluorescentes	

5.3.7 Aminas aromáticas	
5.3.8 Compuestos no nitrogenados	
5.3.9 Productos de radicales libres	
<b>5.4 Confección del reactivo de ninhidrina para la determinación de aminoácidos</b>	<b>43</b>
<b>5.5 Analizador automático de aminoácidos</b>	<b>44</b>
<b>5.6 Validación del método analítico para la determinación de aminoácidos en suplementos dietarios</b>	<b>46</b>
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>48-54</b>
6.1 Muestras de suplementos dietarios analizadas	48
6.2 Equipos y materiales	48
6.3 Reactivos	49
6.4 Preparación de soluciones	49
6.4.1 Reactivo de ninhidrina	
6.4.2 Soluciones para TLC	
6.4.3 Soluciones madre de aminoácidos	
6.5 Confección de curvas de calibración	50
6.6 Determinación del contenido de aminoácidos totales mediante espectrofotometría UV/VIS	51
6.6.1 Preparación y cuantificación de muestras	
6.6.2 Validación del método analítico	
6.7 Identificación de leucina, isoleucina y valina por TLC	52
6.8 Separación y cuantificación de leucina, isoleucina y valina mediante TLC y espectrofotometría UV/VIS	53
<b>7. Resultados</b>	<b>55-71</b>
7.1 Determinación del contenido de aminoácidos totales	55
7.1.1 Validación del método analítico	
7.1.2 Muestras analizadas y resultados del contenido total de aminoácidos	

<b>7.2 Identificación de leucina, isoleucina y valina por TLC.....</b>	<b>67</b>
<b>7.3 Separación y cuantificación de leucina, isoleucina y valina mediante TLC y espectrofotometría UV/VIS.....</b>	<b>69</b>
<b>8. Discusión y conclusiones.....</b>	<b>72-75</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>76-83</b>

## Abreviaturas

<b>3MH</b>	3-metilhistidina
<b>5-HT</b>	Serotonina o 5-hidroxitriptamina.
<b>AA</b>	Aminoácidos
<b>BCAA</b>	Aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, del inglés branched-chain amino acids)
<b>BCAT</b>	Aminotransferasa de cadena ramificada (BCAT, del inglés branched-chain aminotransferase)
<b>BCKAs</b>	$\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKAs, del inglés branched-chain $\alpha$ -keto acids)
<b>BCKDH</b>	$\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH, del inglés branched-chain $\alpha$ -keto acid dehydrogenase)
<b>BUN</b>	Nitrógeno ureico en sangre (BUN, del inglés blood urea nitrogen)
<b>CAA</b>	Código Alimentario Argentino
<b>CK</b>	Creatina quinasa (CK, del inglés creatine kinase)
<b>CONAL</b>	Comisión Nacional de Alimentos
<b>CPK</b>	Creatina fosfoquinasa sérica (CPK, del inglés creatine phosphokinase)
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>GOT</b>	Transaminasa glutámico oxalacética (GOT, del inglés glutamic oxaloacetic transaminase)
<b>GPT</b>	Transaminasa glutámico pirúvica (GPT, del inglés glutamate-pyruvate transaminase)
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad (HDL, del inglés high-density lipoprotein)
<b>HOMA-IR</b>	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR, del inglés homeostasis model assessment of insulin resistance)
<b>HP</b>	Hidroxi prolina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés high performance liquid chromatography)

<b>KIC</b>	$\alpha$ -cetoisocaproato (KIC o $\alpha$ -KIC, del inglés $\alpha$ -ketoisocaproic acid)
<b>L-Arg</b>	L-arginina (L-Arg, del inglés L-arginine)
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad (LDL, del inglés low-density lipoprotein)
<b>L-Gln</b>	L-glutamina (L-Gln, del inglés L-glutamine)
<b>L-His</b>	L-histidina (L-His, del inglés L-histidine)
<b>L-Ile</b>	L-isoleucina (L-Ile, del inglés L-isoleucine)
<b>L-Leu</b>	L-leucina (L-Leu, del inglés L-leucine)
<b>L-Lys</b>	L-Lisina (L-Lys, del inglés L-lysine)
<b>L-Met</b>	L-metionina (L-Met, del inglés L-methionine)
<b>L-Phe</b>	L-fenilalanina (L-Phe, del inglés L-phenylalanine)
<b>L-Pro</b>	L-prolina (L-Pro, del inglés L-proline)
<b>L-Thr</b>	L-treonina (L-Thr, del inglés, L-threonine)
<b>L-Trp</b>	L-triptófano (L-Trp, del inglés, L- tryptophan)
<b>L-Val</b>	L-valina (L-Val, del inglés L-valine)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>RP</b>	Púrpura de Ruhemann (RP, del inglés Rhumann's purple)
<b>Sc.</b>	Solución
<b>SD1</b>	Suplemento dietario de BCAA N° 1
<b>SD2</b>	Suplemento dietario de BCAA N° 2
<b>SD3</b>	Suplemento dietario de BCAA N° 3
<b>TC</b>	Colesterol total (TC, del inglés total cholesterol)
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa delgada (TLC, del inglés thin layer chromatography)
<b>UV/VIS</b>	Ultravioleta-visible (refiere a espectrofotometría UV/VIS)
<b>VAS</b>	Escala visual análoga (EVA) (VAS, del inglés visual analogue scale)
<b>VO<sub>2</sub></b>	Consumo de dióxido de carbono (VCO <sub>2</sub> : V – volumen, CO <sub>2</sub> – dióxido de carbono)

<b>VO<sub>2</sub></b>	Consumo de oxígeno (VO <sub>2</sub> : V – volumen, O <sub>2</sub> – oxígeno)
<b>γ-GPT</b>	γ-glutamil transpeptidasa (γ-GPT, del inglés γ-glutamyltransferase)
<b>λ<sub>máx</sub></b>	Lambda máxima: simbología que representa la longitud de onda máxima

## 1. Resumen

Los aminoácidos de cadena ramificada (branched-chain amino acids o BCAA) están representados por los aminoácidos leucina, isoleucina y valina. Actualmente se comercializan en forma de suplementos dietarios en dosis que van desde 1 a 2 g de BCAA por porción, destinados principalmente a personas que realizan ejercicio físico, aunque también suelen emplearse secundariamente, como complemento dietario de personas que han sufrido quemaduras, ancianos ambulatorios o internados, pacientes oncológicos, y todas aquellas situaciones catabólicas con un mayor requerimiento nutricional.

La Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) establece en el Acta CONAL N° 103 las cantidades diarias máximas permitidas que puede ser suministrada a una persona. Este organismo menciona a través del Código Alimentario Argentino (CAA), en el artículo 1381, que todos los suplementos dietarios deben ser elaborados de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura además de estar contenidos en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos. Sin embargo, para la fabricación y venta de los mismos sólo se requieren controles microbiológicos y exigencias en el rotulado de sus envases, careciendo de especificaciones para controles fisicoquímicos y controles específicos de contenido para ingredientes como, por ejemplo, aminoácidos.

Los consumidores de suplementos dietarios esperan que estos productos contengan una cantidad mínima de aminoácidos de alto valor biológico, necesarios para promover los beneficios fisiológicos que se desean. Por este motivo, el objetivo de este estudio consiste en evaluar y comparar el contenido de BCAA en suplementos dietarios de BCAA producidos en Argentina, para lo cual se pretende el desarrollo de una técnica analítica para la cuantificación de aminoácidos que resulte reproducible y asequible para su empleo en un laboratorio analítico "estándar".

El método de análisis radica en un sistema de derivatización basado en ninhidrina y detección mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS). El reactivo de ninhidrina se preparó en una matriz de metilenglicol como solvente, con el agregado de borohidruro de sodio y buffer acetato 4 M a pH 5,5. El ensayo consiste en realizar curvas de calibración añadiendo en tubos de cultivo soluciones acuosas de distintas concentraciones de un aminoácido patrón más un cierto volumen de reactivo de ninhidrina. Los tubos se someten a calentamiento en baño maría a 85 °C durante 20 minutos, se diluyen para alcanzar un mismo volumen final y se registran sus absorbancias en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 570 nm. Para el análisis del contenido de BCAA total de las muestras, se realizan soluciones acuosas de las mismas y se prosigue con la misma metodología. Tanto la preparación del reactivo de ninhidrina, como la propia reacción con los aminoácidos, se desarrollaron bajo atmósfera de gas inerte, burbujeando las soluciones continuamente con nitrógeno para prevenir la oxidación. La identificación de los aminoácidos se realizó mediante cromatografía en capa delgada,

sembrando soluciones patrones de los distintos aminoácidos en placas de aluminio para TLC de gel de sílice. Como fase móvil se utilizó una mezcla de 2-butanona : piridina : agua : ácido acético glacial, en proporción 73 : 15 : 15 : 2, y las placas se revelaron con una solución de ninhidrina de concentración 2 mg/mL en 1-butanol : ácido acético glacial 2 N (95 : 5), previo a someterlas a calentamiento (100-105 °C) hasta la aparición de las manchas. Se utilizó la misma técnica cromatográfica con el propósito de lograr la separación y obtención de los aminoácidos puros de las muestras analizadas para su posterior determinación espectrofotométrica. Las técnicas analíticas desarrolladas reflejaron buenos resultados al momento de sus validaciones. Los resultados obtenidos para el contenido de BCAA total en las muestras revelan que los tres suplementos dietarios cumplen con el valor declarado según el especificado por cada producto, y por las especificaciones que se enuncian en las buenas prácticas de manufactura, exigidas por la legislación europea. Se logró además identificar los aminoácidos leucina, isoleucina y valina en los tres suplementos dietarios, descartando la posibilidad de la sustitución por otros aminoácidos que no se encontraran declarados en los rótulos de los mismos. Por otro parte, se obtuvo un mayor error analítico en la cuantificación de los aminoácidos separados previamente por cromatografía en capa delgada, alcanzándose en algunos casos resultados desfavorables, por lo que se continuará trabajando en la mejora analítica de esta técnica y/o en encontrar otros métodos que resulten favorables para la obtención de los aminoácidos puros.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Determinar el contenido de aminoácidos ramificados en suplementos dietarios producidos y comercializados en la Argentina.

### **2.2 Objetivos específicos**

Desarrollar una técnica analítica para la cuantificación de aminoácidos a través de un sistema de derivatización basado en ninhidrina y detección mediante espectrofotometría UV/VIS.

Evaluar y comparar el contenido de aminoácidos de cadena ramificada en suplementos de BCAA producidos y comercializados en la Argentina.

### 3. Introducción

#### 3.1 Los suplementos dietarios de BCAA en el mercado argentino

Los aminoácidos de cadena ramificada (branched-chain amino acids o BCAA) son un tipo de aminoácidos alifáticos, es decir no aromáticos, de cadena abierta y ramificada, entre los que se encuentran la leucina, isoleucina y valina. Son considerados aminoácidos esenciales y comparten el mismo destino metabólico en nuestro organismo.

En la actualidad, los aminoácidos de cadena ramificada se comercializan en el mundo como suplemento dietario. Los suplementos de BCAA producidos en la Argentina contienen aminoácidos de cadena ramificada en forma simple, en dosis que van de 1 a 2 g de BCAA por porción, o también se presentan combinados con otras moléculas, como ser L-aurina, vitamina C, vitamina B6, biotina u otros aminoácidos como L-glutamina y L-arginina. Sus presentaciones más habituales son en cápsulas rígidas o comprimidos.

En nuestro país, los suplementos dietarios se encuentran incorporados al Código Alimentario Argentino (CAA) desde el año 1998. En su artículo 1381, son definidos como “productos destinados a incrementar la ingesta dietaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes en la dieta de las personas sanas que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales. Siendo su administración por vía oral, deben presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulado, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras), u otras formas para absorción gastrointestinal, contenidas en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos. Podrán contener en forma simple o combinada: péptidos, proteínas, lípidos, lípidos de origen marino, aminoácidos, glúcidos o carbohidratos, vitaminas, minerales, fibras dietarias y hierbas con las limitaciones indicadas, todos en concentraciones tales que no tengan indicación terapéutica o sean aplicables a estados patológicos”.

Actualmente, el artículo 1381 del CAA se encuentra en revisión en el ámbito de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), organismo encargado de la actualización permanente del CAA. En el Acta CONAL N° 103 se establecen los límites de ingesta para aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas componentes de los productos destinados a personas que realizan ejercicio físico, además de incluir otras exigencias específicas para este tipo de productos. El mismo argumenta: “los suplementos dietarios especialmente destinados a personas que realizan ejercicio físico que demande un aporte de calorías diarias superior al promedio de la población (mayor a 2.000 kcal/día), deberán responder a las exigencias del presente artículo y además cuando contengan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas agregados como tales, no podrán superar las cantidades diarias según los valores máximos establecidos en la Tabla II del presente artículo”. En dicha tabla encontramos las cantidades máximas para los tres BCAA, como se resume a continuación:

<b>Aminoácido</b>	<b>Cantidad máxima agregada diaria (mg)</b>
Leucina	1900 mg
Isoleucina	1400 mg
Valina	1400 mg

La CONAL se basa en la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para explicar el término “ejercicio físico” como toda actividad física planificada, estructurada, repetitiva y realizada con un objetivo relacionado con la mejora o el mantenimiento de uno o más componentes de la aptitud física.

Cabe destacar que, en condiciones normales, la dieta de una persona debe proveerle todos los nutrientes necesarios para el mantenimiento de las funciones del organismo. Por lo tanto, un suplemento dietario sólo debería consumirse cuando, por un estado fisiológico particular, el consumidor necesite un suministro extra de un nutriente determinado, previa consulta al médico. La problemática reside en que, como todos los alimentos, los suplementos dietarios se venden sin receta médica y, por este motivo, una gran parte de los usuarios consumen estos productos “por moda” o con la esperanza de sosegar alguna dolencia, sin que sea el médico y/o nutricionista el profesional que determine si la alimentación que lleva adelante el consumidor adolece de carencias con respecto a algún nutriente.

Otra problemática a tener en cuenta y que justifica el presente trabajo, refiere a que en el CAA se menciona que todos los suplementos dietarios deben ser elaborados de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura y deben ser contenidos en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos. Sin embargo, para la fabricación y venta de los mismos sólo se requieren controles microbiológicos y requisitos de rotulado de sus envases, careciendo de especificaciones para controles fisicoquímicos y controles específicos de contenido para ingredientes como ser, en este caso, los aminoácidos leucina, isoleucina y valina.

Considerando la alta demanda de suplementos dietarios destinados a personas que realizan ejercicio físico, los consumidores esperan que dichos productos contengan una cantidad mínima de aminoácidos de alto valor biológico, necesarios para promover los beneficios fisiológicos que se desean. Por estos motivos, el objetivo de este estudio fue evaluar y comparar el contenido de BCAA en las marcas comerciales más reconocidas de suplementos de BCAA producidos y comercializados en la Argentina, refiriendo los resultados obtenidos a la cantidad de aminoácidos informada por el fabricante en sus respectivos rótulos.

### **3.2 Valoración analítica de aminoácidos en suplementos dietarios de BCAA**

Los sistemas de detección basados en ninhidrina son los métodos más generales para la determinación cuantitativa de aminoácidos, previa separación mediante cromatografía de intercambio iónico. El producto que se obtiene de la reacción del compuesto aminado con ninhidrina es un complejo coloreado llamado púrpura de Ruhemann (RP), donde la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de aminoácido.

Las reacciones de ninhidrina que utilizan técnicas manuales y automatizadas se usan ampliamente para analizar y caracterizar aminoácidos, péptidos y proteínas, así como otros numerosos compuestos positivos para la ninhidrina en aspectos biomédicos, clínicos, alimentarios, forenses, histoquímicos, microbiológicos, nutricionales y en estudios de plantas.

En la actualidad se utilizan numerosas técnicas para el análisis de aminoácidos. Un analizador automático de aminoácidos, por ejemplo, utiliza el método clásico de análisis de aminoácidos basado en cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna con ninhidrina y detección fotométrica, permitiendo el análisis y cuantificación de aminoácidos para hidrolizados de proteínas y lípidos, aminoácidos libres en soluciones y extractos, y para aminas biogénicas. Otro método muy empleado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, utilizando una derivatización de aminoácidos con un reactivo de o-ftalaldehído (OPA) y detección fluorimétrica. Además del OPA, pueden utilizarse otros reactivos como ser cloruro de dansilo, cloruro de dabsilo, fenilo isotiocianato (PITC), (9-fluorenilmetilo) cloroformiato (FMOC), entre otros. Existen también otros métodos más complejos para la determinación de aminoácidos que utilizan cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Las técnicas nombradas anteriormente son algunos ejemplos de métodos sofisticados que se utilizan actualmente para el estudio de aminoácidos. Estas tecnologías, a pesar de ser extremadamente sensibles y precisas, pueden resultar inasequibles o demandar ensayos muy costosos. A raíz de este argumento, se plantea otro de los propósitos fundamentales de este trabajo, el cual se basa en el desarrollo de una técnica analítica para la cuantificación de aminoácidos que resulte reproducible y asequible para su empleo en un laboratorio analítico "estándar". Para su desarrollo, se optó por un sistema de derivatización basado en ninhidrina y detección mediante espectrofotometría UV/VIS, para lo que se realizaron numerosas pruebas hasta encontrar un reactivo de ninhidrina que resulte estable y arroje resultados reproducibles en los ensayos.

## 4. Antecedentes

Esta sección se dedica exclusivamente a comentar de forma breve la perspectiva histórica sobre el descubrimiento y los usos de la reacción de la ninhidrina, ofreciendo citas de los trabajos más relevantes realizados por otros investigadores, los cuales sirvieron de pilares para el empleo de esta reacción en la determinación de aminoácidos para el presente estudio. Por otro lado, en la **Sección 5** de este trabajo, se hará mención de una selección de investigaciones dedicadas al estudio de aminoácidos de cadena ramificada y su importancia biológica y nutricional.

El descubrimiento que realizó Siegfried Ruhemann (1859–1943) surgió de una serendipia (término que refiere a un hallazgo afortunado e inesperado que se produce cuando se está buscando otra cosa distinta). En 1910, el científico revolucionaría el progreso de la química y la bioquímica de aminoácidos, péptidos y proteínas, al observar que la ninhidrina teñía la piel y que una solución acuosa de un aminoácido daba un color púrpura-azul intenso cuando se la trataba con este reactivo y se la calentaba. Esta última percepción la obtuvo empleando los aminoácidos que estaban disponibles en ese momento, como la  $\beta$ -alanina y el ácido  $\beta$ -aminopropiónico, aunque luego se demostró que los aminoácidos aromáticos, como el ácido antranílico, eran la excepción. Durante años posteriores se generó mucha confusión en cuanto al conocimiento del tipo de aminoácido que es reactivo con la ninhidrina, llegándose a decir que sólo los  $\alpha$ -aminoácidos experimentan esta reacción. No siempre se pudo apreciar, cuando se han hecho intentos para explicar la reacción de ninhidrina, que los ácidos  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  e incluso  $\epsilon$ -aminoácidos reaccionen bajo condiciones apropiadas. Esto dio un indicio del curso probable de la reacción de ninhidrina dado que, si la reacción es tan general como se ha indicado anteriormente, es probable que el color púrpura observado sea el mismo en cada caso y que sólo un fragmento del aminoácido implicado forme parte del compuesto coloreado (McCaldin, D. J., 1960)

Los estudios de Ruhemann sobre la química de lo que se conoció como la reacción de la ninhidrina indujeron a otros investigadores a explorar la aplicabilidad de la nueva reacción a la química de aminoácidos y proteínas. De los 26 compuestos investigados, 23 aminoácidos y 2 proteínas produjeron el típico color púrpura-azul, mientras que con el aminoácido prolina el color resultó amarillo. Las observaciones iniciales sobre la reacción de la ninhidrina fueron seguidas de estudios subsiguientes diseñados para extender la utilidad de la reacción (Ruhemann, S., 1910; Van Slyke, D. D. *et al.*, 1943)

Un segundo avance trascendental en la historia de la reacción de la ninhidrina fue la automatización de la cromatografía en 1948 por Sanford Moore y William H. Stein, permitiendo ensayos rápidos de todos los aminoácidos en un hidrolizado de proteínas a niveles nanomolares. (Moore, S., 1968; Hirs, C. H. W. *et al.*, 1954). Las siguientes referencias ofrecen

una entrada en la evolución histórica de los métodos de cromatografía en columna que utilizan la reacción de ninhidrina: Cavins, J. F. *et al.* (1968), Cavins, J. F. *et al.* (1967), Sarwar, G. *et al.* (1983), Yemm, E. *et al.* (1955) y Cooper, C. *et al.* (2001)

Una destacada tercera contribución fue la del científico Dent, C. E. (1948), el cual empleó aerosoles de ninhidrina para revelar sesenta compuestos positivos a la ninhidrina en cromatografía en capa delgada (TLC). Thompson, J. F. y Morris, C. J. (1959) describieron un análisis sensible, de cromatografía en papel, de aminoácidos en plantas. Dichas pulverizaciones se utilizan ampliamente en la actualidad con papel y placas de gel de sílice, como se ejemplifica mediante las aplicaciones descritas en las siguientes referencias seleccionadas:  $\alpha$ -aminoácidos (Laskar, S. *et al.*, 2001), fosfoaminoácidos (Grangeasse, C. *et al.*, 1999), aminoácidos reticulados (Haagsma, N. *et al.*, 1979; Griffin, M. *et al.*, 1984), aminas biogénicas (Cashman, P. J. *et al.*, 1979), amino azúcares (Ryan, E. A. *et al.*, 1980) y el ácido domoico en los mariscos (Quilliam, M. A. *et al.*, 1998). Estos investigadores emplean con frecuencia las técnicas de TLC y cromatografía en columna.

Un cuarto descubrimiento más importante fue la observación de que la complejación del RP con ciertos iones metálicos aumenta la sensibilidad de los análisis al permitir la estimación del cromóforo resultante mediante técnicas fluorescentes, luminiscentes, fosforescentes y láser. Esta modificación, ahora ampliamente utilizada en las ciencias forenses para determinar las huellas dactilares débiles, merece aplicación a las ciencias agrícolas y biomédicas. El desarrollo de reactivos de ninhidrina fluorogénicos (Boppana, V. K. *et al.*, 1990; Wimalasena, R. *et al.*, 2003) y su uso en ciencia forense (LaPorte, G. M. *et al.*, 2003; Schwarz, L. *et al.*, 2002), así como la aplicación de reactivos de ninhidrina en química ambiental (Nagaraja, P. *et al.*, 2002), química de alimentos (Friedman, M. *et al.*, 1984; Pearce, K. N. *et al.*, 1988; Fontaine, J. *et al.*, 2000; Folkertsma, B. *et al.*, 1996; Pravia, M. *et al.*, 2000), química clínica, microbiología, farmacología y toxicología (Abdellatef, H. E. *et al.*, 2003; Picton, S. F. *et al.*, 2002), son áreas activas de la investigación actual.

## 5. Marco Teórico

### 5.1 Importancia de la suplementación con aminoácidos de cadena ramificada

#### 5.1.1 Efectos nutracéuticos de los BCAA

Los aminoácidos leucina, isoleucina y valina poseen una estructura química similar, con un residuo de cadena ramificada alifático y, por este motivo, se denominan aminoácidos de cadena ramificada (branched-chain amino acids o BCAA). Debido a que el propio organismo no puede sintetizarlos por sí mismo, son considerados aminoácidos esenciales, ya que la única fuente de obtención es por medio de la dieta. Los BCAA comparten un sistema común de transporte de membrana y enzimas para las reacciones de transaminación y descarboxilación oxidativa (véase más adelante), lo que indica que están estrechamente relacionados en su destino metabólico (Harper, A. E. *et al.*, 1984; Rennie, M. J., 1996)

Los BCAA representan el 35-40% de los aminoácidos esenciales dietarios en la proteína del cuerpo y el 14-18% de los aminoácidos totales en las proteínas musculares (Riazi, R. *et al.*, 2003; Layman, D.K. *et al.*, 2004). La masa muscular de los seres humanos es alrededor del 40% del peso corporal; el *pool* de proteínas musculares, por lo tanto, representa un depósito muy grande de BCAA en el cuerpo. Por otra parte, los animales tienen un *pool* de aminoácidos libres que parece ser constante y el contenido de aminoácidos libres en el músculo esquelético humano es sólo ~0,1 g (0,6-1,2 mmol)/kg de músculo (Rennie, M. J., 1996). Este grupo de BCAA libres es extremadamente pequeño en comparación con el contenido de BCAA de las proteínas musculares. La concentración total de BCAA en la sangre humana (0,3-0,4 mM) es relativamente alta en comparación con la de los otros aminoácidos (a excepción de la glutamina). Sin embargo, la cantidad de BCAA en la sangre humana es también muy pequeña en comparación con la de las proteínas musculares (Ahlborg, G. *et al.*, 1974; Wahren, J. *et al.*, 1976)

Desde 1980 los especialistas en nutrición deportiva han presentado gran interés a los BCAA, y hoy en día son muy utilizados por los atletas, como suplementos nutricionales. Diversos estudios han demostrado que la suplementación con BCAA antes y después del ejercicio tiene efectos beneficiosos para disminuir el daño muscular inducido por el ejercicio y promover la síntesis de proteínas musculares (Coombes, J.S. *et al.*, 2000)

Estudios recientes han demostrado que los BCAA, especialmente la leucina, juegan un papel muy importante en el metabolismo de las proteínas. Los BCAA participan en la síntesis de proteínas del músculo esquelético y pueden ser utilizados como sustrato de energía durante la actividad física (Strüder, H.K. *et al.*, 1997; Holecek, M. *et al.*, 2010). La leucina promueve la síntesis de proteínas e inhibe la degradación de proteínas (Bolster D. R. *et al.*, 2004; Mordier S.

*et al.*, 2000). A pesar de esto, algunos investigadores no han sido capaces de confirmar que la suplementación con BCAA ayude a mejorar el rendimiento deportivo (Negro, M. *et al.*, 2008)

Los BCAA además actúan como donantes de esqueletos carbonados y nitrogenados para la síntesis de otros aminoácidos, como por ejemplo la glutamina, los cuales son importantes para las células del sistema inmune (Calder, P.C. *et al.*, 1999; Newsholme, P., 2001). Así, en los últimos años el objetivo de los investigadores se ha centrado también en los efectos de los BCAA sobre el sistema inmunológico. Estudios efectuados en cultivos celulares y estudios de alimentación en animales íntegros, indican que un suministro adecuado de BCAA es necesario para brindar un soporte eficaz en la función inmune. Por el contrario, una deficiente disponibilidad perjudica algunos aspectos de esta función, incluida la actividad de células asesinas y la proliferación de linfocitos (Calder, P.C., 2006; Li, P., 2007)

### **5.1.2 Efectos de la suplementación con aminoácidos sobre la función muscular, dolor muscular, fatiga y recuperación post-ejercicio**

Los aminoácidos no solo integran las proteínas estructurales y contráctiles del músculo sino que, al mismo tiempo, sirven como fuente de energía para los músculos esqueléticos. Los BCAA se metabolizan no sólo en el hígado sino también en los tejidos extrahepáticos, como los músculos esqueléticos, para producir  $\alpha$ -cetoácidos, los cuales se utilizan en la gluconeogénesis. Durante el ejercicio de resistencia, el conjunto de BCAA se reabastece a través del catabolismo de la proteína muscular. Sin embargo, la oxidación de BCAA en el músculo esquelético a menudo excede la capacidad catabólica de las proteínas, fundamentalmente en el ejercicio de resistencia prolongado.

Cuando los BCAA musculares se agotan, ingresan al músculo, de manera compensatoria, los BCAA sanguíneos. La relación triptófano versus BCAA plasmática queda descompensada a favor del primero, y como ambos compiten en el transporte a través de la barrera hematoencefálica, aumenta la concentración de triptófano (precursor de serotonina) y por ende la formación de serotonina (5-HT) en el cerebro, produciendo la percepción del cansancio, de la fatiga central (originada en el sistema nervioso central) y de la pérdida de la potencia muscular (Blomstrand, E. *et al.*, 1989). La toma de una solución de BCAA, sin embargo, podría bloquear el aumento de la serotonina producida durante el ejercicio, como se logró examinar en ratas (Smriga, M. *et al.*, 2002)

La arginina es otro aminoácido que también puede brindar funciones útiles durante el ejercicio. Su ingesta promueve la secreción de hormonas que ejercen importantes acciones durante el mismo (Van Haeften, T. *et al.*, 1989; Maccario, M. *et al.*, 1994) y facilita la eliminación de amoníaco a través del ciclo de la urea, lo que puede reducir la fatiga física originada a nivel muscular, conocida como fatiga periférica, asociada al ejercicio. El óxido nítrico es un derivado

de arginina que también puede mejorar el rendimiento físico ya que funciona como un potente vasodilatador endógeno (Giugliano, D. *et al.*, 1997; Schaefer, A. *et al.*, 2002)

La glutamina también es fundamental para la función muscular. La concentración de glutamina libre en el músculo es de aproximadamente 20 mmol/L, convirtiéndolo en el aminoácido con las concentraciones más altas presentes en el *pool* de aminoácidos libres del músculo esquelético (60% del total de aminoácidos libres) (Bergström, J. *et al.*, 1974). En el músculo de contracción lenta, la concentración intracelular de glutamina es tres veces mayor que en el músculo de contracción rápida, lo que sugiere una mayor demanda de glutamina en las fibras musculares mayormente asociadas con el entrenamiento de resistencia (Turinsky, J. *et al.*, 1990). En el ejercicio prolongado y de alta intensidad, la glutamina plasmática aumenta durante el ejercicio y luego decae durante el período de recuperación post-ejercicio (Rowbottom, D. *et al.*, 1996). Esta disminución de la glutamina, particularmente después del sobreentrenamiento, se ha implicado con el inicio de la acidosis (Welbourne, T.C., 1987) y con la disminución de la respuesta inmune (Castell, L. M., 2003)

Según afirman varios estudios, una suplementación oral de BCAA (77 mg/kg de peso corporal) antes del ejercicio aumenta los niveles de BCAA intracelulares y arteriales durante el ejercicio, lo que resulta en la supresión de la degradación de las proteínas musculares endógenas (MacLean, D. A. *et al.*, 1994). Además, se encontró que las concentraciones plasmáticas de BCAA se elevan a los 15 minutos y alcanzan un pico máximo a los 30 minutos, luego de la ingestión de 5 g de una mezcla de aminoácidos ramificados (Shimomura, Y. *et al.*, 2000). Asimismo, se comprobó que la síntesis de proteínas del músculo, luego del ejercicio, es mayor cuando los aminoácidos esenciales se consumen antes del ejercicio, en lugar de después (Tipton, K. D. *et al.*, 2001). La administración oral de BCAA (12 g/día durante 2 semanas y, adicionalmente, 20 g antes y después del ejercicio físico) también suprime el aumento de la actividad de la creatina fosfoquinasa sérica (creatine phosphokinase o CPK) durante varios días después del ejercicio (Coombes, J. S. *et al.*, 2000). Las mediciones de CPK en sangre sirven como un indicador útil del daño de las fibras musculares causada por la degradación de proteínas (Nosaka, K. *et al.*, 1992). La disminución de la actividad de la CPK sérica implica entonces una recuperación temprana de la inflamación muscular, lo que es considerado favorable por los atletas o deportistas. Estos descubrimientos sugieren que la suplementación con BCAA podría reducir el daño muscular inducido por el ejercicio físico.

Así como la medición de la CPK, también se utilizan otros indicadores para la evaluación de la proteólisis muscular inducida por el ejercicio intenso. A continuación se describen algunos ejemplos.

La hidroxiprolina (HP) urinaria está asociada con el colágeno, la proteína más abundante de los tejidos de los mamíferos. Durante la degradación del colágeno la HP que no se reutiliza es eliminada por medio de la orina, por lo que se la utiliza como un índice fiable de la degradación

de colágeno y la resorción ósea. Para el mismo propósito se utiliza la 3-metilhistidina (3MH) como indicador de la descomposición de la proteína del músculo esquelético. La 3MH es un aminoácido formado por la metilación de residuos de histidina en las proteínas musculares contráctiles. Como no es reutilizado por el organismo y se excreta en orina, se lo utiliza como un índice de degradación de la proteína contráctil. Además, la degradación de aminoácidos está relacionada con la formación de urea, por lo que aumentos de urea en sangre, orina, o sudor, también indican un aumento en la degradación de proteína (Tang, F., 2006)

Para concluir, Shimomura, Y. *et al.* (2006) sostiene que los BCAA pueden atenuar la descomposición de proteínas inducida por el ejercicio, mientras que la leucina puede estimular la síntesis de proteínas musculares y, de esta manera, apoya la utilidad de BCAA en la recuperación muscular del ejercicio y recomienda que la ingestión de 5 g de BCAA antes del ejercicio puede reducir el dolor muscular de aparición tardía y la fatiga muscular durante varios días después del ejercicio. Por otro lado, Onthani, M. *et al.* (2006) propone el uso de suplementos deportivos que además de BCAA incluyan glutamina, arginina y otros aminoácidos, y sugiere que la recuperación de la fatiga muscular producida durante el entrenamiento físico es facilitada por el uso de estos aminoácidos en su conjunto. Asimismo, destaca que estos aminoácidos reducen el daño a la integridad muscular que acompaña al ejercicio intenso. También indica que la suplementación con aminoácidos produce cambios favorables en los indicadores de hematopoyesis sobre ensayos bioquímicos realizados en sujetos de estudio y argumenta que, cuando se utilizan estos aminoácidos durante largos períodos, se pueden producir aumentos en la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, lo que contribuye a mejorar el rendimiento atlético.

A continuación, en la **Tabla 1**, se resumen ejemplos de publicaciones sobre el estudio de la suplementación con BCAA en personas deportistas o no deportistas. Estas investigaciones consisten en experimentos de doble ciego y diseño cruzado, lo que significa que los sujetos examinados fueron dispuestos en grupos de manera azarosa y que ninguno de ellos conocía la composición de las soluciones suplementadas.

**Tabla 1.** Agrupación de ejemplos de estudios sobre suplementación con BCAA en personas deportistas o no deportistas.

Estudio	Muestra			Protocolo de suplementación		Protocolo de entrenamiento	Mediciones y metodología	Conclusiones
	n	Sexo	Actividad física	Dosis	Diseño y posología			
<b>Shimomura, Y. et al. (2006)</b>	16	Mujeres	No deportistas	Grupo A) <b>5 g BCAA/día (Leu : Ile : Val, 2,3 : 1 : 1,2)</b> . Ingesta de BCAA por masa corporal: 92 ± 2 mg/kg para mujeres y 77 ± 3 mg/kg para varones.  Grupo B) Sc. placebo (150 mL): sc. de dextrina.	En ayunas, media hora después de alimento (100 kcal), durante 5 días.	Inicio a los 15 min luego de la toma. Ejercicio de cuclillas: 7 series de 20 sentadillas c/u; repeticiones cada 2 seg con intervalos de descanso de 3 min.	Dolor muscular y fatiga muscular: mediante escala visual análoga (VAS)  Muestreo: antes y después del ejercicio, durante 5 días.	La <b>suplementación con BCAA reduce el dolor muscular y la fatiga muscular</b> inducidos por el ejercicio.
	14	Varones						
<b>Tang, F. (2006)</b>	19	Varones	Nadadores	A) <b>12 g BCAA/día (54% Leu, 19% Ile, 27% Val)</b> .  B) Sc. placebo: 12 g glucosa/día	Durante 14 días: dieta regular con ejercicio de moderada/baja intensidad. Día 15: desayuno a base de carbohidratos, proteínas y lípidos con ejercicio intenso.  Dosis: 3 veces al día (4 g BCAA/dosis) por las comidas, durante 15 días.	Natación y remo: 1,5 hs/día durante 14 días. Día 15: 25 min de nado estilo pecho y competición de 600 m de nado estilo crol.	Mediciones: nitrógeno ureico, HP y 3MH en orina; glucosa, lactato, glutamina, alanina y BCAA en plasma.  Muestreo: muestras de orina y sangre antes, durante y después del ejercicio.	La <b>suplementación con BCAA previene o reduce la proteólisis muscular</b> inducida por el ejercicio intenso.

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

<b>Borgenvik, M. et al. (2012)</b>	5 2	Varones Mujeres	Físicamente activos (2 veces/sem.)	A) <b>85 mg BCAA/kg de masa corporal/día (45% Leu, 24% Ile, 30% Val)</b> .  B) Sc. placebo: agua saborizada.	Ayuno y toma de sc. BCAA o placebo en reposo antes del calentamiento físico, antes de comenzar el ejercicio de resistencia, durante y después del ejercicio y luego de 15 y 45 min de recuperación.	Ejercicios en prensa de piernas. 3 series de calentamiento de 5 repeticiones, seguido por 4 series de 10 repeticiones y, finalmente, 4 series de 15 repeticiones (con una sola pierna, con 5 min de reposo entre series).  El protocolo se realizó 2 veces por cada sujeto, con 4 semanas de descanso entre las 2 ocasiones.	Mediciones: niveles de mRNA, fosforilación de proteínas y concentraciones de glucosa, lactato y AA.  Muestreo: toma de biopsias del músculo vasto lateral de ambas piernas y muestras de sangre antes, durante y después del ejercicio.	Los <b>BCAA</b> ofrecen un efecto anabólico en el músculo esquelético y <b>reducen la concentración de proteínas catabólicas</b> .
<b>Matsumoto, K. et al. (2009)</b>	6 6	Varones Mujeres	Corredores de larga distancia	A) <b>2,5 L sc. BCAA/día (10 g Leu, 5 g Ile, 5 g Val)</b> . Sc. BCAA: 0,8% BCAA (Leu 0,4%, Ile 0,2%, Val 0,2%), 0,2% Arg, 3,5% carbohidratos.  B) Sc. placebo: 1% dextrina.	Toma de 2,5 L de sc. BCAA o placebo por día de entrenamiento (1 L entre desayuno y almuerzo, 1 L entre almuerzo y cena, y 1/2 L después de cena)	2 sesiones de 3 días de entrenamiento intensivo, con intervalo de 3 semanas, c/u compuesta de 7 sesiones de entrenamiento (total de distancias corridas: 86 km para hombres y 64 km para mujeres)	Dolor y fatiga muscular: mediante VAS, antes y después del ejercicio. Daño muscular: actividades plasmáticas de creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) y, concentraciones séricas de mioglobina (mediante kits comerciales). Inflamación: concentraciones plasmáticas de elastasa de granulocitos (GEL) (mediante kit comercial)	La <b>suplementación con BCAA</b> durante un entrenamiento intensivo <b>reduce el dolor muscular y la sensación de fatiga y, atenúa los índices de daño muscular e inflamación</b> .

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

<b>Ohtani, M. et al. (2000)</b>	13 Varones	Corredores de media y larga distancia	<p>A) Dosis de 2,2 g AA/día: <b>0,33 g L-Leu, 0,26 L-Ile, 0,22 g L-Val</b>, 0,40 g L-Gln, 0,37 g L-Arg, 0,11 g L-Pro, y 0,51 g de otros AA (L-Thr, L-Lys, L-Met, L-His, L-Phe y L-Trp)</p> <p>B) Placebo: 2,2 g dextrina.</p>	<p>3 niveles de dosis diarias de <b>sc. de AA</b> o placebo: 2,2 g/día, 4,4 g/día, <b>6,6 g/día</b>, durante el desayuno, almuerzo y cena.</p> <p>Cada sujeto probó los tres niveles de dosis diaria durante 6 meses, entre descansos de un mes.</p>	Entrenamiento constante de corredores de media y larga distancia, con variaciones en distancias e intensidad del ejercicio.	<p>Mediciones: conteo sanguíneo completo (glóbulos blancos, glóbulos rojos, hematocritos y hemoglobina); concentraciones séricas de colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidad (HDL), albúmina sérica, nitrógeno ureico en sangre (BUN), transaminasa glutámico oxalacética (GOT), transaminasa glutámico pirúvica (GPT), <math>\gamma</math>-glutamil transpeptidasa (<math>\gamma</math>-GPT), CPK, LDH, ácido láctico, amonio y glucosa.</p> <p>Evaluación de condiciones físicas mediante VAS.</p> <p>Muestreo: extracciones de sangre al iniciar y al finalizar el período de suplementación.</p>	La mezcla de AA, en la dosis diaria de 6,6 g, <b>mejoró la condición física y los parámetros sanguíneos</b> asociados en atletas durante el entrenamiento y, <b>redujo el daño muscular</b> .
---------------------------------	------------	---------------------------------------	---	--	---	--	---

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

<b>Ohtani, M. et al. (2001)</b>	23	Varones	Jugadores de rugby	<p>A) <b>2 dosis de 3,6 g AA/día (7,2 g AA/día)</b>, c/u con <b>0,54 g L-Leu, 0,43 g L-Ile, 0,36 g L-Val</b>, 0,65 g L-Gln, 0,61 g L-Arg, y otros AA (L-Pro, L-Thr, L-Lys, L-Met, L-His, L-Phe y L-Trp);</p> <p>B) Placebo: sc. de dextrina</p>	Una dosis de AA o placebo luego del desayuno y otra luego de la merienda (7,2 g AA/día) durante 90 días.	Entrenamiento intensivo 2 veces al día, durante 3 meses.	<p>Mediciones: conteo sanguíneo completo (glóbulos blancos, glóbulos rojos, hematocritos y hemoglobina); concentraciones séricas de TC, HDL, lipoproteína de baja densidad (LDL), BUN, GOT, GPT, <math>\gamma</math>-GPT, creatinina, fosfatasa alcalina (ALP), triglicéridos (TG), proteína total (TP) y hierro (Fe). Cuestionarios sobre cambios en vigor, apetito, condiciones físicas grales., velocidad de recuperación de fatiga y dolor muscular.</p> <p>Muestreo: extracciones de sangre al iniciar y al finalizar el período de suplementación.</p>	<p>La <b>suplementación con AA</b> mejoró la condición física y los parámetros sanguíneos asociados en jugadores de rugby. Los jugadores revelaron un <b>aumento del vigor</b> y una <b>recuperación más rápida de la fatiga muscular</b>.</p>
---------------------------------	----	---------	--------------------	---	--	--	--	--

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

<b>Mourier, A. et al. (1997)</b>	25	Varones	Luchadores	Suplemento dietario de proteínas con <b>0,9 g BCAA/kg/día</b> (51,9 g BCAA/100 g proteína: <b>76% Leu, 19% Ile y 5% Val</b> ).	3 grupos con distinta dieta de diferente composición energética y macronutrientes, un grupo con dieta control y otro grupo con dieta hipocalórica (24,4 kcal/kg/día) y BCAA.	Protocolo progresivo de ejercicios en cinta ergométrica.	Medición de parámetros antropométricos: masa corporal y porcentaje de grasa corporal (mediante plicómetro). Medición de tejido adiposo mediante resonancia magnética, antes y después de la dieta.	La <b>suplementación con BCAA</b> provocó <b>pérdida de peso y grasa corporal</b> , reducción de tejido adiposo visceral abdominal (VAT) y, permitió mantener un <b>alto rendimiento deportivo</b> .
<b>Sharp, C. P. et al. (2010)</b>	8	Varones	Deportistas	A) <b>6 g BCAA/día (1,80 g L-Leu, 0,75 g L-Ile, 0,75 g L-Val y 2,00 g L-Gln)</b> . B) Placebo: lactosa.	Dieta estandarizada y toma de BCAA o placebo, 3 g por la mañana y 3 g por la noche con las comidas, durante 4 semanas, con entrenamiento en la última semana.	4 sesiones por día de 5 min de estiramiento pasivo y 3 series de 6-8 repeticiones de ejercicios de piernas, pecho, músculo dorsal ancho, brazos y tríceps.	Mediciones de los niveles de testosterona, cortisol y CK.  Muestreo: extracciones de sangre antes y después de la suplementación y, luego de 2 y 4 días de entrenamiento.	La <b>suplementación con BCAA</b> produce un perfil anabólico hormonal neto, <b>reduce el dolor muscular</b> , ayuda en la recuperación, <b>aumenta el rendimiento competitivo y disminuye el riesgo de lesión o enfermedad</b> .

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

<b>Colker, C. M. et al. (2000)</b>	16	Varones	Atletas	<p>A) <b>3 g BCAA/día (1,5 g Leu, 0,57 g Ile, 0,75 g Val)</b> junto con 40 g proteína de suero y 5 g L-Gln.</p> <p>B) Placebo: 40 g proteína de suero/día</p>	<p>Cese de ingesta de proteínas 2 meses antes del inicio del estudio. Suplementación previa a los entrenamientos.</p>	<p>Rutina diaria al inicio y en la semana 5 y 10: 2-3 min de ejercicios de calentamiento, seguido de ejercicios de <i>press</i> de banca y <i>press</i> de pierna con repeticiones de 1 y 2 veces el peso corporal, respectivamente; 5 min de bicicleta fija entre ambos ejercicios.</p>	<p>Medición de parámetros antropométricos: masa corporal y porcentaje de grasa corporal (mediante plicómetro).</p> <p>En cada sesión de los 2 ejercicios de resistencia se evaluó el rendimiento según el número de repeticiones realizadas hasta alcanzar la "falta muscular momentánea" (incapacidad para completar una repetición de manera controlada con 52 seg de descanso).</p>	<p>Complementar la dieta con proteína de suero de leche por sí sola no ofrece beneficios físicos o de rendimiento. <b>La suplementación con proteína de suero de leche, L-Gln y BCAA mejoró la composición corporal y el rendimiento en el ejercicio de resistencia.</b></p>
<b>Dudgeon, W. D. et al. (2016)</b>	17	Varones	Musculación	<p>A) <b>14 g BCAA/día</b> (proporciones de AA no especificadas)</p> <p>B) Placebo: 28 g carbohidratos/día</p>	<p>Dieta hipocalórica estandarizada. Grupo BCAA: 7 g BCAA antes y después del entrenamiento. Grupo placebo: 14 g carbohidratos antes y después del entrenamiento.</p>	<p>4 días a la semana de entrenamiento de resistencia en musculación, durante 8 semanas.</p>	<p>Medición de parámetros antropométricos: masa corporal; porcentaje de grasa corporal; masa grasa y masa libre de grasa (mediante pesaje hidrostático). Resistencia muscular: mediante método de repetición máxima (cantidad máxima de peso que se puede llegar a cargar en determinado ejercicio para realizar una repetición) realizando sentadillas con pesas y <i>press</i> de banca.</p>	<p>La <b>suplementación con BCAA</b> en individuos que realizan entrenamientos de resistencia <b>ayuda a mantener la masa corporal magra y preservar el rendimiento del músculo esquelético mientras se pierde grasa corporal.</b></p>

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

<b>Gualano, A. B. et al. (2011)</b>	7	Varones	Físicamente activos	<p>A) <b>300 mg BCAA/kg/día.</b></p> <p>B) Placebo: maltodextrina, en la misma dosis.</p>	Toma de BCAA o placebo durante 3 días. Protocolo de ejercicios al 2° día (inducción del agotamiento de glucógeno). Prueba de esfuerzo exhaustiva al 3 <sup>er</sup> día.	Protocolo progresivo de ejercicios en cinta ergométrica.	<p>Mediciones: intercambio de gas (consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), consumo de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), índice de intercambio respiratorio (RER)) mediante espirómetro portátil, durante las pruebas; concentraciones séricas de lactato y glucosa plasmática (mediante lactómetro/glucómetro automático) y de cuerpos cetónicos y ácidos grasos libres (mediante kits comerciales), antes y después de las pruebas.</p>	<p>La <b>suplementación con BCAA aumenta la resistencia a la fatiga y mejora la oxidación de lípidos durante el ejercicio</b> en sujetos con agotamiento de glucógeno.</p>
-------------------------------------	---	---------	---------------------	---	--	--	---	--

Fuera de los objetivos propuestos para esta tesina, se trabajó en colaboración con Bracco, J. L. *et al.* (2017) con el propósito de estudiar las variaciones en los indicadores bioquímicos que puede provocar la suplementación con BCAA; para lo cual se facilitaron los mismos suplementos dietarios que hemos analizado en este trabajo y se efectuaron las pruebas bioquímicas características en un laboratorio de análisis clínico (Gamma Nuclear Laboratorio). Este estudio se encuentra actualmente en desarrollo y sólo se exhibe como material complementario dentro del marco de esta tesina.

En estudios preliminares efectuados en un grupo de gerontes con artrosis de rodilla y atrofia muscular, suplementados con BCAA, se encontraron cuatro grupos de marcadores de evidencia de mejoría, en todos los gerontes, luego de la suplementación con BCAA, cuando el régimen de administración del suplemento consistió en un comprimido al despertar, un comprimido después del almuerzo, y otro después de la cena, durante 30 días. Los estudios se efectuaron antes del tratamiento y a los 7 días posteriores a la ingesta de la suplementación. Se encontró que podía agruparse a los marcadores en cuatro grupos según la importancia de los cambios evidenciados en los mismos. En el grupo I se encontró una disminución del 85,30% de LDH y 65,14% de GOT, resultando ser los mejores marcadores de recuperación muscular tras la suplementación con BCAA, en gerontes con artrosis de rodilla y disminución de la masa muscular. En el grupo II se ubicó la GPT con una disminución del 31,50%. Contrariamente a lo obtenido por otros autores que relatan, en determinados grupos etarios, una disminución de la resistencia a la insulina con la suplementación, dentro de este grupo se encontró un incremento de la glucemia del 34,00%, con un aumento de la resistencia a la insulina del orden del 35,20%, obtenida con HOMA-IR. En el tercer grupo de marcadores se encontró un incremento de la cifra de leucocitos y de gammaglobulinas, que denotan un mejoramiento del sistema inmune, con un aumento en el conteo de leucocitos de 28,45 % y de gammaglobulinas del 21,55%. Dentro de este grupo el HDL colesterol sufrió un incremento del 23,69%, mejorando los parámetros de riesgo de la aterosclerosis. Por último, en el grupo IV, que resultó el grupo de los analitos con menor variabilidad tras la suplementación, se encontró la CPK que experimentó una disminución del 15,94%, la urea que bajó un 13,16%, y el colesterol de la LDL que sufrió una disminución del 12,11% (Bracco, J. L. *et al.*, 2017)

La obesidad, la diabetes, las artropatías y la atrofia muscular, son entidades fisiopatológicas que aumentan su incidencia con la edad, y están interrelacionadas. En el adulto obeso ocurre un cierto enmascaramiento de la disminución de la masa muscular, porque existe un incremento de la grasa en dicho tejido, y la atrofia del musculo se pone en evidencia cuando, aconsejado por el médico, reduce su peso como una manera de aliviar la artropatía dolorosa (Bracco, J. L. *et al.*, 2017)

La atrofia muscular ocurre por un cambio en el equilibrio normal entre la síntesis y la degradación de proteínas, por lo que el mejor modelo en el estudio de la acción de los BCAA

sobre el metabolismo proteico, es la suplementación de BCAA en gerontes, con atrofia muscular. Los BCAA favorecen la síntesis proteica a la vez que detienen la proteólisis. En la síntesis y la degradación de proteínas actúa como enzima la transaminasa GOT, que es el segundo de los analitos de recuperación muscular obtenido en el grupo I, con un 65,14 % de disminución de sus valores post suplementación. Se podría interpretar como que la célula muscular post suplementada optimizó su metabolismo anaerobio en un 85,30%, manifestado por una reducción de ese orden de la LDH, seguido por un mejoramiento en la masa muscular del orden del 65,14%. El metabolismo anaeróbico tiende a inhibir las vías de la degradación muscular y un mejoramiento del mismo debería interpretarse como una herramienta de importancia en el aumento de la masa muscular y, por ende, en la disminución de la atrofia muscular (Bracco, J. L. *et al.*, 2017)

Así como en las lesiones musculares de cualquier índole o en las microlesiones musculares ocasionadas por el ejercicio intenso, existe un aumento mayor de la GOT que de la GPT; la disminución de la primera es también superior a la segunda en los beneficios de la suplementación (Bracco, J. L. *et al.*, 2017)

Resulta llamativo que el tercer grupo sea compartido por leucocitos, gamma globulinas y HDL colesterol, todo con aumentos del orden de 25%; siendo que los tres disminuyen en la malnutrición asociada a la vejez. Lo que estaría sugiriendo una mejora en la nutrición celular con la toma de los aminoácidos ramificados. El HDL colesterol contribuye a crear un ambiente antioxidante y su aumento disminuye en parte la resistencia a la insulina (Bracco, J. L. *et al.*, 2017)

Por último, en el grupo IV, la disminución de la urea nos estaría demostrando una disminución del catabolismo proteico y por ende de la desintegración de proteínas, lo cual también se traduce en un aumento de la masa muscular. La disminución de la CPK, por otro lado, también se toma como referente de la disminución de la proteólisis (Bracco, J. L. *et al.*, 2017)

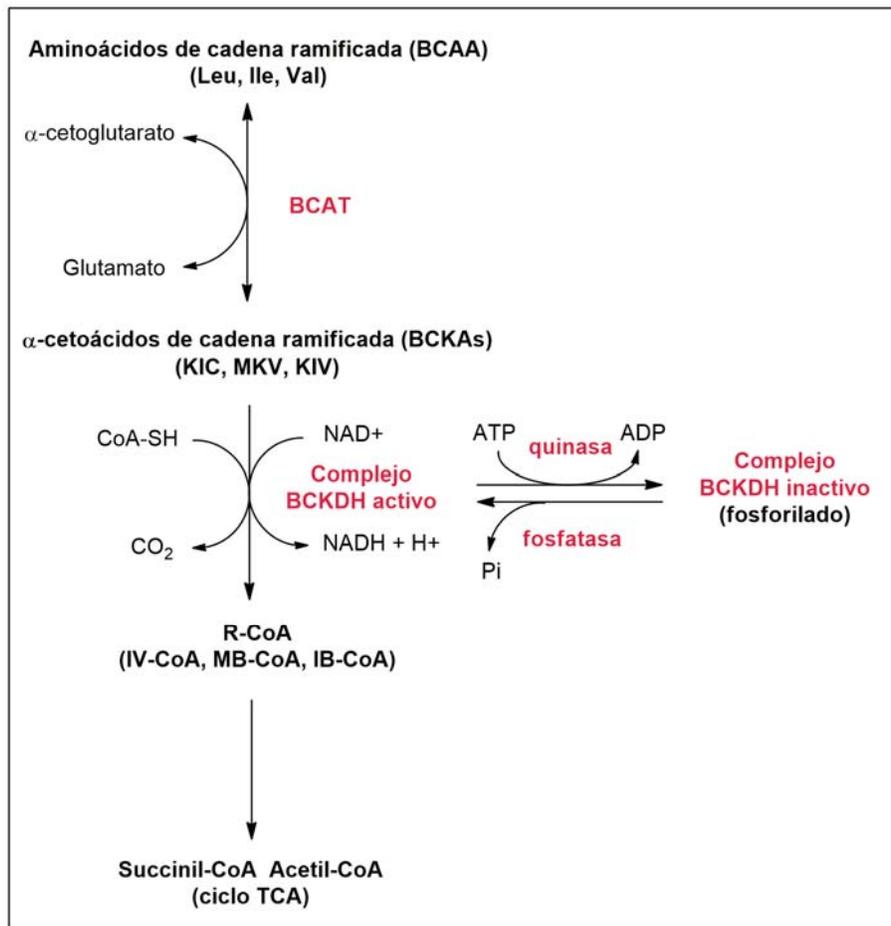
## **5.2 Catabolismo de los BCAA**

### **5.2.1 Regulación del catabolismo de BCAA**

Todos los pasos de la vía catabólica de los BCAA se localizan en la mitocondria (Harper, A. E. *et al.*, 1984). Los primeros dos pasos en el camino son comunes a los tres BCAA (**Figura 1**). La primera reacción, catalizada por la enzima aminotransferasa de cadena ramificada (branched-chain aminotransferase o BCAT), es una transaminación reversible para formar  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (branched-chain  $\alpha$ -keto acids o BCKAs). La segunda reacción, catalizada por el complejo de  $\alpha$ -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase o BCKDH), es una descarboxilación oxidativa irreversible de los BCKAs.

Se ha sugerido que la segunda reacción es el paso limitante de la velocidad en la vía catabólica total de los BCAA (Harper, A. E. *et al.*, 1984; Harris, R. A. *et al.*, 1990)

El complejo BCKDH está regulado por modificación covalente; BCKDH quinasa es responsable de la inactivación del complejo por la fosforilación de la subunidad E1 $\alpha$  (Shimomura, Y. *et al.*, 1990; Popov, K. M. *et al.*, 1992), mientras que la BCKDH fosfatasa es responsable de la activación del complejo por desfosforilación (Damuni, Z. *et al.*, 1987). Muchos estudios señalan que la actividad del complejo BCKDH está inversamente correlacionada con la actividad de la quinasa, lo que sugiere que la quinasa juega un papel importante en la regulación de la actividad del complejo (Shimomura, Y. *et al.*, 2001). Aunque la BCKDH fosfatasa ha sido purificada a partir de riñón bovino, se dispone de poca información sobre la misma (Damuni, Z. *et al.*, 1987)



**Figura 1.** Los dos primeros pasos en la vía catabólica de BCAA. KIC,  $\alpha$ -cetoisocaproato; KMV,  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato; KIV,  $\alpha$ -cetoisovalerato; CoA-SH, coenzima A en forma reducida; R-CoA, acil-CoA; IV-CoA, isovaleril-CoA; MB-CoA,  $\alpha$ -metilbutiril-CoA; IB-CoA, isovaleril-CoA; ciclo TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs) (Figura adaptada de Shimomura, Y. *et al.* (2006))

### **5.2.2 Especificidad tisular del catabolismo de BCAA en animales**

Se sabe que los BCAA se oxidan fundamentalmente en el músculo esquelético, mientras que otros aminoácidos esenciales se catabolizan principalmente en el hígado. Aunque este órgano no puede catabolizar directamente los BCAA, degrada los BCKAs derivados de los aminoácidos correspondientes (Harper, A. E. *et al.*, 1984; Harris, R. A. *et al.*, 1990). Esta especificidad del hígado para el catabolismo de los BCAA se atribuye a la única distribución de las dos primeras enzimas (BCAT y el complejo BCKDH) de la vía catalítica en el cuerpo: actividades extremadamente altas y bajas de BCAT y del complejo BCKDH, respectivamente, en el músculo esquelético y, la situación contraria en el hígado.

### **5.2.3 La importancia de la baja actividad del complejo BCKDH en el músculo esquelético para la síntesis de proteínas**

Debido a que la leucina es un potente estimulador de la síntesis de proteínas en las células musculares, es interesante considerar los efectos del catabolismo de los BCAA en la síntesis de proteínas musculares (Bolster, D. R. *et al.*, 2004). En el músculo esquelético de la rata, la degradación de los BCAA está fuertemente regulada por el complejo BCKDH: la actividad enzimática total en el músculo esquelético de ratas alimentadas con una dieta balanceada es sólo el 2% aproximadamente que en el hígado (~30 mU/g de tejido para músculo esquelético y ~1500 mU/g de tejido para hígado) (Harris, R. A. *et al.*, 1990; Shimomura, Y. *et al.*, 1995), y el estado de actividad (porcentaje de la forma activa del complejo enzimático) en el músculo esquelético es sólo 4-6% en condiciones normales de reposo en ratas (Shimomura, Y. *et al.*, 1995), mientras que el estado de actividad de la enzima hepática (especialmente en ratas macho) es cercana al 100% (Harris, R. A. *et al.*, 1990). El estado relativo de inactividad del complejo BCKDH del músculo esquelético de rata, comparado al hígado, puede reflejar la cantidad relativamente más alta de BCKDH quinasa en el músculo (Xu, M. *et al.*, 2001)

Se ha demostrado que el ácido clofíbrico, un fármaco antihiperlipidémico muy conocido, es un inhibidor de quinasa (Paxton, R. *et al.*, 1984) y, que su administración a ratas activa en gran medida el complejo BCKDH en el músculo esquelético y el hígado (Kobayashi, R. *et al.*, 2002). Además, se sabe que el tratamiento a largo plazo de ratas con la droga causa miopatía y disminución de la concentración de proteína del músculo esquelético (Teravainen, H. *et al.*, 1977; Paul, H. S. *et al.*, 1979). Estos hallazgos sugieren que la síntesis de proteínas musculares puede ser inhibida por la activación crónica del complejo BCKDH, promoviendo así la oxidación de BCAA. Por lo tanto, la baja actividad de este complejo en el músculo esquelético bajo condiciones de reposo puede ser importante para el crecimiento normal del músculo esquelético (Kobayashi, R. *et al.*; 2002)

#### **5.2.4 El ejercicio físico mejora el catabolismo de los BCAA**

Como se mencionó anteriormente, el músculo esquelético es el tejido principal donde ocurre la oxidación de BCAA, y se sabe que este proceso se favorece a través del ejercicio físico (Rennie, M. J. *et al.*, 1996). La actividad física activa el complejo BCKDH en el músculo esquelético de humanos y de ratas (Shimomura, Y. *et al.*, 1995; Wagenmakers, A. J. *et al.*, 1989) y en hígado de rata (Kobayashi, R. *et al.*, 1999), por desfosforilación del complejo enzimático. Especialmente en el músculo esquelético de ratas, casi todo el complejo BCKDH está en un estado inactivo (fosforilado) bajo condiciones de reposo y, según parece, el control estricto de la actividad del complejo por la quinasa puede estar regulado por el ejercicio (Shimomura, Y. *et al.*, 1995). Se examinó el mecanismo responsable de la activación del complejo en el músculo esquelético de rata por el ejercicio físico utilizando un modelo de contracción muscular estimulado eléctricamente y se encontró que los aumentos en las concentraciones de leucina y  $\alpha$ -cetoisocaproato (KIC) en el músculo puede ser uno de los factores responsables de la activación del complejo BCKDH en el músculo esquelético, debido a que el KIC es un potente inhibidor de la quinasa (Shimomura, Y. *et al.*, 1993; Paxton, R. *et al.*, 1984)

### **5.3 Química y mecanismos de reacciones de la ninhidrina**

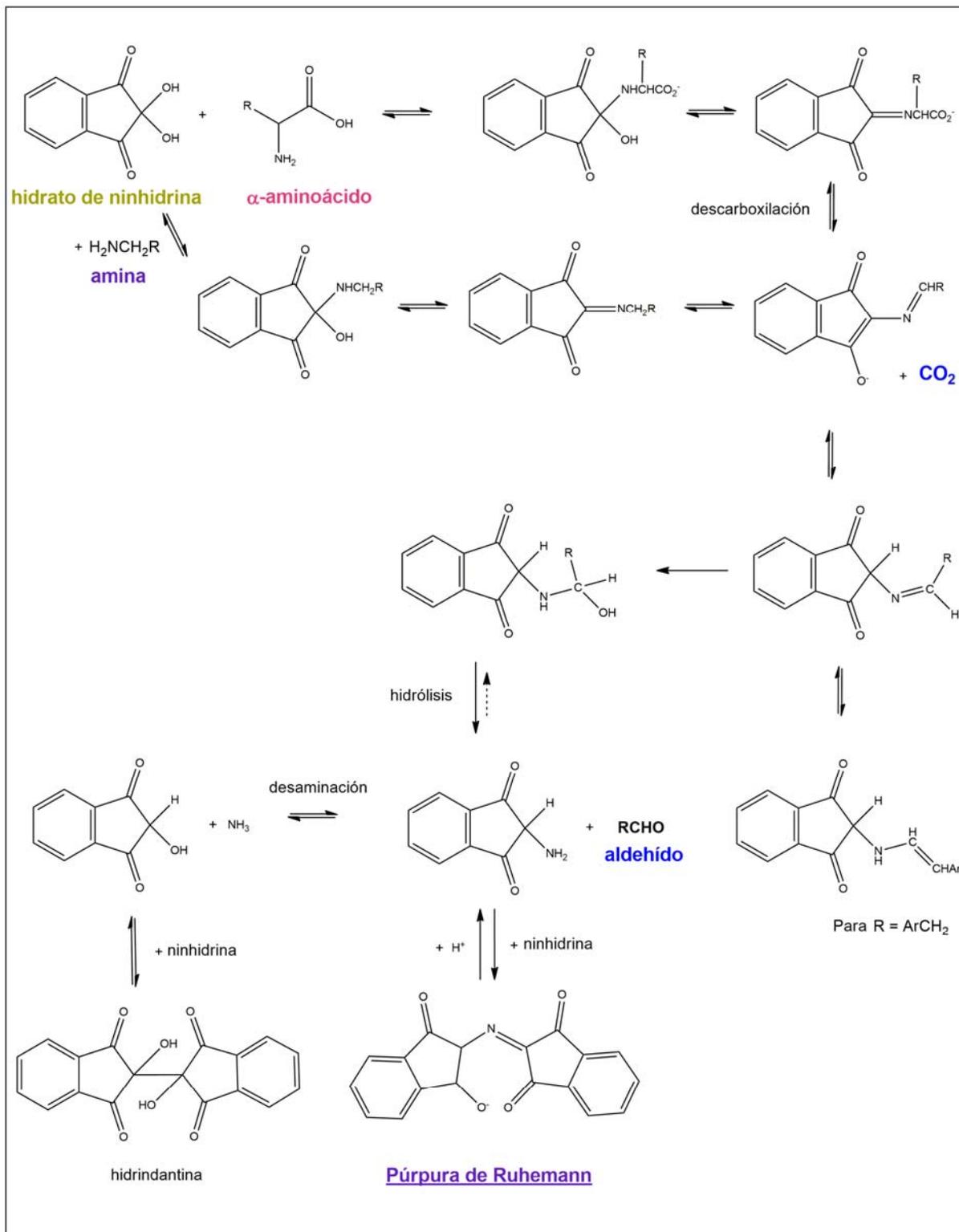
#### **5.3.1 $\alpha$ -aminoácidos**

Se formularon varias teorías tratando de explicar la formación de la sustancia responsable del color púrpura, por conveniencia denominada púrpura de Ruhemann. Cualquiera de estas teorías intentaba explicar dos observaciones experimentales: (1) En la reacción de la ninhidrina con  $\alpha$ -aminoácidos, se produce amoníaco, dióxido de carbono y un aldehído con un átomo de carbono menos que el aminoácido y puede ser obtenido cuantitativamente bajo ciertas condiciones experimentales. (2) Se forma hidrindantina cuando la ninhidrina reacciona con  $\alpha$ -aminoácidos (McCaldin, D. J., 1960)

Para ayudar a delinear los mecanismos de las reacciones de ninhidrina, se estudiaron las velocidades de reacción de  $\alpha$ -aminoácidos con ninhidrina a 30 y 100 °C en función de basicidades y entornos estéricos de grupos amino. Sobre la base de la reactividad observada de aminoácidos a 30 °C, se derivó una ecuación lineal de energía libre que permite calcular la influencia sobre las tasas de parámetros polares y estéricos asociados con los aminoácidos. El paso determinante en la velocidad de reacción de la ninhidrina parece implicar un desplazamiento del tipo nucleofílico de un grupo hidroxilo de hidrato de ninhidrina por un grupo amino no protonado (Friedman, M., 2004)

Los estudios cinéticos y mecánicos sobre el comportamiento de aminoácidos estructuralmente diferentes en las reacciones de ninhidrina indicaron que la reacción de los  $\alpha$ -aminoácidos con

la ninhidrina implica dos moléculas de ninhidrina por cada molécula de aminoácido para formar un complejo de RP. Para los  $\alpha$ -aminoácidos, tanto los parámetros polares como estéricos están implicados durante el desplazamiento nucleofílico de un grupo OH de ninhidrina por un grupo  $\text{NH}_2$  en la primera etapa de la reacción, siendo este paso el determinante de la velocidad de reacción. Se puede suponer que la descarboxilación no es el paso determinante de la velocidad porque se espera que la descarboxilación sea unimolecular y no esté sujeta a impedimento estérico. Los productos de la reacción de  $\alpha$ -aminoácidos con ninhidrina son  $\text{CO}_2$ , un aldehído (RCHO) y RP (ver **Figura 2**) (Friedman, M., 2004)



**Figura 2.** Mecanismos de reacciones de  $\alpha$ -aminoácidos y aminas con hidrato de ninhidrina para formar RP y otros productos. (Figura adaptada de Friedman, M. (2004))

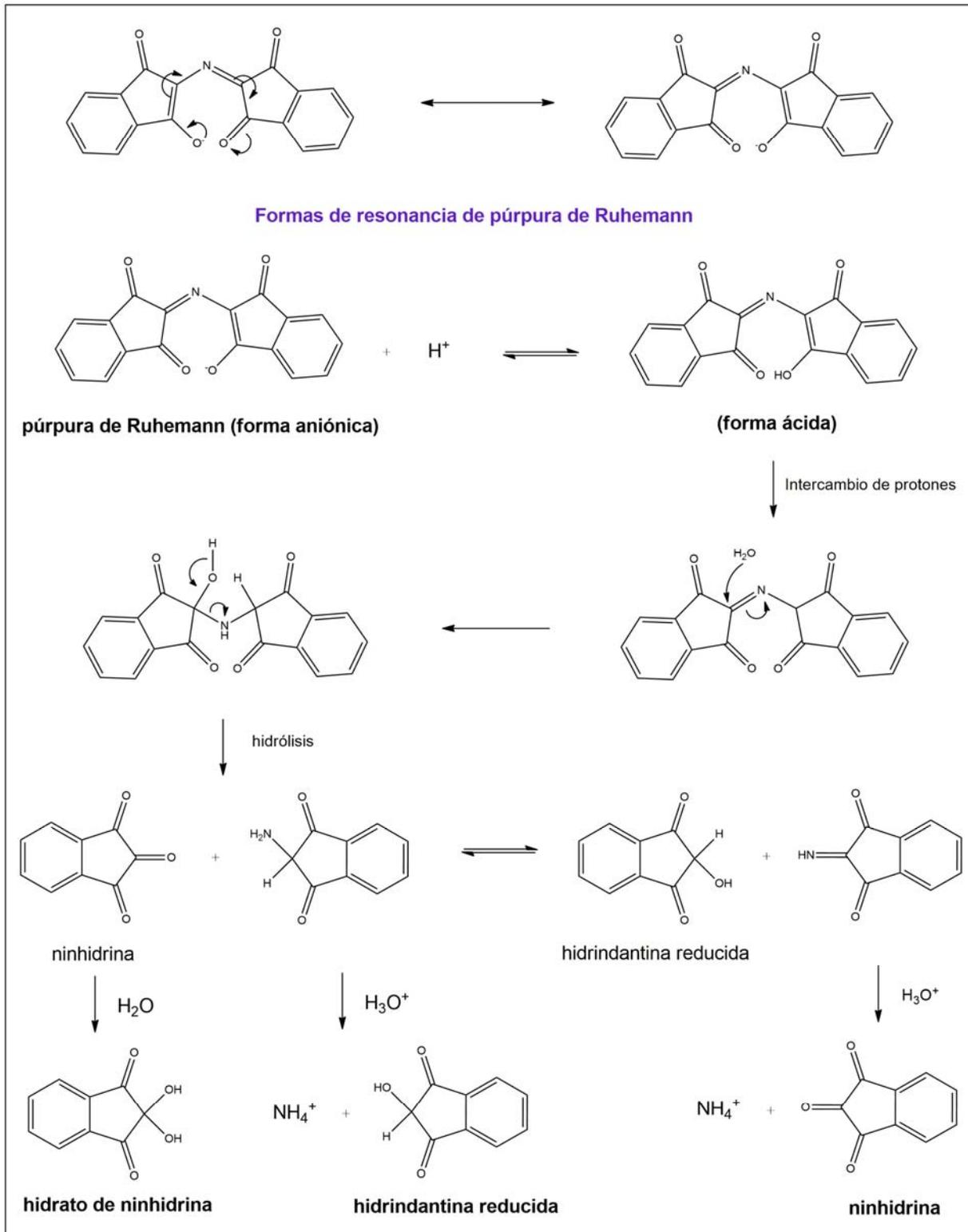
El mecanismo de reacción de aminas o aminoácidos que no tienen el grupo  $\text{NH}_2$  en posición  $\alpha$  al grupo  $\text{COOH}$  difiere del de los  $\alpha$ -aminoácidos mostrados en la **Figura 2** en un aspecto importante. El origen del par de electrones requerido para la transformación indicada es un enlace carbono-hidrógeno (C-H) y no un grupo carboxilo. El mecanismo que predice que los compuestos amino que tienen el grupo amino unido a un átomo de carbono terciario debe ser "ninhidrina negativo" ha sido inequívocamente confirmado mediante estudios con varios compuestos modelo (Friedman, M., 2004)

### 5.3.2 Estequiometría de formación y estabilidad del púrpura de Ruhemann

En algunos casos, el RP no se corresponde exactamente con un equivalente estequiométrico por grupo amino. Las posibles razones de este comportamiento no ideal incluyen: reacción lenta; reacciones secundarias; inestabilidad hidrolítica, oxidativa y fotolítica; e interferencias de color. A continuación se considerarán dos de los factores más importantes que afectan la formación de RP.

- a) *Reacción lenta.* Algunas aminas reaccionan con ninhidrina más lentamente que otras, de manera que un bajo rendimiento de color en algún momento de la reacción puede deberse simplemente a una reacción incompleta. Sin embargo, a menos que la velocidad de reacción sea impracticablemente pequeña, la medición del rendimiento de color mostrará si se ha alcanzado el máximo.
  
- b) *Equilibrio desfavorable.* Debido a que tiene varios pasos, la reacción de ninhidrina tiene varios puntos en los que la amina puede ser desviada de la formación RP. La descarboxilación (pérdida de  $\text{CO}_2$ ) y la concurrente formación de aldehído son esencialmente irreversibles, por lo que cualquier equilibrio antes de la última etapa irreversible (formación de aldehído) sólo puede lentificar la velocidad de reacción (Friedman, M., 2004)

Alternativamente, la hidrólisis de RP catalizada por ácido a pH bajo se hace rápida con respecto al tiempo de reacción (ver **Figura 3**). El equilibrio se desplaza aumentando  $\text{H}^+$  y eliminando  $\text{NH}_3$ . Una vez establecido este equilibrio, el rendimiento del color ya no se controla cinéticamente. Cuantitativamente, el rendimiento de RP debe aproximarse al 100% a pH alto y a alta concentración de hidrindantina y, acercarse a cero a baja concentración de hidrindantina y en solución ácida. El amoníaco y la ninhidrina reaccionan incluso en ausencia de hidrindantina para formar cantidades variables de RP. Debido a que la reacción requiere reducción en algún paso, parece que el exceso de ninhidrina en sí actúa como un agente reductor (Friedman, M., 2004)



**Figura 3.** Deslocalización electrónica y vías hidrolíticas de RP en solución ácida. (Figura adaptada de Friedman, M. (2004))

### 5.3.3 Aminoácidos polifuncionales

Los compuestos que contienen otro grupo nucleofílico (por ejemplo amino o sulfhidrilo) además del grupo  $\alpha$ -amino, pueden formar intermedios cíclicos que no se convierten en RP, o se convierten sólo lentamente (ver **Figura 2**). Así, la ornitina, la lisina y la penta- y hexa-metilendiamina dan rendimientos de color correspondientes a sólo uno de sus dos grupos amino. Los diaminoácidos tales como la lisina tienen bajos rendimientos de color con ninhidrina, presumiblemente porque el intermediario de aminoaldehído, producido por desaminación descarboxilativa, se cicla a piperidina y evita así la reacción del segundo grupo amino con ninhidrina. La lisina da un rendimiento normal de color cuando uno de sus dos grupos amino está bloqueado por acetilación. Aunque la producción de RP se toma generalmente como indicativa de grupos amino primarios alifáticos, se conocen varios casos en los que los grupos amino secundarios alifáticos (por ejemplo, N-metilglicina,  $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ) también dan lugar a la reacción (Friedman, M., 2004)

### 5.3.4 Espectro de absorción de púrpura de Ruhemann

Los estudios sobre las reacciones de ninhidrina en solventes acuosos con dimetilsulfóxido (DMSO) reflejaron que el espectro visible y de resonancia magnética nuclear (RMN) de RP son fuertemente dependientes del solvente. Un estudio sobre los espectros visibles de RP en DMSO, formamida, dimetilformamida (DMF), piridina y en mezclas de solventes acuosos-no acuosos, reveló grandes diferencias tanto en la posición de absorción de los valores de longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) y los valores de coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para las dos bandas. Ambos valores resultaron ser una función lineal de la composición de DMSO-agua en las mezclas de solventes. Esta información facilita la predicción de valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  de RP en diferentes solventes. En solventes apróticos no acuosos (por ej. DMSO y DMF), la  $\lambda_{\text{máx}}$  debe estar cerca de los 605 nm; en solventes apróticos no acuosos capaces de experimentar un equilibrio ácido-base (por ej. piridina), cerca de los 550 nm; y en solventes próticos no acuosos (por ej. formamida), cerca de los 575 nm. Los efectos observados de los solventes deben tenerse en cuenta en las cuantificaciones de las reacciones de ninhidrina tanto en medios no acuosos y mezclas de acuosos-no acuosos (Friedman, M., 2004)

### 5.3.5 Otros productos de reacción con ninhidrina

Hay muchos compuestos que producen color con ninhidrina sin dar RP. Iminoácidos (ácido pipercolico, prolina), aminas aromáticas (anilina), ácidos nucleicos (citosina, guanina), aminoácidos polifuncionales (arginina, asparagina, cisteína, triptófano) y no aminoácidos (fructosa, ácido levulínico, ácido siálico, iones cianuro), condensan con ninhidrina para formar otros productos "anormales". La **Figura 4** representa las estructuras de los derivados de

ninhidrina característicos de estos compuestos (Friedman, M., 2004). A continuación se interpretarán los casos de la arginina y la lisina a modo de ejemplo, dentro de estas denominadas reacciones "no clásicas" de ninhidrina, con el propósito de manifestar el amplio campo de aplicación que tiene la ninhidrina

*Arginina.* El grupo guanidino de residuos de arginina unidos a proteínas reacciona con compuestos dicarbonilo tales como glicoxal e hidrato de ninhidrina para formar aductos cíclicos. Los estudios sobre la reacción de la ribonucleasa con ninhidrina a pH 8 y a 25 °C ayudaron a evaluar el papel de los residuos de arginina en la estructura y función de las proteínas. Se encontró que la ninhidrina modificó los residuos de arginina y lisina, dando como resultado la inactivación de la enzima. Por otra parte, la acilación reversible del  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de lisina con anhídrido citracónico, seguido de exposición a ninhidrina, dio lugar a modificación selectiva de arginina. En la **Figura 4** se muestra una posible estructura para el producto de reacción de ninhidrina-arginina (Friedman, M., 2004)

Estudios simultáneos revelaron que (a) la cisteína libre y la arginina reaccionaron rápidamente con ninhidrina a pH 8-9 a 37 °C; (b) la reacción de arginina libre con ninhidrina ocurre en dos etapas, una reacción rápida inicial seguida por una velocidad de reacción de 1000 veces más lenta; (c) la reacción de 2 moles de ninhidrina/mol de tripsina dio como resultado la modificación de 1,54 moles de grupos guanidino/mol de tripsina, sin afectar la actividad trípica; (d) la reacción inicial entre la papaína y la ninhidrina resultó en la modificación de 0,81 grupos guanidino/mol de papaína, lo que sugiere que la mayoría de los residuos de arginina no son accesibles a la ninhidrina; y (e) el grupo SH libre de la papaína no fue modificado por la ninhidrina, lo que sugiere que está alojado dentro de la hendidura del sitio activo de la enzima. La ninhidrina puede usarse para titular residuos de arginina de proteínas. También es de destacar el uso de un reactivo de ninhidrina para determinar el contenido de derivados de guanidina en árboles frutales (Friedman, M., 2004)

*Lisina.* La lisina, la ornitina y la prolina reaccionan selectivamente con un reactivo de ninhidrina ácido a pH 1,0 (ver **Figura 4**). Estas observaciones incitaron el interés en aplicar este método a la lisina libre. La presencia de cloruro férrico en la mezcla de reacción dio como resultado un reactivo férrico de ninhidrina que reaccionaba específicamente con lisina a pH 1,0, formando un cromóforo que absorbía a 470 nm, sin interferencia por prolina, ornitina, glicina, arginina, histidina, urea, amoníaco, o azúcares. Se encontró que el DMSO disolvió el complejo ninhidrina-lisina-férrico, permitiendo el análisis de concentraciones de lisina de 0,0625 a 0,5 mg. Este método permite la determinación de lisina en la fabricación industrial de la misma por los microorganismos productores de lisina (Friedman, M., 2004)

Otras aplicaciones útiles a la lisina y derivados incluyen la determinación de (a) lisina con ninhidrina basada en la formación del derivado de ninhidrina-lisina fluorescente, mostrado en la **Figura 4**, (b) lisina sin reaccionar por ninhidrina para facilitar el aislamiento de un producto de

pardeamiento no enzimático de lisina-glucosa, (c) lisinoalanina en proteínas alimentarias, (d) amidas de galacturonil-L-lisina en paredes celulares vegetales, (e) aminoácidos reticulados y glicosilados en colágeno, (f) glucósidos de hidroxilisina en orina, (g) biosíntesis de lisina en bacterias, y (h) N<sup>6</sup>-(1-carboxietil)lisina en cultivos de *Streptococcus lactis* (Friedman, M., 2004)

### 5.3.6 Productos fluorescentes

Una reacción de una mezcla de ninhidrina, un aldehído tal como fenilacetaldehído y una amina primaria produce un complejo ternario altamente fluorescente de estructura desconocida. Esta reacción es la base para un procedimiento automatizado de ninhidrina fluorescente para detectar aminoácidos y péptidos, que es 10 a 100 veces más sensible que el método colorimétrico de ninhidrina. Esta técnica resulta útil para detectar péptidos fisiológicamente activos en tejidos biológicos (véase también la sección sobre arginina) (Friedman, M., 2004)

### 5.3.7 Aminas aromáticas

La reacción de ninhidrina con aminas aromáticas tales como anilina no da lugar a la formación de RP. Los grupos NH<sub>2</sub> aromáticos reaccionan con ninhidrina en desplazamientos nucleofílicos para formar productos que tienen la estructura que se muestra en la **Figura 4**. Con compuestos diamino, tales como *o*-fenilendiamina, la ninhidrina forma el derivado de quinoxalina (Friedman, M., 2004)

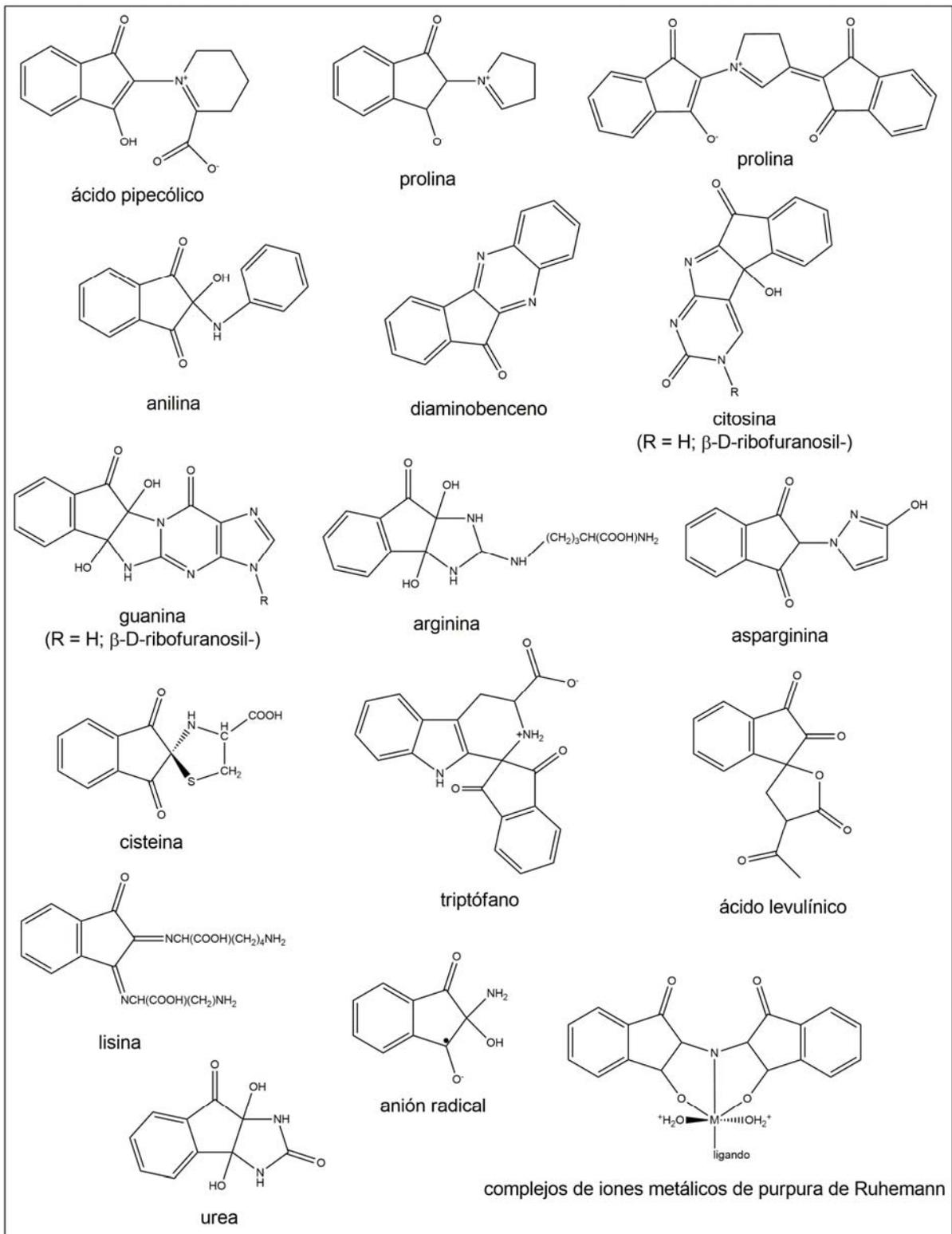
Se forman aductos policíclicos análogos a partir de la reacción de ninhidrina con nucleótidos de guanina, guanosina, citosina y citidina (ver **Figura 4**). Estas reacciones deben tenerse en cuenta en aplicaciones de la reacción de ninhidrina a sustratos que contienen ácido nucleico. (Friedman, M., 2004)

### 5.3.8 Compuestos no nitrogenados

Varios investigadores observaron productos anómalos de reacción "ninhidrina positivos" de aldehídos libres de nitrógeno, cetonas, cetoácidos y monosacáridos. En la **Figura 4** se muestra una estructura propuesta para el producto de reacción incoloro ninhidrina-ácido levulínico. Otros estudios mostraron que un reactivo ácido de ninhidrina era útil para medir ácidos siálicos libres y en sialoglicoproteínas. La estructura del ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) contiene un grupo NH<sub>2</sub> acetilado (Friedman, M., 2004)

### **5.3.9 Productos de radicales libres**

La ninhidrina reacciona con aminoácidos para producir radicales libres característicos de varios aminoácidos, así como de aminoácidos N-terminales en péptidos y proteínas (ver **Figura 4**). Estudios relacionados indican que la ninhidrina también participa en las reacciones en cascada en estado sólido con prolina y que la fotoquímica de la ninhidrina es dependiente del solvente (Friedman, M., 2004)



**Figura 4.** Estructuras de derivados de ninhidrina característicos. (Figura adaptada de Friedman, M. (2004))

#### **5.4 Confección del reactivo de ninhidrina para la determinación de aminoácidos**

Los sistemas de detección basados en ninhidrina son los métodos más generales para la determinación cuantitativa de aminoácidos previa separación mediante cromatografía de intercambio iónico. El producto que se obtiene de la reacción del compuesto aminado con ninhidrina es un complejo coloreado llamado púrpura de Ruhemann, donde la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de aminoácido.

En la reacción de ninhidrina con aminoácidos es ventajosa la presencia de hidrindantina (ninhidrina reducida) para obtener una formación óptima de dicho complejo. La hidrindantina puede añadirse directamente a la mezcla de reacción o puede formarse mediante la adición de un agente reductor a la ninhidrina. El primer caso puede conllevar ciertos inconvenientes como facilitar la oxidación de la ninhidrina por el oxígeno del aire durante la preparación del reactivo o demandar un mayor tiempo y coste para la preparación del reactivo. En el segundo caso, se puede obtener hidrindantina en la mezcla de reacción con alguno de los siguientes agentes reductores: cloruro de titanio (III) (James, L. B., 1984; James, L. B., 1971; James, L. B., 1978), cloruro de estaño (II) (Moore, S. *et al.*, 1948; Spackman, D. H. *et al.*, 1958), cianuro de potasio (Rosen, H. *et al.*, 1962) o ácido ascórbico (West, E. S. *et al.*, 1942). El inconveniente de emplear agentes reductores derivados de metales pesados es la formación de precipitados. Este problema no ocurre cuando se utiliza borohidruro de sodio como agente reductor de la ninhidrina en una matriz de DMSO como solvente, y se obtiene a su vez un reactivo de ninhidrina más estable (Moore, S., 1968; Takahashi, S., 1978)

Se ha estudiado que el reemplazo de metilenglicol (Cellosolve), como solvente, por DMSO en la preparación del reactivo de ninhidrina, y de buffer de acetato de litio por buffer de acetato de sodio, aumentan la estabilidad del reactivo (Moore, S., 1968). No obstante, el reactivo debe conservarse a presión positiva de un gas inerte (James, L. B., 1984) y en un compartimento refrigerado del equipo analizador (Moore, S., 1968). También se demostró que la actividad del reactivo cae a un tercio del valor original cuando se lo mantiene a temperatura ambiente. Algunos compuestos disueltos en DMSO pueden sufrir cambios químicos debido al carácter aprótico dipolar de este solvente, por lo que si se emplea DMSO como solvente se podrían generar efectos desfavorables, como cambios de color de la solución bajo ciertas condiciones de reacción (por ejemplo a pH alcalino) (Standara, S. *et al.*, 1999)

Standara, S. *et al.* (1999) utilizó borohidruro de sodio como agente reductor para preparar un reactivo de ninhidrina en una matriz de metilenglicol como solvente. Al reemplazar el DMSO por metilenglicol, pretendía vencer la inestabilidad del reactivo en la región alcalina, es decir, en la región en la que se utilizan buffers para la elución de aminoácidos básicos, con el objetivo de que el reactivo sea utilizable dentro de toda la gama del análisis de aminoácidos.

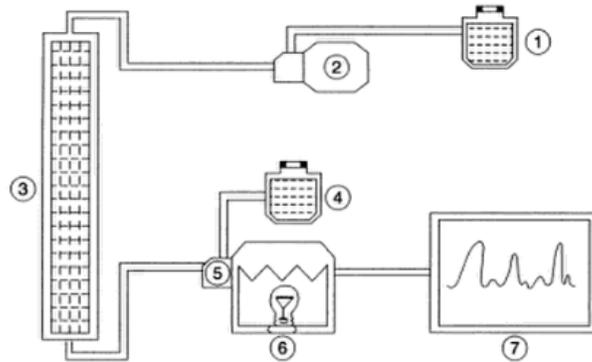
En este trabajo, luego de varios intentos por obtener el reactivo de ninhidrina que resulte más estable, se escogió el reactivo propuesto por Standara, S. *et al.* (1999), el cual se compone principalmente de ninhidrina, borohidruro de sodio como agente reductor, solución buffer acetato de sodio y metilenglicol como solvente (ver **Sección 6.4.1**). Anterior a esta elección, se efectuaron pruebas de preparación del reactivo de ninhidrina utilizando como agentes reductores al cloruro de titanio (III) y cloruro de estaño (II), siguiendo las metodologías empleadas en los trabajos citados en la página anterior. Sin embargo, pudimos confirmar la obtención de soluciones turbias o con formaciones de precipitados, lo cual resulta absolutamente desfavorable para su empleo.

A diferencia de la técnica analítica desarrollada en nuestro estudio para la determinación de aminoácidos, la cual se basa en generar la reacción de aminoácidos con ninhidrina en un tubo de ensayo bajo ciertas condiciones analíticas, con posterior detección mediante un equipo de espectrofotometría UV/VIS, Standara, S. *et al.* (1999) utiliza un analizador automático de aminoácidos para efectuar la cuantificación. En la siguiente sección se dará lugar a explicar brevemente el funcionamiento de este equipo analítico.

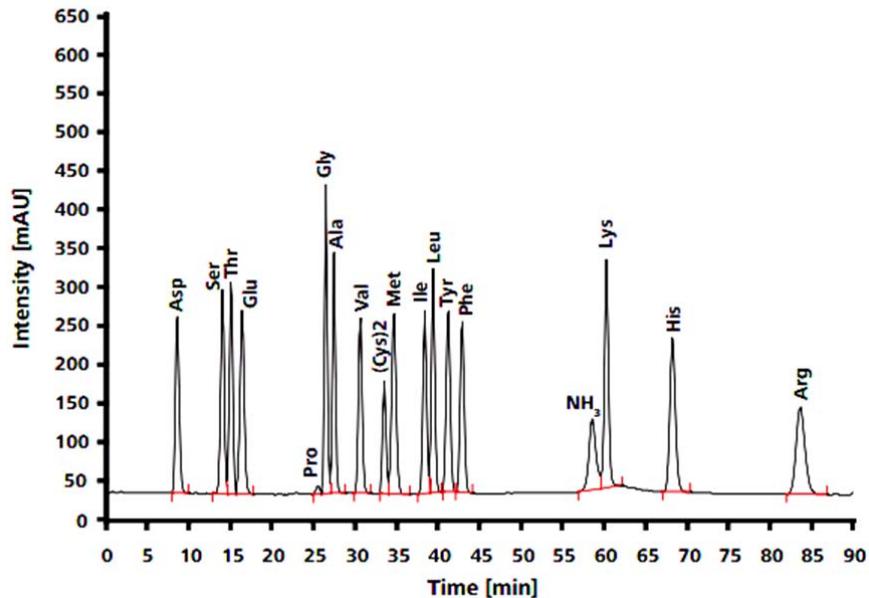
### **5.5 Analizador automático de aminoácidos**

Un analizador automático de aminoácidos utiliza el método clásico de análisis de aminoácidos basado en cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna con ninhidrina y detección fotométrica, permitiendo el análisis de aminoácidos y de sus cantidades en el caso de hidrolizados de proteínas o péptidos, aminoácidos libres en soluciones y extractos, y para aminas biogénicas. La **Figura 5** enseña una representación de los componentes principales de este instrumental. Explicado sencillamente, primero se colocan el/los buffer/s requeridos para conseguir la separación de los aminoácidos en la columna de intercambio iónico. La bomba permite controlar el flujo del eluyente y así poder generar distintos gradientes de presión con el fin de lograr una óptima separación de los analitos dentro de la columna. Una vez establecidos estos parámetros, se inyecta la solución muestra en el equipo. A medida que los aminoácidos salen de la columna, se los hace reaccionar con el reactivo de ninhidrina en una cámara de mezcla. Seguidamente, los cromóforos formados se detectan en un espectrofotómetro y las señales de absorbancia obtenidas se registran en un ordenador. En La **Figura 6** se muestra un ejemplo de un cromatograma obtenido bajo condiciones cromatográficas específicas. Estos instrumentos además pueden estar equipados con un sistema de gradiente y desgasificador para varios canales de eluyentes, sistema de refrigeración de muestras, horno con termostato para mantener la temperatura de la columna constante, depósito de nitrógeno gaseoso para conservar el sistema bajo atmósfera de gas inerte y evitar oxidaciones, entre otros. Todas estas condiciones lo convierten en un equipo de elevada sensibilidad de detección mediante métodos

cromatográficos robustos y exactos, lo que contribuye a lograr una muy buena reproducibilidad entre los análisis.



**Figura 5.** Esquema de un analizador automático de aminoácidos. (1) depósito de soluciones eluyentes; (2) bomba; (3) columna de intercambio iónico; (4) depósito de ninhidrina; (5) cámara de mezcla del efluente y el reactivo; (6) fotómetro para medir la absorbancia del color púrpura-azul formado; (7) registro de la absorbancia (figura obtenida de Primo Yúfera, E. (1995))



**Figura 6.** Cromatograma obtenido por medio de un analizador automático de aminoácidos. Condiciones cromatográficas: aminoácidos (0,5 mmol/L; 18 componentes); columna: Metrosep Amino Acids 1 - 100/4.0; eluyente: gradiente de citrato de litio similar a USP <1052> (Método 1), 0,4 mL/min, 60 °C; reacción post-columna: reactivo de ninhidrina, 0,2 mL/min, 120 °C; detección: longitud de onda 570 nm (figura y descripción obtenida de Metrohm AG (2013))

## 5.6 Validación del método analítico para la determinación de aminoácidos en suplementos dietarios

El objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado. A continuación se describen las características típicas que se incluyen en la validación.

- Linealidad: es la capacidad que tiene un método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en un rango determinado.
- Precisión: es el grado de concordancia entre resultados de mediciones obtenidas independientemente, adquiridas por medio el mismo método analítico, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumental y durante un corto intervalo de tiempo. Suele expresarse en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados de las mediciones. No guarda ninguna relación con el “valor real” o valor de referencia aceptado.
- Exactitud: es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado del analito. La exactitud de un resultado individual puede estar afectada por errores aleatorios y sistemáticos. La exactitud de un resultado promedio también tiene contribuciones de ambas fuentes de error: incluso si los errores sistemáticos están ausentes, el resultado promedio probablemente no será exactamente igual al valor de referencia, debido a la existencia de errores aleatorios.
- Límite de detección (LOD): el límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo”. De esta forma, se define el LOD como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

$$LOD = y_B + 3S_B$$

Siendo  $y_B$  la señal del blanco, lo que es igual al valor de la ordenada al origen ( $b$ ) obtenida de la recta de regresión, y  $S_B$  la desviación estándar del blanco, que se refiere al estadístico  $S_{y/x}$ , el cual estima los errores aleatorios en la dirección y del gráfico de calibración.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Esta ecuación utiliza los residuos de  $y$ ,  $y_i - \hat{y}_i$ , donde los valores de  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de  $x$ , es decir, los valores de  $y$  "ajustados". El valor de  $\hat{y}_i$  para un valor de  $x$  dado se obtiene fácilmente a partir de la ecuación de regresión. En un cálculo de regresión lineal el número de grados de libertad es  $(n - 2)$ , donde  $n$  es el total de puntos que se utilizan para calcular la recta de regresión.

- Límite de cuantificación (LOQ): también llamado límite de determinación, es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas, como opuesto a la detección cualitativa. Se sugiere un valor de la señal del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco (Miller, N. J. *et al.*, 2002)

$$LOQ = y_B + 10S_B$$

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Muestras de suplementos dietarios analizadas:

Se seleccionaron tres marcas comerciales de suplementos dietarios de BCAA producidos y comercializados actualmente en la Argentina. Por confidencialidad no se mencionarán marcas, números de lote, ni cualquier dato que conlleve al reconocimiento de la marca comercial que fabrica los productos analizados, por lo que se los llamará indistintamente como suplemento dietario “SD1”, “SD2” y “SD3”.

### 6.2 Equipos y materiales:

- Espectrofotómetro UV-Visible, marca Shimadzu, modelo UV-1700 Pharmaspec.
- Balanza analítica, marca Shimadzu, modelo AUW 220D, N° Serie: D450012244.
- pH-metro, marca Hanna Instruments, modelo pH 211.
- Agitador Vortex, marca D-Lab, modelo MX-S Modo Continuo o Touch, N° Serie: VB4B017519.
- Agitador magnético, marca D-Lab, modelo MS-H-Pro con calefacción, N° Serie: MA 36005P35.
- Nebulizador con compresor a pistón “Plus”, marca SAN-UP, modelo 3041.
- Lavador ultrasónico, marca Branson, modelo 3510E-MHT.
- Purificador de agua destilada, marca Simplicity, modelo Millipore, N° Serie: F8MN13143D.
- Estufa de secado, marca “SAN JOR”, modelo SL60SDB.
- Secador de cabello, marca GA.MA, modelo Pro 2000.
- Micropipetas Eppendorf Research® plus de 200, 1000 y 5000 µL
- Micropipeta Socorex Swiss Acura® manual 815 de 1000 µL.
- Cilindro con gas Nitrógeno.
- Placas de aluminio TLC de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>, marca EMD Chemicals Inc.
- Tubos capilares para TLC.
- Tubos de cultivo sin reborde de 16 x 150 mm, marca IVA.
- Tubos Eppendorf de 2 mL.
- Gradillas para tubos de cultivo.
- Cubetas de vidrio para espectrofotómetro UV-Vis.
- Material volumétrico de vidrio: matraces y buretas, marca IVA.
- Cristalizadores, marca IVA.

### **6.3 Reactivos:**

- L-leucina, título 99,0%, Parafarm, Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A.
- L-isoleucina, título 99,0%, Parafarm, Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A.
- L-valina, título 99,6%, Parafarm, Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A.
- Ninhidrina p.a. (A.C.S.), Biopack. Lote 7882015.
- Agua destilada MilliQ (filtro Millipore de 0,45 mm).
- Ácido acético glacial, 99,5 – 100,5%, Carlo Erba Reagents S.A.S. Lote P5G01414SI.
- Metilenglicol (Cellosolve)/etilenglicol monometileter para análisis/2-metoxietanol, DORWIL S.A. Lote N° B 17245.
- Borohidruro de sodio, Fisher Scientific. Lote 007093.
- Hidróxido de sodio, Anedra. Lote 18259-1.
- Alcohol etílico absoluto anhidro 99,95%, J.T. Baker. Lote P13C59.
- Ácido clorhídrico ACS Reagent 37,3%, J. T. Baker. CAS No: 7674-01-0.
- 2-butanona 99,5%, Sigma-Aldrich. Lote 40304013.
- Piridina (Reag. Ph. Eur.) PA-ACS, Panreac. Lote 0000297641.
- 1-butanol 99,90% ACS, J. T. Baker.

### **6.4 Preparación de soluciones**

#### **6.4.1 Reactivo de ninhidrina**

Preparación de solución buffer acetato de sodio 4 M (pH 5,5):

Se tomaron 114,9 mL de ácido acético glacial y se llevaron a 500 mL con agua destilada luego de ajustar el pH a 5,5 mediante la adición de hidróxido de sodio.

Preparación del reactivo de ninhidrina:

La solución fue preparada bajo atmósfera de nitrógeno en frasco color caramelo sobre un agitador magnético con agitación continua. Primeramente se removió el oxígeno del frasco al burbujear durante 5 minutos con nitrógeno. Se añadieron 150 mL de metilenglicol (Cellosolve) y se burbujeo durante 20 minutos con nitrógeno. El próximo paso consistió en colocar simultáneamente 3 g de ninhidrina p.a. (A.C.S.) y 12 mg de borohidruro de sodio, los cuales se disolvieron bajo continuo burbujeo con nitrógeno. El color de la solución cambia de amarillo a rojo luego de la adición de borohidruro de sodio. Se continuó agitando la solución mediante agitador magnético por 30 minutos, bajo continuo burbujeo con nitrógeno. Se burbujearon previamente con nitrógeno 50 mL de buffer acetato 4 M (pH 5,5) durante 10 minutos y se adicionaron a la solución anterior (la solución se torna color púrpura). Se burbujeo con nitrógeno la solución final para remover cualquier resto de oxígeno.

#### **6.4.2 Soluciones para TLC:**

- ✓ Soluciones estándar para TLC de L-Leu, L-Ile y L-Val

Se pesaron 0,1 mg de cada aminoácido en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad y se disolvieron en 2 mL de HCl 0,1 N.

- ✓ Soluciones muestra para TLC de SD1, SD2 y SD3

Se pesaron 12 mg de cada muestra en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad y se disolvieron en 2 mL de HCL 0,1 N.

- ✓ Solución reveladora de ninhidrina para TLC

Se preparó una solución de concentración 2 mg de ninhidrina/mL en una mezcla de 1-butanol y ácido acético glacial 2 N (95:5)

#### **6.4.3 Soluciones madre de aminoácidos**

- ✓ Solución madre de L-Leu:

Se pesaron 8,45 mg de L-Leu en un tubo Eppendorf de 2 mL de capacidad y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Se tomó 1 mL de esta solución y se llevó a 25 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniéndose la solución madre de L-Leu.

- ✓ Solución madre de L-Ile:

Se pesaron 8,31 mg de L-Ile en un tubo Eppendorf de 2 mL de capacidad y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Se tomó 1 mL de esta solución y se llevó a 25 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniéndose la solución madre de L-Ile.

- ✓ Solución madre de L-Val:

Se pesaron 8,23 mg de L-Val en un tubo Eppendorf de 2 mL de capacidad y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Se tomó 1 mL de esta solución y se llevó a 25 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniéndose la solución madre de L-Val.

#### **6.5 Confección de las curvas de calibración**

Se pipetearon en diferentes tubos numerados 35 µL – 71 µL – 141 µL – 211 µL – 282 µL de la solución madre del aminoácido a utilizar. Respectivamente se añadieron 965 µL – 929 µL – 859 µL – 789 µL – 718 µL de agua destilada. Se adicionaron 1000 µL de agua destilada a otro tubo vacío, correspondiente al blanco de reactivos. Se agregaron 2667 µL de la solución Reactivo

de Ninhidrina a todos los tubos y se burbujearon con nitrógeno para eliminar el oxígeno. Seguidamente se taparon los tubos con papel aluminio y se sometieron a baño maría en un cristizador a 85 °C durante 20 minutos. Transcurrido dicho tiempo, los tubos se dispusieron en un cristizador con baño de agua fría y a cada uno se añadió etanol al 50 % V/V de manera que el volumen final sea de 8 mL. Los tubos se sometieron a agitación en un Vortex y se les registró la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 570 nm. Los tubos fueron recubiertos con papel aluminio antes de iniciar el ensayo para que se encuentren protegidos de la luz.

Con los valores de absorbancia obtenidos y conociendo sus respectivas concentraciones teóricas de aminoácido para cada tubo medido, se efectuó un gráfico de dispersión donde se calcula su respectiva línea de tendencia con la finalidad de obtener la ecuación de la recta y su correspondiente valor del coeficiente de correlación,  $R^2$ .

La ecuación de una recta se representa de la forma  $y = m x + b$ , donde “ $x$ ” e “ $y$ ” son variables en un plano cartesiano. En dicha expresión “ $m$ ” es denominada la pendiente de la recta, relacionada con la inclinación que toma la recta respecto al par de ejes que define el plano. Mientras que “ $b$ ” es el denominado término independiente u ordenada al origen y es el valor del punto en el cual la recta corta al eje vertical en el plano. En nuestro plano cartesiano, al eje horizontal o de las abscisas se le asignaron los números de las equis (“ $x$ ”), pertenecientes a los valores de concentraciones teóricas iniciales de aminoácido preparadas para los diferentes tubos. Al eje vertical o de las ordenadas se le asignaron los números de las yes (“ $y$ ”), correspondientes a los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría para los distintos tubos y sus distintas concentraciones.

Conociendo la ecuación que describa nuestra recta, luego se podrá reemplazar el valor de absorbancia que arroje una muestra al ser preparada y medida en las mismas condiciones experimentales que los estándares de los aminoácidos, para finalmente obtener su concentración experimental inicial.

## **6.6 Determinación del contenido de aminoácidos totales mediante espectrofotometría UV/VIS**

### **6.6.1 Preparación y cuantificación de muestras:**

Para la muestra SD1 se registraron los pesos de 10 cápsulas, luego se vació el contenido de cada una de ellas y se anotó el peso total de las cápsulas vacías. Se realizó una mezcla del contenido de las cápsulas y se pesaron 14,57 mg para ser disueltos en agua destilada y llevados a 50 mL. Se tomaron 141  $\mu$ L de esta solución y se colocaron en un tubo de cultivo protegido de la luz. Posteriormente se agregaron 859  $\mu$ L de agua destilada y 2667  $\mu$ L de la

solución Reactivo de Ninhidrina. El tubo se burbujeó con nitrógeno para eliminar el oxígeno. Seguidamente se taparon los tubos con papel aluminio y se ubicaron en un cristizador con baño maría a 85 °C durante 20 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se dispuso el tubo en un cristizador con baño de agua fría y se añadió etanol al 50 % v/v de manera que el volumen final sea de 8 mL. El tubo fue agitado en Vortex y se registró su absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS medida a 570 nm de longitud de onda. La preparación del tubo de la muestra se realizó por duplicado.

Se realizó el mismo procedimiento anterior para las muestras SD2 y SD3, difiriendo del peso del contenido de las cápsulas que se tomó para cada muestra, siendo 21,11 mg y 10,98 mg, respectivamente. Los tubos de las muestras se prepararon por duplicado.

Es importante que los ensayos de preparación y cuantificación de muestras se realicen junto con la confección de las curvas de calibración, para lograr mantener las mismas condiciones experimentales.

El valor de absorbancia obtenido de cada muestra se introdujo en la ecuación de la recta de calibración correspondiente para cada aminoácido como nuestro valor de “y”, pudiendo despejarse así la variable “x”, donde se obtiene la concentración experimental de la muestra al momento de la medición. Para conocer el valor de concentración inicial que tenía la muestra, se debe multiplicar el resultado por el factor de dilución de la muestra. Una vez obtenida esta concentración, podemos calcular la masa de aminoácidos totales, expresados como L-Leu, L-Ile o L-Val (según en cuál curva introduzcamos nuestros resultados de absorbancia) contenidos en la masa de muestra que se pesó inicialmente (ver el apartado “Cálculos” en la **Sección 7.1.2.1**)

#### **6.6.2 Validación del método analítico:**

Se llevó a cabo la validación del método espectrofotométrico para cuantificar BCAA totales, según las normas establecidas por el Comité Internacional de Armonización (ICH). Se validaron los siguientes criterios: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación (la explicación teórica se detalla en la **Sección 5.6** y los resultados analíticos en la **Sección 7.1.1**)

#### **6.7 Identificación de leucina, isoleucina y valina por TLC**

Para la realización de la TLC se emplearon placas de aluminio para TLC de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> y se utilizó, como fase móvil, una mezcla de 2-butanona : piridina : agua : ácido acético glacial, en proporción 73 : 15 : 15 : 2, respectivamente.

Se sembraron por separado 5  $\mu$ L de las soluciones estándar para TLC de L-Leu, L-Ile y L-Val en una placa de gel de sílice, y 5  $\mu$ L de las soluciones muestra para TLC de SD1, SD2 y SD3. En cada siembra de la placa se quitó el exceso de solvente empleando un secador de cabello, con la intención de evitar que la muestra difunda por la línea de siembra.

Se colocó la placa en una cuba de vidrio previamente saturada con los vapores de los solventes de la fase móvil (20 min aproximadamente). Este paso previo es muy importante ya que si la cuba no está debidamente saturada, los solventes, en vez de ascender por capilaridad continuamente por la placa, tenderán a evaporarse de la misma para equilibrar al líquido con su presión de vapor, lo que implica un ascenso no homogéneo del frente de solvente con un consecuente ascenso irregular del analito. Con el fin de asegurar la saturación de la cuba se adicionó papel de filtro embebido con fase móvil a las paredes de la cuba.

La placa se dejó correr hasta aproximadamente 1 cm antes de que el frente de solvente llegue al extremo superior de la misma, y se marcó esta línea con un lápiz para posteriormente poder calcular el Ratio of Front (Rf) de los compuestos.

Se dejó evaporar el solvente de la placa a temperatura ambiente y se reveló con solución reveladora de ninhidrina utilizando un nebulizador. Enseguida se sometió la placa a una temperatura entre 100-105 °C en una estufa, no más de 5 min. Al calentarse la placa se produce la reacción entre los aminoácidos y la ninhidrina, dando como resultado manchas de color azul-violáceo, a las cuales se les calculó su Rf para poder determinar si los aminoácidos de las muestras se corresponden con los distintos aminoácidos estándar conocidos.

### **6.8 Separación y cuantificación de leucina, isoleucina y valina mediante TLC y espectrofotometría UV/VIS**

En otra placa para TLC se sembraron 5  $\mu$ L (medidos con pipeta automática) de las tres soluciones muestra para TLC de SD1, SD2 y SD3. En el margen derecho de la misma se sembraron otros 5  $\mu$ L de una de estas soluciones muestra. Se procedió a correr la placa respetando las mismas condiciones cromatográficas anteriores. Antes de aplicar la solución reveladora de ninhidrina, se cubrió con papel film toda la placa exceptuando la zona del margen derecho, donde anteriormente sembramos una de las tres soluciones muestra. A la zona pulverizada con revelador se le aplicó calor con un secador de cabello hasta observar la aparición de las manchas azul-violáceas. Con la ayuda de una regla, se trazaron sobre toda la placa líneas horizontales sobre los límites superior e inferior de las manchas. Se recortó cuidadosamente, tratando de que la sílice no se desprenda, los recuadros delimitados por las líneas antes trazadas, los cuales contienen los aminoácidos L-Leu, L-Ile y L-Val sin revelar para cada muestra. Cada fragmento recortado de la placa se colocó en un tubo de cultivo, se añadieron 1200  $\mu$ L de agua destilada a cada tubo y se introdujeron en un baño de ultrasonido

hasta lograr que toda la sílica se desprenda de la placa metálica. Los tubos fueron centrifugados y de cada uno se tomaron 1000  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se colocaron en otros tubos de cultivo, donde se prosiguió con el protocolo antes descrito para la determinación del contenido de aminoácidos totales, partiendo desde la adición de 2667  $\mu\text{L}$  de solución Reactivo Ninhidrina hasta la cuantificación espectrofotométrica, utilizando las curvas de calibración correspondientes para cada aminoácido. Para validar esta técnica separativa por TLC se evaluó la exactitud de la misma a través del cálculo de los niveles de recuperación de los aminoácidos sembrados, empleando nuestra técnica espectrofotométrica.

## 7. Resultados

### 7.1 Determinación del contenido de aminoácidos totales

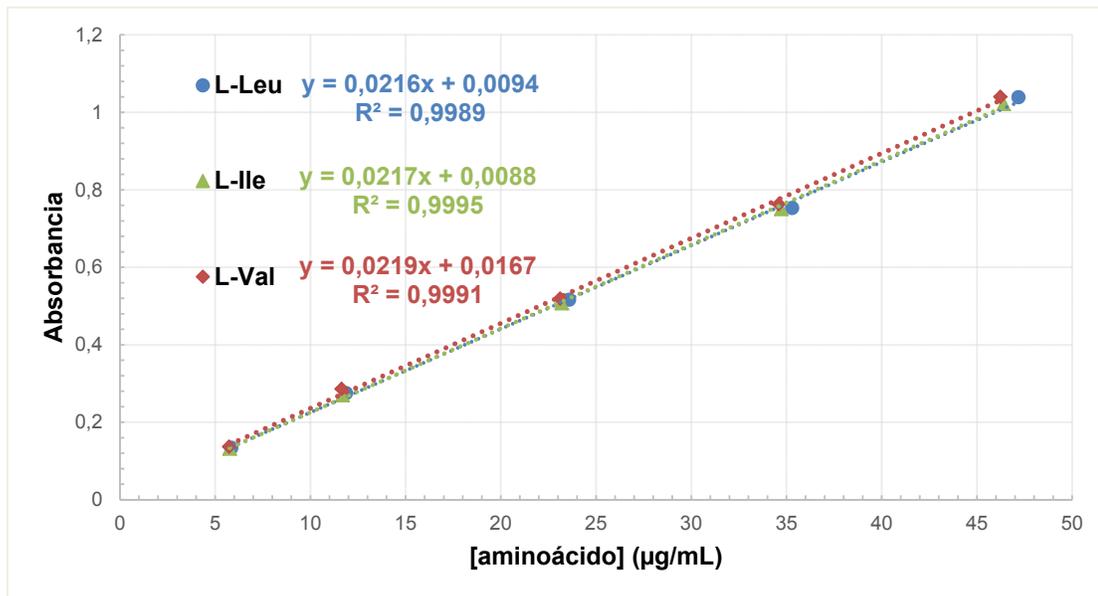
#### 7.1.1 Validación del método analítico

Los suplementos dietarios de BCAA fueron analizados mediante el método espectrofotométrico anteriormente descrito para la determinación del contenido de aminoácidos (ver **Sección 6.6.1**), el cual fue validado de la siguiente manera.

**Linealidad:** con el propósito de comprobar que la intensidad de señal es linealmente proporcional a la concentración del analito, se estudió la relación entre ambos factores en el rango de interés analítico. Para ello se prepararon por separado cinco muestras de L-Leu, L-Ile y L-Val, con un intervalo de concentraciones que van desde los 5 a 47 µg/mL. Las muestras fueron tratadas como se describe en la **Sección 6.5**. En la **Figura 7** se muestran las curvas de calibración para los distintos aminoácidos, acompañado de sus respectivos valores de concentraciones y absorbancias en la **Tabla 2**. La regresión lineal de los puntos experimentales arroja un coeficiente de correlación,  $R^2$ , de 0,9989 para L-Leu, 0,9995 para L-Ile y 0,9991 para L-Val.

[L-Leu] (µg/mL)	Absorbancia $\lambda = 570 \text{ nm}$	[L-Ile] (µg/mL)	Absorbancia $\lambda = 570 \text{ nm}$	[L-Val] (µg/mL)	Absorbancia $\lambda = 570 \text{ nm}$
5,856	0,134	5,759	0,132	5,739	0,137
11,879	0,275	11,682	0,270	11,641	0,286
23,591	0,516	23,200	0,507	23,118	0,519
35,302	0,753	34,718	0,750	34,595	0,763
47,181	1,039	46,400	1,022	46,236	1,040

**Tabla 2.** Valores de absorbancia obtenidos a partir de las distintas concentraciones para cada aminoácido.



**Figura 7.** Curvas de calibración para los aminoácidos L-Leu, L-Ile y L-Val, mostrando sus respectivas ecuaciones de las rectas y coeficientes de correlación.

**Precisión:** para determinar la precisión del método, se prepararon por triplicado tres soluciones estándar de L-Leu, L-Ile y L-Val de igual concentración, siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 6.5**. Se realizó el cálculo del coeficiente de variación o desviación estándar relativa (relative standard deviation o RSD) sobre las absorbancias obtenidas de los triplicados de las tres soluciones de cada aminoácido y se obtuvo un valor < 0,50% en todos los casos.

**Exactitud:** para calcular la exactitud se valoraron por triplicado muestras de estándares de L-Leu, L-Ile y L-Val, con concentraciones promedio de 23,502 µg/mL, 23,280 µg/mL y 23,120 µg/mL, respectivamente, siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 6.6.1**. Cada aminoácido se valoró frente a su respectiva curva de calibración y se obtuvieron niveles de recuperación mayores a 99,5% en todos los casos.

**Límite de detección (LOD):** se calculó el límite de detección a partir de la curva de calibración y su respectiva recta de regresión para los tres aminoácidos, obteniéndose las siguientes concentraciones para un número de grados de libertad igual a 3: 1,41 µg/mL para L-Leu, 1,33 µg/mL para L-Ile, y 1,45 µg/mL para L-Val.

**Límite de cuantificación (LOQ):** siguiendo el mismo principio se calculó el límite de cuantificación y se obtuvieron las siguientes concentraciones: 4,69 µg/mL para L-Leu, 4,44 µg/mL para L-Ile, y 4,82 µg/mL para L-Val.

**7.1.2 Muestras analizadas y resultados del contenido total de aminoácidos**

A continuación se describen las muestras de suplementos dietarios analizados incluyendo su correspondiente información nutricional, ingredientes declarados y recomendaciones de uso, tal como figura en sus etiquetas. Seguido a cada descripción se exponen los resultados obtenidos para cada muestra a partir de los ensayos de análisis del contenido total de aminoácidos calculados como contenido de L-Leu, L-Ile y L-Val, y como contenido promedio de los mismos. Al final, en la **Figura 8**, se representan los resultados del contenido de BCAA de los suplementos dietarios indicado como porcentaje del valor declarado.

**7.1.2.1 Suplemento dietario de BCAA N° 1 (SD1)**

Información de la etiqueta:

<b>Descripción del producto:</b>	<i>Suplemento dietario a base de L-leucina, L-valina, L-isoleucina y biotina.</i>
<b>Contenido Neto:</b>	<i>120 cápsulas.</i>
<b>Forma de uso sugerido:</b>	<i>Tomar 4 cápsulas diarias; para mejores resultados tomar 2 cápsulas 45 a 60 minutos antes de entrenar y otras 2 cápsulas 15 a 30 minutos después del entrenamiento.</i>

Información nutricional

<i>Porción: 1656 mg (4 cápsulas)</i>		
<i>Porciones por envase: 30</i>		
	<i>Por porción</i>	<i>% IDR*</i>
<i>Biotina</i>	<i>15 µg</i>	<i>50</i>
<i>L-leucina</i>	<i>466,8 mg</i>	<i>**</i>
<i>L-valina</i>	<i>466,8 mg</i>	<i>**</i>
<i>L-isoleucina</i>	<i>68 mg</i>	<i>**</i>
<i>No aporta cantidades significativas de Calorías, Proteínas, Grasas totales, Grasas saturadas, Grasas trans, Fibra alimentaria, Sodio. *Valores diarios en base a una dieta de 2000 kcal u 8400 kJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas. **no establecido. IDR: Ingesta diaria recomendada.</i>		

*Ingredientes: L-leucina, L-valina, L-isoleucina, Biotina, Gelatina. Antihumectante: Estearato de Magnesio.*

Composición teórica:

Aminoácidos	Composición teórica (Porción: 4 cápsulas = 1656 mg)
L-Leu (mg)	466,8
L-Val (mg)	466,8
L-Ile (mg)	68,0
TOTAL (mg)	1001,6

Datos obtenidos del pesaje de las cápsulas:

Pesos cápsulas (mg)	376,23
	430,47
	412,53
	337,93
	370,24
	374,34
	423,14
	376,98
	398,56
	393,96
Peso promedio de cápsulas (mg)	389,44
Peso promedio de cápsulas vacías (mg)	101,01
Peso promedio del contenido por cápsula (mg)	288,42
Peso promedio del contenido por porción (mg)	1153,70

Resultados: (ver en siguiente página)

Bracco, Malco F. B. |  
**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ )	RSD (%)	Contenido (mg L-Leu/g muestra)	Contenido (mg L-Leu/porción)	Contenido promedio (mg L-Leu/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,760	0,76	845,8	975,7	<b>970,5 ± 50,1</b>	<b>96,9 ± 5,0</b>
2	0,752		836,7	965,3		

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ )	RSD (%)	Contenido (mg L-Ile/g muestra)	Contenido (mg L-Ile/porción)	Contenido promedio (mg L-Ile/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,760	0,76	842,5	972,0	<b>966,9 ± 35,3</b>	<b>96,5 ± 3,5</b>
2	0,752		833,6	961,7		

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ )	RSD (%)	Contenido (mg L-Val/g muestra)	Contenido (mg L-Val/porción)	Contenido promedio (mg L-Val/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,760	0,76	826,1	953,0	<b>947,9 ± 46,2</b>	<b>94,6 ± 4,6</b>
2	0,752		817,2	942,8		

Contenido del valor declarado de AA por porción		Contenido promedio	RSD
<i>Calculado como L-Leu</i>	<b>96,9 ± 5,0 %</b>	<b>96,0 ± 4,4 %</b>	1,26%
<i>Calculado como L-Ile</i>	<b>96,5 ± 3,5 %</b>		
<i>Calculado como L-Val</i>	<b>94,6 ± 4,6 %</b>		

Cálculos:

$$\text{Contenido (mg aminoácido/porción)} = \frac{\text{absorbancia}_{\text{muestra}} - b}{m \cdot 1000 \left( \frac{\text{mL}}{\text{mg}} \right)} \frac{f_{\text{dil}}}{P_m \text{ (g)}} \frac{PP}{1000} \text{ (g)}$$

Donde:

*absorbancia<sub>muestra</sub>*: valor de absorbancia arrojado por la muestra, medido a una longitud de onda de 570 nm;

*b*: ordenada al origen correspondiente a la curva de calibración del aminoácido correspondiente;

*m*: pendiente obtenida de la curva de calibración del aminoácido correspondiente, en unidades de mL/μg;

*F<sub>dil</sub>*: factor de dilución de la muestra;

*P<sub>m</sub>*: peso de la muestra en gramos;

*PP*: peso promedio de comprimidos (o del contenido, en el caso de cápsulas) por porción, en miligramos.

$$\text{Contenido promedio del valor declarado por porción (\%)} = \frac{\text{Contenido promedio (mg aminoácido/porción)}}{CT_{aa} \text{ (mg/porción)}} \times 100$$

Donde:

*CT<sub>aa</sub>*: composición teórica declarada del total de aminoácidos en miligramos por porción.

**7.1.2.2 Suplemento dietario de BCAA N° 2 (SD2)**

Información de la etiqueta:

<b>Descripción del producto:</b>	Suplemento dietario a base de L-leucina, L-valina y L-isoleucina.
<b>Contenido Neto:</b>	120 comprimidos de 1 g.
<b>Forma de uso sugerido:</b>	2 comprimidos 2 veces por día.

*Información nutricional*

<i>Porción: 4 g (4 unidades)</i>		
	<i>Cantidad por porción</i>	<i>% VD*</i>
<i>Valor calórico</i>	<i>0 kcal = 0 kj</i>	<i>0</i>
<i>Carbohidratos</i>	<i>0 g</i>	<i>0</i>
<i>Proteínas</i>	<i>0 g</i>	<i>0</i>
<i>Grasas totales</i>	<i>0 g</i>	<i>0</i>
<i>Grasas saturadas</i>	<i>0 g</i>	<i>0</i>
<i>Grasas trans</i>	<i>0 g</i>	<i>0</i>
<i>Fibra alimentaria</i>	<i>0 g</i>	<i>0</i>
<i>Sodio</i>	<i>0 mg</i>	<i>0</i>
<i>% VD (*) Valores diarios en base a una dieta de 2000 kcal u 8400 kJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energéticas.</i>		

<i>L-leucina</i>	<i>840 mg</i>	<i>100</i>
<i>L-valina</i>	<i>600 mg</i>	<i>100</i>
<i>L-isoleucina</i>	<i>600 mg</i>	<i>100</i>

*Ingredientes: L-leucina, L-valina, L-isoleucina, Humectante (INS 420), Estabilizantes (INS 460i, 1201, 468), Antiaglutinantes (INS 551 y 470i)*

Composición teórica:

Aminoácidos	Composición teórica (Porción: 4 Comp. = 4000 mg)
L-Leu (mg)	840
L-Val (mg)	600
L-Ile (mg)	600
TOTAL (mg)	2040

Datos obtenidos del pesaje de los comprimidos:

Pesos comprimidos (mg)	1034,22
	1020,90
	1019,86
	1046,72
	1037,58
	1036,67
	1015,90
	1030,00
	1014,40
	1003,82
	1034,67
	1019,55
	1024,72
	1023,94
	1056,02
Peso promedio comprimidos (mg)	1028,90
Peso promedio de comprimidos por porción (mg)	4115,59

Resultados: (ver en página siguiente)

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570$ nm)	RSD (%)	Contenido (mg L-Leu/g muestra)	Contenido (mg L-Leu/porción)	Contenido promedio (mg L-Leu/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,678	1,16	520,0	2140,0	<b>2122,4 <math>\pm</math> 119,1</b>	<b>104,0 <math>\pm</math> 5,8</b>
2	0,667		511,4	2104,8		

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570$ nm)	RSD (%)	Contenido (mg L-Ile/g muestra)	Contenido (mg L-Ile/porción)	Contenido promedio (mg L-Ile/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,678	1,16	518,0	2132,0	<b>2114,5 <math>\pm</math> 83,6</b>	<b>103,7 <math>\pm</math> 4,1</b>
2	0,667		509,5	2097,0		

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570$ nm)	RSD (%)	Contenido (mg L-Val/g muestra)	Contenido (mg L-Val/porción)	Contenido promedio (mg L-Val/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,678	1,16	507,2	2087,6	<b>2070,2 <math>\pm</math> 109,9</b>	<b>101,5 <math>\pm</math> 5,4</b>
2	0,667		498,8	2052,9		

Contenido del valor declarado de AA por porción		Contenido promedio	RSD
<i>Calculado como L-Leu</i>	<b>104,0 <math>\pm</math> 5,8 %</b>	<b>103,1 <math>\pm</math> 5,1 %</b>	1,34%
<i>Calculado como L-Ile</i>	<b>103,7 <math>\pm</math> 4,1 %</b>		
<i>Calculado como L-Val</i>	<b>101,5 <math>\pm</math> 5,4 %</b>		

Cálculos: ídem SD1

**7.1.2.3 Suplemento dietario de BCAA N° 3 (SD3)**

Información de la etiqueta:

<b>Descripción del producto:</b>	<i>Suplemento dietario a base de L-leucina, L-isoleucina y L-valina.</i>
<b>Contenido Neto:</b>	<i>90 cápsulas de 706 mg c/u.</i>
<b>Forma de uso sugerido:</b>	<i>3 cápsulas diarias 30 minutos después del entrenamiento.</i>

*Información nutricional:*

<i>Porción: 3 cápsulas (ingesta diaria)</i>		
<i>Ingestas por envase: 30</i>		
	<i>Cantidad por porción</i>	<i>% IDR</i>
<i>Valor energético</i>	<i>8 kcal = 33 kj</i>	<i>*</i>
<i>L-leucina</i>	<i>900 mg</i>	<i>*</i>
<i>L-valina</i>	<i>450 mg</i>	<i>*</i>
<i>L-isoleucina</i>	<i>450 mg</i>	<i>*</i>
<i>* % IDR no establecido. Porcentajes de ingesta diaria recomendada basados en una dieta de 2000 calorías.</i>		

*Ingredientes: L-leucina, L-valina, L-isoleucina, INS 460i (EST), INS 470 (ANAH)*

Composición teórica:

Aminoácidos	Composición teórica (Porción: 3 cápsulas = 2118 mg)
L-Leu (mg)	900
L-Val (mg)	450
L-Ile (mg)	450
TOTAL (mg)	1800

Datos obtenidos del pesaje de las cápsulas:

Pesos cápsulas (mg)	823,06
	823,08
	830,80
	832,40
	832,64
	830,10
	829,37
	832,80
	832,11
	834,72
	836,80
	830,09
	830,27
	824,49
833,80	
Peso cápsulas promedio (mg)	830,44
Peso promedio cápsulas vacías (mg)	125,53
Peso promedio del contenido por cápsula (mg)	704,90
Peso promedio del contenido por porción (mg)	2114,71

Resultados: (ver en siguiente página)

**Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios**

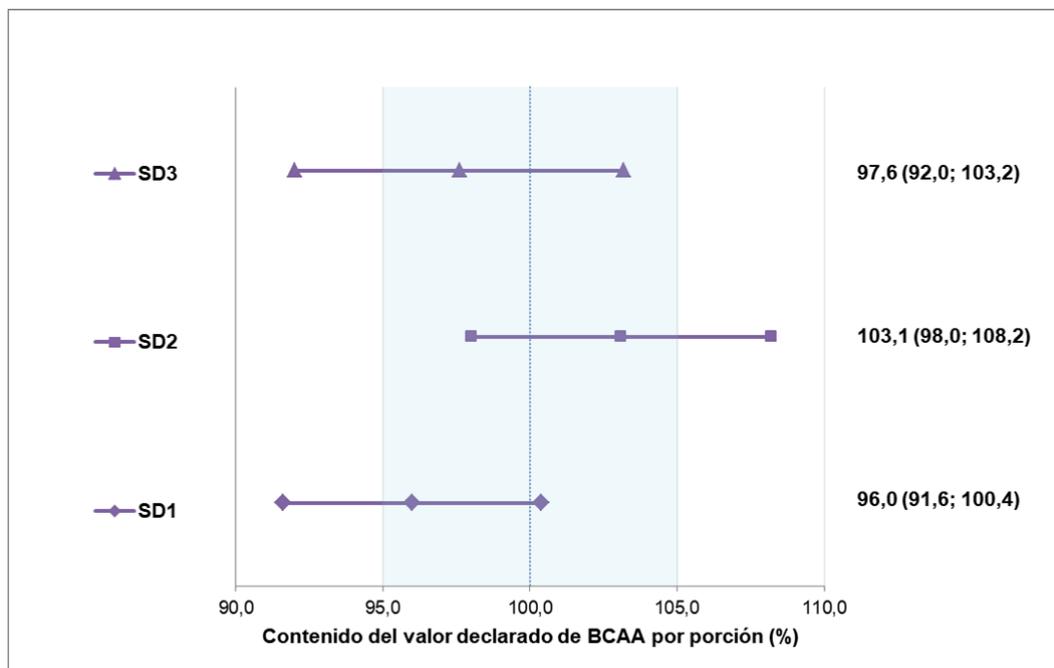
Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570$ nm)	RSD (%)	Contenido (mg L-Leu/g muestra)	Contenido (mg L-Leu/porción)	Contenido promedio (mg L-Leu/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,566	1,12	832,2	1759,9	<b>1774,1 <math>\pm</math> 115,2</b>	<b>98,6 <math>\pm</math> 6,4</b>
2	0,575		845,7	1788,4		

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570$ nm)	RSD (%)	Contenido (mg L-Ile/g muestra)	Contenido (mg L-Ile/porción)	Contenido promedio (mg L-Ile/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,566	1,12	829,3	1753,7	<b>1767,8 <math>\pm</math> 80,7</b>	<b>98,2 <math>\pm</math> 4,5</b>
2	0,575		842,7	1782,0		

Tubo	Absorbancia ( $\lambda = 570$ nm)	RSD (%)	Contenido (mg L-Val/g muestra)	Contenido (mg L-Val/porción)	Contenido promedio (mg L-Val/porción)	Contenido del valor declarado de AA por porción (%)
1	0,566	1,12	810,1	1713,0	<b>1727,1 <math>\pm</math> 106,4</b>	<b>95,9 <math>\pm</math> 5,9</b>
2	0,575		823,3	1741,1		

Contenido del valor declarado de AA por porción	Contenido promedio	RSD
<i>Calculado como L-Leu</i>	<b>98,6 <math>\pm</math> 6,4</b>	1,45%
<i>Calculado como L-Ile</i>	<b>98,2 <math>\pm</math> 4,5</b>	
<i>Calculado como L-Val</i>	<b>95,9 <math>\pm</math> 5,9</b>	
	<b>97,6 <math>\pm</math> 5,6 %</b>	

Cálculos: ídem SD1



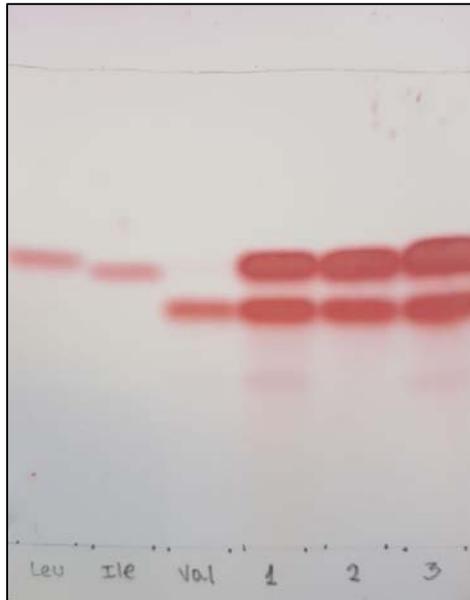
**Figura 8.** Resultados del contenido total de BCAA de los suplementos dietarios indicado como porcentaje del valor declarado. Los resultados se encuentran representados por segmentos, para los cuales el punto central indica el valor experimental obtenido, acompañado de los valores mínimos y máximos calculados a partir de sus límites de confianza, en los extremos. La línea punteada señala el valor de 100% y la franja celeste constituye los valores de 95 – 105% que impone la legislación europea para el contenido porcentual del activo, en cumplimiento con las normas de buenas prácticas de manufactura para productos de calidad farmacéutica (tomado como referencia).

## 7.2 Identificación de leucina, isoleucina y valina por TLC

Se realizaron cromatografías en placa delgada con el objetivo de comprobar si las muestras de suplementos dietarios contienen los tres aminoácidos ramificados, y para descartar la posibilidad de que se encuentren adulteradas con algún otro aminoácido que responda positivamente a la ninhidrina. El procedimiento analítico, la preparación de las soluciones sembradas y las condiciones cromatográficas se describen en la **Sección 6.7**. La composición de las muestras analizadas se detalló anteriormente en la **Sección 7.1.2**.

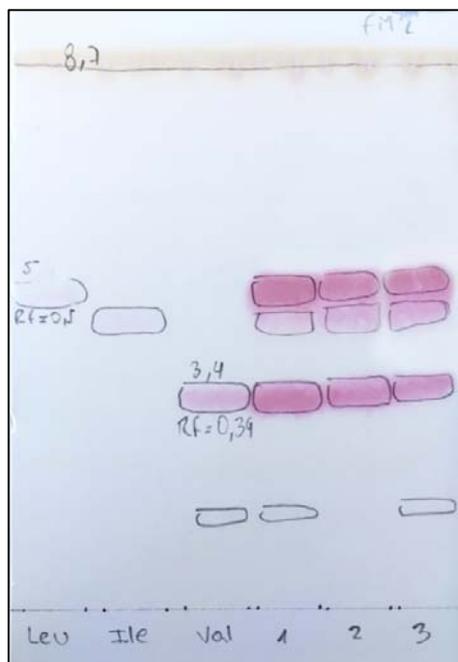
En un principio se utilizó como fase móvil una mezcla de 1-butanol : ácido acético glacial : agua en proporción 3 : 1 : 1. De esta forma, como se observa en la fotografía de la placa (ver **Figura 9**), no se logró obtener una correcta separación entre los aminoácidos leucina e isoleucina. Tampoco se obtuvieron los resultados deseados al modificar las proporciones de los componentes de esta fase móvil. A partir de estos resultados surge la premisa de si las

muestras contienen ambos aminoácidos o sólo alguno de ellos, además de la valina, la cual pudo ser identificada satisfactoriamente en todas las muestras.



**Figura 9.** Cromatografía en capa delgada utilizando como fase móvil una mezcla de 1-butanol : ácido acético glacial : agua (3 : 1 : 1). En los casilleros designados como “Leu”, “Ile” y “Val” se sembraron las soluciones estándar para TLC de L-Leu, L-Ile y L-Val, respectivamente, y en los casilleros que se nombran como “1”, “2” y “3”, las soluciones muestra para TLC de SD1, SD2 y SD3, respectivamente (ver en **Sección 6.7**)

Se probó utilizando 2-butanona y piridina, en reemplazo de 1-butanol, y luego de varias pruebas se consiguió la separación de los dos aminoácidos implicados (ver **Figura 10**). La fase móvil quedó compuesta por una mezcla de 2-butanona : piridina : agua : ácido acético glacial, en proporción 73 : 15 : 15 : 2, respectivamente.

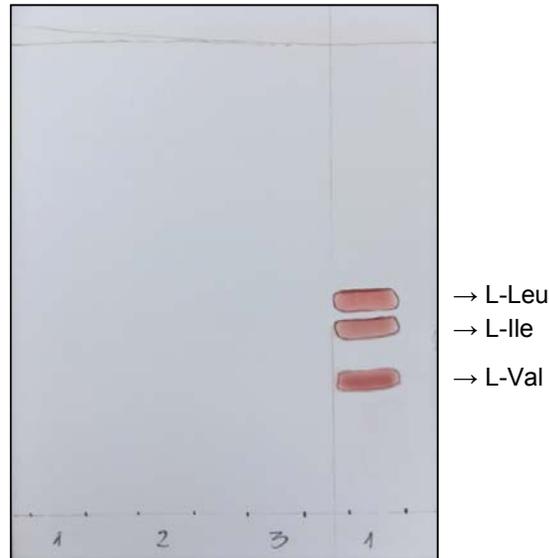


**Figura 10.** Cromatografía en capa delgada utilizando como fase móvil una mezcla de 2-butanona : piridina : agua : ácido acético glacial (73 : 15 : 15 : 2). En los casilleros designados como “Leu”, “Ile” y “Val” se sembraron las soluciones estándar para TLC de L-Leu, L-Ile y L-Val, respectivamente, y en los casilleros nombrados como “1”, “2” y “3”, las soluciones muestra para TLC de SD1, SD2 y SD3, respectivamente (ver en **Sección 6.7**). Nota: la fotografía utilizada para ilustrar la cromatografía fue capturada habiendo transcurrido varios días luego del ensayo (nótese la atenuación del color de las manchas con respecto a la placa de la **Figura 9**)

En esta última TLC se puede observar claramente la presencia de L-Leu, L-Ile y L-Val en las tres muestras de suplementos dietarios. Los Rf calculados para los estándares fueron de 0,59 para L-Leu, 0,53 para L-Ile y 0,39 para L-Val, los cuales coinciden con los Rf obtenidos en las tres muestras.

### 7.3 Separación y cuantificación de leucina, isoleucina y valina mediante TLC y espectrofotometría UV/VIS

Se realizó una cromatografía en capa delgada, siguiendo el procedimiento explicado en la **Sección 6.8**, con el objetivo de separar previamente los aminoácidos ramificados de las muestras y luego determinar su contenido individual. La **Figura 11** muestra una fotografía de la cromatografía efectuada.



**Figura 11.** Cromatografía en capa delgada para las distintas muestras. Sobre el margen derecho se sembró una de las soluciones muestras con el propósito de ser revelada y servir como guía para recortar las regiones de la placa donde se encuentran los aminoácidos L-Leu, L-Ile y L-Val de las tres muestras. Los valores de Rf obtenidos para los distintos AA coinciden con los declarados anteriormente en la **Sección 7.2**.

Para calcular la exactitud de la técnica separativa se sembraron en una placa tres soluciones de estándares de L-Leu, L-Ile y L-Val, de concentraciones similares a las de las soluciones muestra para TLC de suplementos dietarios, según el procedimiento descrito en la **Sección 6.8**, sembrando sobre el margen derecho una de las soluciones muestra. Cada aminoácido se valoró frente a su respectiva curva de calibración y los niveles de recuperación obtenidos fueron mayores a 95,0% en todos los casos.

A continuación, en la **Tabla 4**, se resumen las características de los suplementos dietarios analizados junto con los resultados obtenidos para la determinación de aminoácidos totales. Al final de esta tabla se presentan los resultados alcanzados sobre la cuantificación espectrofotométrica de los distintos aminoácidos en las muestras, separados previamente por TLC.

## Determinación del contenido de BCAA en suplementos dietarios

	SD		BCAA	L-Leu	L-Ile	L-Val	Proporción	Equivalencia de una porción	Dosis diaria y forma de uso sugerido
Descripción de suplementos analizados	1	Contenido por porción (mg)	1001,6	466,8	68,0	466,8	2 : 0,3 : 2	4 cápsulas	2 cápsulas antes y 2 cápsulas después del entrenamiento
	2		2040,0	840,0	600,0	600,0	2 : 1,4 : 1,4	4 comprimidos	2 comprimidos 2 veces por día
	3		1800,0	900,0	450,0	450,0	2 : 1 : 1	3 cápsulas	3 cápsulas diarias 30 min después del entrenamiento
Identificación de AA	1	Identifica (Sí/No)	N/A	Sí	Sí	Sí			
	2			Sí	Sí	Sí			
	3			Sí	Sí	Sí			
Separación y cuantificación de AA	1	Contenido por porción (mg)	726,8 ± 181,9	359,6 ± 66,9	13,2 ± 53,1	354,1 ± 61,9			
		Contenido del valor declarado porción (%)	72,6 ± 18,2	77,0 ± 14,3	19,4 ± 78,1	75,8 ± 13,3			
	2	Contenido por porción (mg)	2083,9 ± 640,5	564,1 ± 247,7	609,8 ± 172,3	910,0 ± 220,5			
		Contenido del valor declarado porción (%)	102,2 ± 31,4	67,2 ± 29,5	101,6 ± 28,7	151,7 ± 36,8			
	3	Contenido por porción (mg)	986,0 ± 316,7	536,4 ± 123,1	849,9 ± 81,1	599,8 ± 112,4			
		Contenido del valor declarado porción (%)	110,3 ± 17,6	59,6 ± 13,7	188,9 ± 18,0	133,3 ± 25,0			
Determinación de BCAA total	1	Contenido por porción (mg)	961,8 ± 43,9						
		Contenido del valor declarado porción (%)	96,0 ± 4,4						
	2	Contenido por porción (mg)	2102,4 ± 104,2						
		Contenido del valor declarado porción (%)	103,1 ± 5,1						
	3	Contenido por porción (mg)	1756,3 ± 100,8						
		Contenido del valor declarado porción (%)	97,6 ± 5,6						

Tabla 4. Descripción de los suplementos dietarios analizados y resultados de la determinación de aminoácidos por las distintas técnicas analíticas.

## 8. Discusión y conclusiones

Desde hace varios años se ha generado gran interés en los BCAA, por los especialistas en nutrición deportiva, y hoy en día se los utiliza por deportistas como suplementos nutricionales. Varios estudios han demostrado que la suplementación con BCAA tiene efectos beneficiosos para disminuir el daño muscular inducido por el ejercicio, promover la síntesis de proteínas del músculo esquelético, servir como fuente de energía durante la actividad física, entre otros. Diversas investigaciones aseguran que estos aminoácidos contribuyen con la disminución de la grasa corporal y la consecuente pérdida de peso.

En la actualidad, los aminoácidos de cadena ramificada se comercializan a nivel mundial en forma de suplemento dietario. Mayormente estos suplementos se encuentran compuestos por los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, representando en su conjunto a los BCAA, donde los mismos son formulados en distintas proporciones. También pueden contener vitaminas u otros aminoácidos como componentes minoritarios y sus presentaciones se dan generalmente en cápsulas rígidas o comprimidos, conteniendo cada uno entre 0,25–0,60 g de BCAA.

Existe mucha controversia con respecto a cuál es la dosis óptima de BCAA que se debe consumir y cuál la proporción más efectiva de la composición de aminoácidos, por lo que no se pueden obtener conclusiones contundentes. Sin embargo, podríamos decir que la mayoría de los estudios que han alcanzado efectos positivos han utilizado dosis diarias de entre 6–12 g, con una relación 2–3:1:1 entre los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, respectivamente.

Algunos autores consideran que la máxima ingesta segura de leucina es 550 mg/kg (Pencharz, P. B. *et al.*, 2012), siendo las dosis efectivas de 50–200 mg/kg/día (De Palo, E. F., *et al.*, 2001). No obstante, creemos que las futuras investigaciones que estudien los efectos de los BCAA sobre la actividad física deberían seguir un protocolo de suplementación uniforme para todos los estudios, lo que permitiría descartar las dosis y posologías que no aporten beneficios al deportista.

Los consumidores suponen que los suplementos dietarios no son fármacos, y por lo tanto, que traen asociados una menor cantidad de efectos secundarios. También se los induce a creer que, como se pueden adquirir en farmacias junto con medicamentos de venta libre, la calidad y las exigencias de fabricación de los mismos son compatibles con las regulaciones farmacéuticas, o dicho de otro modo, que son productos confiables. La realidad es que en la Argentina no se exige que los suplementos dietarios cumplan con las mismas normas aplicadas para los productos farmacéuticos, en discordancia con la legislación europea, la cual demanda entre un 95 a 105% de contenido del componente activo declarado; sino que sólo se requiere el cumplimiento de controles microbiológicos y no fisicoquímicos.

Los suplementos dietarios de BCAA se pueden conseguir fácilmente en farmacias, tiendas de nutrición deportiva y suplementos, o inclusive en gimnasios. Con la necesidad de determinar si

estos son fehacientes en términos de contenido estandarizado y de calidad, se realizó un muestreo utilizando tres de las marcas comerciales de origen nacional más reconocidas en el ámbito deportivo y se valoraron empleando distintas técnicas analíticas.

Para poder realizar estas determinaciones se trabajó en el desarrollo de una metodología que, de forma sencilla y accesible, permita obtener valores certeros y reproducibles en el control de calidad de suplementos deportivos. El fundamento principal de la misma se basa en un sistema de derivatización basado en ninhidrina y detección mediante espectrofotometría UV/VIS. Lo más laborioso fue encontrar la forma de preparar un reactivo de ninhidrina que resulte estable en el tiempo, que no se oxide con facilidad, y que otorgue un buen rendimiento al producto de la reacción contra los aminoácidos. El método elegido para la preparación del reactivo fue el que propone Standara, S. *et al.* (1999), el cual se compone principalmente de ninhidrina, borohidruro de sodio, solución buffer acetato de sodio y metilenglicol como solvente. Si bien este autor utiliza un equipo analizador automático de aminoácidos, en este trabajo se optó por desarrollar un método de análisis más sencillo, el cual pueda ser reproducido por cualquier laboratorio que se encuentre equipado con un equipo espectrofotómetro UV/VIS, como único instrumental analítico necesario. El método propuesto fue valorado y arrojó una buena reproducibilidad entre los distintos análisis.

Mediante la técnica analítica para la determinación del contenido de aminoácidos totales mediante espectrofotometría UV/VIS (ver **Sección 6.6** para la descripción de la metodología y **Sección 7.1.2** para los resultados) se obtuvieron los siguientes resultados experimentales.

El contenido promedio de BCAA por porción para el SD1 fue de  $1,00 \pm 0,04$  g, donde una porción corresponde a un total de 4 cápsulas, resultando ser esta la ingesta diaria sugerida por el producto, donde se recomienda la toma de 2 cápsulas antes del entrenamiento y otras 2 cápsulas al finalizar el mismo, resultando en una ingesta de aproximadamente 0,5 g de BCAA en dos tomas diarias, según expresa nuestro resultado. Por otro lado, el SD2 arrojó un valor de  $2,10 \text{ g} \pm 0,10$  g de BCAA por porción, donde una porción es equivalente a 4 comprimidos y esta es la ingesta diaria sugerida según se declara en el rótulo del envase. Se recomienda la toma de 2 comprimidos 2 veces por día, es decir, aproximadamente 1 g de BCAA en dos tomas diarias. Por último, el valor del contenido de BCAA por porción para el SD3 fue de  $1,76 \pm 0,10$  g, donde una porción es igual a 3 cápsulas y se recomienda administrarla 30 min antes del entrenamiento.

A partir de los resultados anteriores se calculó el contenido recuperado de BCAA expresado como porcentaje del valor declarado por cada producto. Los mismos fueron de  $96,0 \pm 4,4$  % para el SD1,  $103,1 \pm 5,1$  % para el SD2 y  $97,6 \pm 5,6$  % para el SD3. Si observamos la **Figura 8** tendremos una representación más clara de dónde se ubican estos resultados en correspondencia con el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura europeas, las cuales requieren entre un 95 a 105% del contenido del activo. En esta relación, el suplemento

dietario SD1 cumple con esta especificación si consideramos el valor experimental medio obtenido de 96,0%, como también se concibe si tomamos el resultado de su límite superior, de 100,4%. El caso no es propicio para el límite inferior, de 91,6%, el cual se encuentra por debajo del 95,0%. Pasamos al SD3, donde se repite la misma situación, en el que los valores 97,6% y 103,2% son los que se incluyen dentro de este cumplimiento, y el límite inferior de 92,0% el valor que queda exento. En cambio, para el SD2 el escenario se da a la inversa; el resultado experimental alcanzado junto con su límite inferior son los que se adentran en el cumplimiento de la especificación, quedando el límite superior fuera de su rango, siendo estos: 103,1%, 98,0% y 108,2%, respectivamente. En resumen, centrándonos en los porcentajes obtenidos experimentalmente para los valores declarados de BCAA, es decir, los valores medios, sin considerar los límites de confianza obtenidos de nuestra técnica analítica, los tres suplementos cumplen con el valor declarado según el especificado por cada producto, en el sentido de las buenas prácticas de manufactura que exige la legislación europea.

Otra de las partes más dificultosas de este trabajo tuvo lugar en los intentos por separar y obtener los aminoácidos puros de las muestras de suplementos dietarios. La primera elección, y la que resultó ser la más laboriosa, fue utilizar la técnica de cromatografía en columna para la separación de leucina, isoleucina y valina. Para ello se utilizaron como fases estacionarias distintas resinas de intercambio catiónico de diferentes tamaños de malla, y como eluentes se seleccionaron distintos buffers como citrato de sodio, acetato de sodio o el buffer HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). También se utilizaron soluciones salinas a distintas concentraciones. Como estos aminoácidos tienen valores de pKa muy próximos entre sí, resultó dificultoso elegir la fase móvil adecuada que permita la elución de los tres por separado, alcanzándose resultados poco satisfactorios.

Posteriormente se intentó separar los aminoácidos mediante cromatografía en placa preparativa, utilizándose las mismas condiciones cromatográficas que resultaron positivas para la identificación de los aminoácidos utilizando cromatografía en capa delgada (ver **Sección 6.7**). Los resultados no fueron buenos ya que las placas reveladas mostraban manchas indefinidas, lo que daba a creer que las muestras habían difundido sobre un gran volumen de gel de sílice, imposibilitando la delimitación de las mismas para luego poder remover los aminoácidos sin revelar adsorbidos sobre el gel de sílice.

Como se muestra en la **Sección 7.2**, mediante cromatografía en capa delgada se logró separar e identificar a los tres BCAA y, descartar la presencia de otros aminoácidos desconocidos positivos a la reacción con ninhidrina que hubieren sido agregados como sustitutos y no se encontraran declarados en los rótulos de los tres suplementos analizados. Si bien esta técnica no está pensada para fines preparativos, se realizó una prueba sembrando soluciones patrones de L-Leu, L-Ile y L-Val y extrayendo los aminoácidos no revelados de la placa, como se describió en la **Sección 6.8**. Los resultados de la valoración frente a nuestra técnica

espectrofotométrica (ver **Sección 6.6**) arrojaron niveles de recuperación mayores 95,0%, para los tres aminoácidos.

Valiéndose de ambas metodologías analíticas, se realizó para cada muestra la separación de los tres aminoácidos mediante TLC, para luego realizar la cuantificación espectrofotométrica de los aminoácidos por separado (ver **Sección 6.8** para la descripción de la metodología y **Sección 7.3** para los resultados). Los resultados se muestran en la **Tabla 4**, donde se puede ver que se obtuvo un mayor error analítico en la cuantificación de los aminoácidos separados previamente por cromatografía en capa delgada, alcanzándose en algunos casos resultados desfavorables. En próximos estudios se intentará mejorar la precisión de esta técnica en su conjunto, donde se pretende aumentar el número de replicados para la preparación de cada muestra con la expectativa de obtener límites de confianza más pequeños, como también aumentar las dosis analizadas con el objetivo de lograr que todos los valores medidos estén por encima del límite de cuantificación calculado para la técnica espectrofotométrica. Los resultados del contenido promedio de BCAA por porción alcanzados fueron de  $0,73 \pm 0,18$  g para el SD1,  $2,08 \pm 0,64$  g para el SD2 y  $0,99 \pm 0,32$  para el SD3, cuyos respectivos valores para el contenido recuperado de BCAA, expresado como porcentaje del valor declarado por cada producto, fueron de 72,6%, 102,2% y 110,3%, correspondientemente.

Si bien los suplementos analizados presentaron cantidades variables de BCAA, ninguno presenta una gran variabilidad con respecto a sus contenidos declarados. Sin embargo, estos datos hacen hincapié en la necesidad de mejorar la supervisión con respecto a la calidad de los suplementos dietarios comercializados en el mercado argentino. Además, creemos que la evaluación periódica no sólo del producto, sino también de toda la cadena de fabricación, junto con el cumplimiento de buenas prácticas de manufactura y la estandarización y regulación del etiquetado, es recomendable para garantizar el aseguramiento de la calidad e inocuidad de estos productos, los cuales se consideran alimentos según el CAA.

Los métodos y técnicas analíticas utilizados para los análisis fueron validados y se encuentran disponibles para su empleo en el control de calidad de suplementos dietarios que contengan aminoácidos de cadena ramificada como principales componentes. Por otro lado, se seguirá trabajando en mejorar las técnicas separativas propuestas y/o encontrar nuevos métodos para la obtención de los aminoácidos puros, respetando la consigna fundamental de este trabajo, que pretende la utilización de técnicas sencillas que impulsen el interés de realizar controles fisicoquímicos no solo para suplementos dietarios, sino también para la determinación de aminoácidos en alimentos o complementos alimenticios, preparados dietéticos o infinidad de otras matrices.

## 9. Bibliografía

Ahlborg, G., Felig, P., Hagenfeldt, L., Hendler, R. y Wahren, J. (1974). Substrate turnover during prolonged exercise in man. *J Clin Invest*, 53, 1080–90.

Bergström J., Furst, P., Noree, L. O. y Vinnars, E. (1974). Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol*, 36, 693–7.

Blomstrand, E., Perrett, D., Parry-Billings, M. y Newsholme, E. A. (1989). Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat. *Acta Physiol Scand*, 136, 473–81.

Bolster, D. R., Jefferson, L. S. y Kimball SR. (2004). Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exerciseinduced signalling. *Proc Nutr Soc*, 63, 351–6.

Boppana, V. K. y Rhodes, G. R. (1990). High-performance liquid chromatographic determination of an arginine-containing octapeptide antagonist of vasopressin in human plasma by means of a selective postcolumn reaction with fluorescence detection. *J. Chromatogr*, 507, 79-84.

Borgenvik, M., Apró, W. y Blomstrand, E. (2012). Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(5), E510-21. DOI: 10.1152/ajpendo.00353.2011.

Bracco, J. L. y Bracco, M. F. B. (2017) (Documento inédito)

Calder, P. C. y Yaqoob, P. (1999). Glutamine and the immune system. *Amino Acids*, 17(3), 227-41.

Calder, P.C. (2006). Branched-chain amino acids and immunity. *J. Nutr*, 136, 288S–293S.

Cashman, P. J., Beede, J. D. y Thornton, J. L. (1979). Ninhydrin: a color test for the differentiation of phenylethylamine of abuse. *J. Forensic Sci. Soc.*, 19, 137-141.

Castell, L. M. (2003). Glutamine supplementation in vitro and vivo, in exercise and in immunodepression. *Sports Med.*, 33, 323–45.

Cavins, J. F. y Friedman, M. (1967). New amino acids derived from reactions of  $\epsilon$ -amino groups in proteins with  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated compounds. *Biochemistry*, 6, 3766-3770.

Cavins, J. F. y Friedman, M. (1968). Automatic integration and computation of amino acid analyses. *Cereal Chem*, 45, 172-176.

Colker, C. M., Swain, M. A., Fabrucini, B., Shi, Q. y Kalman, D. (2000). Effects of supplemental protein on body composition and muscular strength in healthy athletic male adults. *Current*

*Therapeutic Research-clinical and Experimental*, 61(1). 19-28. DOI: 10.1016/S0011-393X(00)88492-1.

Coombes, J. S. y McNaughton, L. R. (2000). Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. *J Sports Med Phys Fitness*, 40, 240–6.

Cooper, C., Packer, N. y Williams, K. (2001). Amino acid analysis protocols. In *Methods Mol. Biol.; Humana Press: Totowa, N. J.*, 265.

Damuni, Z. y Reed, L. J. (1987). Purification and properties of the catalytic subunit of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney mitochondria. *J Biol Chem*, 262, 5129–32.

De Palo, E. F., Gatti, R., Cappellin, E., Schiraldi, C., De Palo, C. B. y Spinella, P. (2001). Plasma lactate, GH and GH-binding protein levels in exercise following BCAA supplementation in athletes. *Amino Acids*, 20(1), 1-11.

Dent, C. E. (1948). A study of the behaviour of some sixty amino acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol-“collidine” filter-paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids. *Biochem. J.*, 43, 169-180.

Dudgeon, W. D., Kelley, E. P. y Scheett, T. P. (2016). In a single-blind, matched group design: Branched-chain amino acid supplementation and resistance training maintains lean body mass during a caloric restricted diet. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13(1), 2-10, DOI: 10.1186/s12970-015-0112-9.

Folkertsma, B., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (1996). Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *Int. Dairy J.*, 6, 1117-1134.

Fontaine, J., Eudaimon, M., Bargholz, J., Empie, M. W., Eriksson, S., Hoeg, T.,.... Verbeek, K. (2000). Liquid chromatographic determination of lysine, methionine, and threonine in pure amino acids (feed grade) and premixes: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 83, 771-783.

Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J. Agric. Food Chem.*, 52(3), 385-406.

Friedman, M., Pang, J. y Smith, G. A. (1984). Ninhydrin-reactive lysine in food proteins. *J. Food Sci.*, 49, 10-13, 20.

Tang, F. (2006). Influence of Branched-Chain Amino Acid Supplementation on Urinary Protein Metabolite Concentrations after Swimming. *Journal of the American College of Nutrition*, 25 (3), 188-194, DOI: 10.1080/07315724.2006.10719531.

Giugliano, D., Marfella, R., Verrazzo, G., Acampora, R., Coppola, L., Cozzolino, D. (1997). The vascular effects of L-arginine in humans. *J Clin Invest.*, 99, 433–8.

Grangeasse, C., Riberty, M., Vaganay, E. y Duclos, B. (1999). Alternative procedure for two-dimensional separation of phosphoamino acids. *Biotechniques*, 27, 62-64.

Griffin, M. y Wilson, J. (1984). Detection of épsilon ( $\gamma$ -glutamyl) lysine. *Mol. Cell. Biochem.*, 58, 37-49.

Gualano A. B., Bozza, T., Lopes De Campos, P., Roschel, H., Dos Santos Costa, A., Luiz Marquezi, M., Benatti F. y Herbert Lancha Junior, A. (2011). Branched-chain amino acids supplementation enhances exercise capacity and lipid oxidation during endurance exercise after muscle glycogen depletion. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 51(1), 82-8.

Haagsma, N. y Gortemaker, B. G. M. (1979). Determination of lysinoalanine by densitometry. *J. Chromatogr.*, 168, 550-556.

Harper A. E., Miller, R. H. y Block, K.P. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 4, 409–54.

Harris, R. A., Zhang, B., Goodwin, G. W., Kuntz, M. J., Shimomura, Y., Rougraff, P.,... Crabb, D. W. (1990). Regulation of the branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Adv Enzyme Regul*, 30, 245–63.

Hirs, C. H. W., Stein, W. H. y Moore, S. (1954). The amino acid composition of ribonuclease. *J. Biol. Chem*, 211, 941-950.

Holecek, M., Kandar, R., Sispera, L. y Koverik, M. (2010). Acute hyperammonemia activates branched-chain amino acid catabolism and decreases their extracellular concentrations: Different sensitivity of red and white muscle. *Amino Acids*, 8, 1–10.

James, L. B. (1971). Amino acid analysis: the reduction of ninhydrin reagent with titanous chloride. *J Chromatogr*, 59(1),178-80.

James, L. B. (1978). Amino acid analysis. II. Ninhydrin reduction with titanous chloride. *Journal of Chromatography*, 152, 298-300.

James, L. B. (1984). Amino acid analysis. III. Reduction of ninhydrin with titanous chloride. *Journal of Chromatography*, 284, 97-103.

Kobayashi, R., Murakami, T., Obayashi, M., Nakai, N., Jaskiewicz, J., Fujiwara, Y., Shimomura, Y. y Harris, R. A. (2002). Clofibrilic acid stimulates branched-chain amino acid catabolism by three mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 407, 231–40.

- Kobayashi, R., Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Otsuka, M., Arakawa, N., Shimizu, K. y Harris, R. A. (1999). Hepatic branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex in female rats: activation by exercise and starvation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, *45*, 303–9.
- LaPorte, G. M. y Ramotowski, R. S. (2003). The effects of latent print processing on questioned documents produced by office machine systems utilizing inkjet technology and toner systems. *J. Forensic Sci.*, *48*, 658-663.
- Laskar, S., Sinhababu, A. y Hazra, K. M. (2001). A modified spray reagent for the detection of amino acids on thin-layer chromatography plates. *Amino Acids*, *21*, 201-204.
- Layman D. K. y Baum J. I. (2004). Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr.*, *134*, S968–73.
- Li, P., Yin, Y.L., Li, D., Kim, S.W. y Wu, G. (2007). Amino acids and immune function. *Br. J. Nutr.*, *98*, 237–252.
- Maccario, M., Procopio, M., Loche, S., Cappa, M., Martina, V., Camanni, F. y Ghigo, E. (1994). Interaction of free fatty acids and arginine on growth hormone secretion in man. *Metabolism*, *43*, 223–6.
- MacLean, D. A., Graham, T. E. y Saltin, B. (1994). Branched-chain amino acids augment ammonia metabolism while attenuating protein breakdown during exercise. *Am J Physiol*, *267*, E1010–22.
- Matsumoto, K., Koba, T., Hamada, K., Sakurai, M., Higuchi, T. y Miyata, H. (2009). Branched-chain amino acid supplementation attenuates muscle soreness, muscle damage and inflammation during an intensive training program. *J Sports Med Phys Fitness*, *49(4)*, 424-31.
- McCaldin, D. J. (1960). The Chemistry of Ninhydrin. *Chem. Rev.*, *60 (1)*, 39-51.
- Metrohm AG (2013). Analizador de aminoácidos. Suiza. CH-9100 Herisau. 8.943.5000ES. [https://partners.metrohm.com/GetDocument?action=get\\_dms\\_document&docid=1483678](https://partners.metrohm.com/GetDocument?action=get_dms_document&docid=1483678).
- Miller, N. J. y Miller, J. C. (2002), *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Madrid, España, Editorial Pearson Education S.A.
- Moore, S. (1968). Amino acid analysis: dimethyl sulfoxide as a solvent for the ninhydrin reaction. *J. Biol. Chem.*, *243*, 6281-6283.
- Moore, S. y Stein, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, *176*, 367-388.
- Mordier, S., Deval, C., Bechet, D., Tassa, A. y Ferrara, M. (2000). Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, *275*, 29900–6.

- Mourier A., Bigard, A. X., de Kerviler, E., Roger, B., Legrand, H. y Guezennec, C. Y. (1997). Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers. *Int J Sports Med*, 18(1), 47-55.
- Nagaraja, P., Hemantha Kumar, M. S., Yathirajan, H. S. y Prakash, J. S. (2002). Novel sensitive spectrophotometric method for the trace determination of cyanide in industrial effluent. *Anal. Sci.*, 18, 1027-1030.
- Negro, M., Giardina, S., Marzani, B. y Marzatico, F. (2008). Branched-chain amino acid supplementation does not enhance athletic performance but affects muscle recovery and the immune system. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 48, 347-51.
- Newsholme, P. (2001). Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J. Nutr.*, 131(9), 2515S-22S.
- Nosaka K., Newton, M. y Sacco, P. (2002). Muscle damage and soreness after exercise of the elbow flexors. *Med Sci Sports Exerc*, 34, 920-7.
- Ohtani, M., Sugita, M. y Maruyama, K. (2006). Amino acid mixture improves training efficiency in athletes. *J. Nutr.*, 136(2), 538S-543S.
- Ohtani, M., Maruyama, K., Sugita, M. y Kobayashi, K. (2001). Amino Acid Supplementation Affects Hematological and Biochemical Parameters in Elite Rugby Players. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(9), 1970-1976, DOI: 10.1271/bbb.65.1970.
- Ohtani, M., Maruyama, K., Suzuki, S., Sugita, M. y Kobayashi, K. (2001). Changes in Hematological Parameters of Athletes after Receiving Daily Dose of a Mixture of 12 Amino Acids for One Month during the Middle- and Long-distance Running Training. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(2), 348-355, DOI: 10.1271/bbb.65.348.
- Paul, H. S. y Adibi, S. A. (1979). Paradoxical effects of clofibrate on liver and muscle metabolism in rats. Induction of myotonia and alteration of fatty acid and glucose oxidation. *J Clin Invest*, 64, 405-12.
- Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. y Ferragut, V. (2000). Proteolysis in Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *J. Dairy Sci*, 83, 1441-1447.
- Paxton, R. y Harris, R. A. (1984). Regulation of branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase kinase. *Arch Biochem Biophys*, 231, 48-57.
- Pearce, K. N., Karahalios, D. y Friedman, M. (1988). Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese. *J. Food Sci*, 53, 432-435, 438.
- Pencharz, P. B., Elango R. y Ball, R. O. (2012). Determination of the tolerable upper intake level of leucine in adult men. *J. Nutr.*, 142(12), 2220S-2224S. DOI: 10.3945/jn.112.160259.

Picton, S. F., McCluskey, J. T., Flatt, P. R. y McClenaghan, N. H. (2002). Effects of cytotoxic agents on functional integrity and antioxidant enzymes in clonal beta-cells. *Diabetes Metab.*, 28, 3S70-73S77.

Popov, K. M., Zhao, Y., Shimomura, Y., Kuntz, M. J. y Harris R. A. (1992). Branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase kinase: molecular cloning, expression, and sequence similarity with histidine protein kinases. *J Biol Chem.*, 267, 13127-30.

Primo Yúfera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria* (T. 2). Barcelona, España, Editorial Reverté, S. A.

Quilliam, M. A., Thomas, K. y Wright, J. L. (1998). Analysis of domoic acid in shellfish by thin-layer chromatography. *Nat. Toxins*, 6, 147-152.

Rennie, M. J. (1996). *Influence of exercise on protein and amino acid metabolism*. In: Rowell L. B., Shepherd J. T., editors. Handbook of physiology, section 12: exercise: regulation and integration of multiple systems. New York: Oxford University Press, 995-1035.

Riazi, R., Wykes, L. J., Ball, R. O. y Pencharz, P. B. (2003). The total branched-chain amino acid requirement in young healthy adult men determined by indicator amino acid oxidation by use of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine. *J Nutr*, 133,1383-9.

Rosen, H., Berard, C. W y Levenson, S. M. (1962). A simplified procedure for automatic amino acid analysis. *Analytical Biochemistry*, 4(3), 213-221.

Rowbottom, D. G., Keast, D. y Morton, A. R. (1996). The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med*, 21, 80-97.

Ruhemann, S. (1913). Triketohydrindene hydrate. *Trans. Chem. Soc.*, 97, 2025-2031.

Ryan, E. A. y Kropinski, A. M. (1980). Separation of amino sugars and related compounds by two-dimensional thin-layer chromatography. *J. Chromatogr*, 195, 127-132.

Sarwar, G., Christiansen, G. A., Finlayson, A. T., Friedman, M., Hackler, L. R., McKenzie, S. L.,... Tkachuk, R. (1983). Intraand inter-laboratory variation in amino acid analysis. *J. Food Sci*, 48, 526-531.

Schaefer, A., Piquard, F., Geny, B., Doutreleau, S., Lampert, E., Mettauer, B. y Lonsdorfer, J. (2002). L-Arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. *Int J Sports Med*, 23, 403-7.

Schwarz, L. y Frerichs, I. (2002). Advanced solvent-free application of ninhydrin for detection of latent fingerprints on thermal paper and other surfaces. *J. Forensic Sci.*, 47, 1274-1277.

- Sharp, C. P. y Pearson, D. R. (2010). Amino acid supplements and recovery from high-intensity resistance training. *J Strength Cond Res*, 24(4), 1125-30. DOI: 10.1519/JSC.0b013e3181c7c655.
- Shimomura, Y., Murakami, T., Nakai, N., Nagasaki, M., Obayashi, M., Li, Z., Xu, M., Sato, Y., Kato, T., et al. (2000). Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 46, 71-7.
- Shimomura, Y., Nanaumi, N., Suzuki, M., Popov, K. M. y Harris, R. A. (1990). Purification and partial characterization of branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase kinase from rat liver and rat heart. *Arch Biochem Biophys*, 283, 293-9.
- Shimomura, Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T., Shimomura, N., Kobayashi, H. y Mawatari, K. (2006). Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J Nutr.*, 136(2), 529S-532S.
- Shimomura, Y., Fujii, H., Suzuki, M., Fujitsuka, N., Naoi, M., Sugiyama, S. y Harris, R. A. (1993). Branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex activation by tetanic contractions in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1157, 290-6.
- Shimomura, Y., Fujii, H., Suzuki, M., Murakami, T., Fujitsuka, N. y Nakai, N. (1995). Branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex in rat skeletal muscle: regulation of the activity and gene expression by nutrition and physical exercise. *J Nutr.*, 125 (Suppl), S1762-5.
- Shimomura, Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T., Shimomura, N., Kobayashi, H. y Mawatari, K. (2006). Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J Nutr.*, 136(2), 529S-532S.
- Smruga M., Kameishi M., Tanaka T., Kondoh, T. y Torii, K. (2002). Preference for a solution of branched-chain amino acids plus glutamine and arginine correlates with free running activity in rat. *Nutr Neurosci.*, 5, 189-99.
- Spackman, D.H., Stein, E.H. y Moore, S. (1958). Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of Amino acids. *Analytical Chemistry*, 30, 1190-1191.
- Standara, S., Drdák, M. y Veselá, M. (1999). Amino acid analysis: Reduction of ninhydrin by sodium borohydride. *Food / Nahrung*, 43, 410-413.
- Strüder, H. K., Hollmann, W., Platen, P., Wöstmann, R., Ferrauti, A. y Weber, K. (1997). Effect of exercise intensity on free tryptophan to branched-chain amino acids ratio and plasma prolactin during endurance exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, 22, 280-291.
- Takahashi, S. (1978). Sodium Borohydride as a Reducing Agent for Preparing Ninhydrin Reagent for Amino Acid Analysis. *The Journal of Biochemistry*, 83(1), 57-60.

- Teravainen, H., Larsen, A. y Hillbom, M. (1977). Clofibrate-induced myopathy in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 39, 135–8.
- Thompson, J. F. y Morris, C. J. (1959). Determination of amino acids from plants by paper chromatography. *Anal. Chem.*, 31, 1031-1037.
- Tipton, K. D., Rasmussen, B. B., Miller, S. L., Wolf, S. E., Owens-Stovall, S. K., Petrini, B. E. y Wolfe, R. R. (2001). Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281, E197–206.
- Turinsky, J. y Long, C. L. (1990). Free amino acids in muscle: effect of muscle fiber population and denervation. *Am J Physiol.*, 258, E485–91.
- Van Haeften, T. W., Voetberg, G. A., Gerich, J. E. y van der Veen, E. A. (1989). Dose-response characteristics for arginine-stimulated insulin secretion in man and influence of hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 69, 1059–64.
- Van Slyke, D. D. y Hamilton, P. B. (1943). The synthesis and properties of ninhydrin ureide. *J. Biol. Chem*, 150, 471-476.
- Wagenmakers, A. J., Brookes, J. H., Coakley, J. H., Reilly, T. y Edwards, R. H. (1989). Exercise-induced activation of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase in human muscle. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 59, 159–67.
- Wahren J., Felig, P. y Hagenfeldt, L. (1976). Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 57, 987–99.
- Welbourne, T. C. (1987). Inter-organ glutamine flow in metabolic acidosis. *Am J Physiol*, 253, F1069–76.
- West, E. S. y Rinehart, R. E. (1942). Reaction of ninhydrin with ascorbic acid and other endiol compounds. Decarboxylation of dehydroascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 146, 105-108.
- Wimalasena, R., Audus, K. L. y Stobaugh, J. F. (2003). Rapid optimization of the postcolumn fluorogenic ninhydrin reaction for the HPLC-based determination of bradykinin and related fragments. *Biomed. Chromatogr.*, 17, 165-171.
- Xu, M., Nagasaki, M., Obayashi, M., Sato, Y., Tamura, T. y Shimomura, Y. (2001). Mechanism of activation of branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 287(3), 752–6.
- Yemm, E. W. y Cocking, E. C. (1955). The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, 80, 209-213.