



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Desarrollo de un nuevo producto de β -alanina y su
estudio de biodisponibilidad

Autor:

Lydia de Salazar Sánchez-Ferragut

Directores:

Dr. D. Ignacio Segarra Taús

Dr. D. Vicente Ávila Gandía

Murcia, 17 de Diciembre de 2020



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

Desarrollo de un nuevo producto de β -alanina y su
estudio de biodisponibilidad

Autor:

Lydia de Salazar Sánchez-Ferragut

Directores:

Dr. D. Ignacio Segarra Taús

Dr. D. Vicente Ávila Gandía

Murcia, 17 de Diciembre de 2020



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Ignacio Segarra Taús y el Dr. D. Vicente Ávila Gandía como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de un nuevo producto de Beta-alanina y su estudio de biodisponibilidad” realizada por Dña. Lydia de Salazar Sánchez-Ferragut en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 17 de Diciembre de 2020.

Fdo. Ignacio Segarra Taús

Fdo. Vicente Ávila Gandía

RESUMEN

La actividad muscular mediante el entrenamiento o cualquier otro estímulo, lleva consigo disminución de glucógeno intramuscular, fosfocreatina, reservas de adenosín trifosfato (ATP) y un aumento de iones fosfato, además de hidrógeno inorgánico, que provoca la reducción de la eficacia contráctil y del correcto desempeño muscular. Estas modificaciones dan lugar a la fatiga periférica. En muchos deportes, esta fatiga vendría marcada por el incremento de la acidez intracelular y bloqueos enzimáticos.

Carnosina (β -alanil- l-histidina) está presente en altas concentraciones en el músculo esquelético humano y es uno de los principales mecanismos amortiguadores del descenso de pH intracelular. Se ha demostrado que la ingestión de β -alanina, eleva el contenido de carnosina muscular y varios estudios han mostrado que la suplementación de β -alanina mejora el rendimiento en pruebas mixtas que conllevan fatiga por acumulación de protones (H^+), ya que estos son tamponados por la carnosina muscular que se crea a partir del consumo de dicha β -alanina. Por tanto, la β -alanina puede tener una acción ergogénica independientemente del estado del entrenamiento, y su consumo durante un periodo prolongado mejora el rendimiento de los deportistas.

En este proyecto se ha evaluado la biodisponibilidad, farmacocinética y efecto de parestesia de la β -alanina después de la administración en una formulación piloto consistente en una nueva mezcla de polvo de liberación controlada *versus* una formulación en comprimidos de liberación controlada (referencia) en sangre y orina tras la administración oral de una dosis única de 8 g de β -alanina. El estudio, previa aprobación por el Comité de Ética de la UCAM, se ha llevado a cabo con doce sujetos, estudiantes de ambos sexos, con un diseño cruzado en dos sesiones, simple ciego y aleatorizado. A cada participante se le administró por vía oral la formulación de prueba (β -alanina 8 g, L-histidina 300 mg, L-carnosina 100 mg) o el producto de referencia (10 tabletas para alcanzar β -alanina 8 g, Zinc 20 mg) con un periodo de lavado de 1 semana. Se hicieron

extracciones sanguíneas a tiempo 0 (pre-dosis), 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 y 480 min y se determinó la concentración de β -alanina, L-histidina y otros aminoácidos séricos para su análisis farmacocinético. Se recogió la orina hasta las 4h y 8h. Simultáneamente, se evaluó la intensidad de la parestesia mediante varios tests específicos de parestesia con una puntuación visual analógica (VAS), una puntuación sensorial de intensidad categórica (ISS), un inventario cualitativo de síntomas leves (QLSI) y una puntuación de la sensibilidad del cuerpo (SSS).

Se observó que el C_{MAX} y el $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ aumentaron 1,6 y 2,1 veces (ambos $p < 0,001$) en el producto de prueba, lo que produjo una biodisponibilidad 2,1 veces mayor; K_a disminuyó en la prueba ($0.0199 \pm 0.0107 \text{ min}^{-1}$) versus el producto de referencia ($0.0299 \pm 0.0121 \text{ min}^{-1}$) ($p = 0.0834$) así como V / F y Cl / F (ambos $p < 0.001$). Por otra parte, los parámetros de disposición de β -alanina $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (prueba: $150 \pm 20 \text{ min}$, referencia: $138 \pm 18 \text{ min}$), k_{el} (prueba: $0.0111 \pm 0.002 \text{ min}$, referencia: $0.0103 \pm 0.0020 \text{ min}$) y $t_{1/2}$ (prueba: $63,5 \pm 8,7 \text{ min}$, referencia: $68,9 \pm 9,8 \text{ min}$) no fueron modificados por la formulación sugiriendo que el aumento de biodisponibilidad se debe a una mayor eficacia del proceso de absorción. Por un lado, es probable que la liberación más lenta en la formulación de prueba no sature los transportadores que median la absorción intestinal de aminoácidos y, por otro lado, la coadministración con L-histidina podría prevenir el metabolismo de primer paso hepático de la β -alanina resultando en una mayor biodisponibilidad relativa.

La máxima intensidad de parestesia, E_{MAX} aumentó 1,7 veces utilizando la VAS ($p = 0,086$) y la ISS ($p = 0,009$) así como su "exposición", AUEC, que aumentó 1,9 veces con la VAS ($p = 0,107$) y la ISS ($p = 0,019$). Cuando se analizó su relación farmacocinético-farmacodinámica, se observó un bucle de histéresis en sentido de las agujas del reloj hasta ahora no descrito en la literatura, y podría indicar la presencia de tolerancia o taquifilaxia, corroborado por alcanzarse su $T_{E_{MAX}}$ antes que la C_{MAX} plasmática. Además, no se observó ninguna correlación entre los parámetros plasmáticos C_{MAX} y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ y los parámetros de parestesia E_{MAX} , AUEC mostrando la no predictibilidad de la parestesia a partir de la exposición plasmática de β -alanina. En el análisis de otros efectos, la QLSI no determinó

diferencias significativas entre las formulaciones en polvo y comprimidos, excepto en E_{MAX} ($p= 0,026$) con la sensación de cosquilleo y picazón y AUEC ($p=0.045$) con la sensación de estremecimiento y escalofríos, y en la ISS las áreas del cuerpo asociadas con más síntomas de parestesia por la suplementación con β -alanina fueron las extremidades tanto superiores como inferiores entre 30-90 minutos desde el momento de la ingesta inicial. Finalmente, no se notificaron otros efectos secundarios.

Cabe concluir, por tanto, que la nueva formulación de liberación controlada ofrece un incremento mayor del 100% en la biodisponibilidad de β -alanina, lo que abre un nuevo paradigma para las estrategias de suplementación crónica a corto o medio plazo en la nutrición deportiva para aumentar las reservas de carnosina y mejorar el rendimiento deportivo.

Palabras clave: β -alanina. L-histidina. Rendimiento. Carnosina. Farmacocinética. Biodisponibilidad. Parestesia.

ABSTRACT

Muscle activity through training or any other stimulus, leads to a decrease in intramuscular glycogen, phosphocreatine, adenosine triphosphate (ATP) reserves and an increase in phosphate ions, in addition to inorganic hydrogen, which causes a reduction in contractile efficiency and proper muscle performance. These modifications lead to peripheral fatigue. In many sports, this fatigue would be marked by increased intracellular acidity and enzymatic blocks.

Carnosine (β -alanyl-L-histidine) is present in high concentrations in human skeletal muscle and is one of the main buffer mechanisms for lowering intracellular pH. Ingestion of β -alanine has been shown to increase muscle carnosine content and several studies have shown that supplementation of β -alanine improves performance in mixed tests that lead to fatigue due to accumulation of protons (H^+) since these are buffered by carnosine muscle that is created from the consumption of the β -alanine. Therefore, β -alanine can have an ergogenic action regardless of the state of training and its consumption during a prolonged period improves the performance of athletes.

In this project we have evaluated the bioavailability, pharmacokinetics and paresthesia effect of β -alanine after administration in a pilot formulation consisting of a new controlled-release powder mix *versus* a controlled-release (reference) tablet formulation in blood and urine. After oral administration of a single 8 g dose of β -alanine. The study, prior approval by the UCAM Ethics Committee, was carried out with twelve subjects, students of both genders, with a crossover design in two sessions, single-blind and randomized. Each participant was orally administered the test formulation (β -alanine 8 g, L-histidine 300 mg, L-carnosine 100 mg) or the reference product (10 tablets to reach β -alanine 8 g, Zinc 20 mg) with a washout period of 1 week. Blood samples were taken at time 0 (pre-dose), 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 and 480 min and the concentration of β -alanine, L-histidine and other serum amino acids were determined for their pharmacokinetic analysis. Urine was collected until 4 hours

and 8 hours. Simultaneously, the intensity of paresthesia was assessed using several specific tests of paresthesia with a visual analogue score (VAS), a intensity of sensation score (ISS), a qualitative light symptoms inventory (QLSI) and a body sensitivity surface score (SSS).

It was observed that C_{MAX} and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ increased 1.6 and 2.1 times (both $p < 0.001$) in the test product, which produced a 2.1 times greater bioavailability; K_a decreased in the test ($0.0199 \pm 0.0107 \text{ min}^{-1}$) versus the reference product ($0.0299 \pm 0.0121 \text{ min}^{-1}$) ($p = 0.0834$) as well as V / F and Cl / F (both $p < 0.001$). On the other hand, the disposition parameters of β -alanine $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (test: $150 \pm 20 \text{ min}$, reference: $138 \pm 18 \text{ min}$), k_{el} (test: $0.0111 \pm 0.002 \text{ min}$, reference: $0.0103 \pm 0.0020 \text{ min}$), k_{el} (test: $0.0111 \pm 0.002 \text{ min}$, reference: $0.0103 \pm 0.0020 \text{ min}$) and $t_{1/2}$ (test: $63.5 \pm 8.7 \text{ min}$, reference: $68.9 \pm 9.8 \text{ min}$) were not modified by the formulation, suggesting that the increase in bioavailability is due to a greater efficiency of the absorption process. On the one hand, it is likely that the slower release in the test formulation does not saturate the transporters that mediate intestinal amino acid absorption and, on the other hand, co-administration with L-histidine could prevent hepatic first-pass metabolism of β -alanine resulting in higher relative bioavailability.

The maximum intensity of paresthesia, E_{MAX} increased 1.7 times using the VAS ($p = 0.086$) and the ISS ($p = 0.009$) as well as its "exposure", AUEC, which increased 1.9 times with the VAS ($p = 0.107$) and the ISS ($p = 0.019$). When its pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship was analyzed, a clockwise hysteresis loop was observed so far not described in the literature and could indicate the presence of tolerance or tachyphylaxis, corroborated by being reached earlier (TE_{MAX}) than plasma C_{MAX} . Furthermore, no correlation was observed between the plasma parameters C_{MAX} and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ and the paraesthesia parameters E_{MAX} , AUEC showing the unpredictability of paresthesia from plasma β -alanine exposure. In the analysis of other effects, the QLSI did not determine significant differences between powder and tablets formulations, except in E_{MAX} ($p = 0.026$) with the sensation of tickling and itching and AUEC ($p = 0.045$) with the sensation of shivering and flush, and in the ISS body areas associated with the most symptoms of paresthesia from β -alanine supplementation were both upper

and lower extremities between 30-90 minutes from the time of initial ingestion. Finally, no other side effects were reported.

It can therefore be concluded that the new controlled release formulation offers a greater than 100% increase in the bioavailability of β -alanine, that opens a new paradigm for short or medium term chronic supplementation strategies in sports nutrition to increase carnosine reserves and improve sports performance.

Keywords: β -alanine. L-histidine. Performance. Carnosine. Pharmacokinetic. Bioavailability. Paresthesia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento al Dr. D. Ignacio Segarra Taús y al Dr. D. Vicente Ávila Gandía, por su ejemplar dirección, apoyo continuo, motivación, y sobretodo, por ese esfuerzo final, por el que sin su ayuda no hubiera sido posible finalizar esta tesis. Quedo enormemente agradecida.

A mis compañeros y amigos Antonio Torregrosa y Raúl Arcusa, por su enorme colaboración en este proyecto y estar ahí en todo momento que he necesitado de su inestimable ayuda.

A todos los investigadores/as de la Cátedra de Fisiología del Ejercicio de la UCAM, por hacerme sentir como una más, siendo comprensibles y acertados en sus consejos.

A mi Empresa, y en especial a Antonio García, por abrirme al campo de la investigación y la innovación, permitiéndome en todo momento disponer de los medios necesarios para el desarrollo del proyecto, dándome todas las facilidades para poder compaginar los tacones de la oficina con la bata del laboratorio.

A mi marido, que siempre cuida de mí y que es el motor de mi vida. Por quererme incondicionalmente, apoyarme y darme siempre ánimo, aguantarme en los peores momentos y sacarme una sonrisa cuando más lo he necesitado.

A mis padres, que han sido siempre mi reflejo e inspiración, por creer tantísimo en mí, por desearme siempre lo mejor en esta vida y por, en este caso con más ahínco, todas y cada una de las llamadas telefónicas transmitiéndome su fuerza para alcanzar este objetivo.

A todos, mi eterno agradecimiento.

"El pesimista se queja del viento, el optimista espera que cambie, el realista ajusta las velas". William George Ward (1812-1882).

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS	21
ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS.....	23
I – INTRODUCCIÓN	35
1.1 DEFINICIONES.....	35
1.1.1 Complementos alimenticios	35
1.1.2 Fatiga muscular	36
1.2 β -ALANINA	37
1.2.1 Estructura y propiedades físico-químicas	37
1.2.2 Síntesis y fuentes de β -alanina	39
1.2.3 Farmacocinética de β -Alanina.....	41
1.2.4 Estudios	42
1.2.5 La seguridad	43
1.3 L-HISTIDINA.....	45
1.3.1 Estructura y propiedades físico-químicas.....	45
1.3.2 Farmacocinética de la L-Histidina	48
1.3.3 La seguridad	49
1.4 CARNOSINA.....	49
1.4.1 Estructura química y generalidades.....	49
1.4.2 Funciones fisiológicas y relevancia	52
1.5 INTEGRACIÓN DE LA β -ALANINA, L-HISTIDINA Y CARNOSINA.....	58
1.6 ANTECEDENTES	63
II - JUSTIFICACIÓN	69

III - OBJETIVOS	73
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	73
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	73
IV – MATERIAL Y MÉTODO	77
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	77
4.1.1 Producto de investigación	78
4.1.2 Población de estudio.....	84
4.1.3 Aleatorización de los participantes	86
4.1.4 Cegamiento	87
4.1.5 Lugar y realización del estudio.....	87
4.2 VARIABLES DEL ESTUDIO.....	88
4.2.1 Características demográficas:.....	88
4.2.2 Variables sanguíneas	89
4.2.3 Determinaciones en orina	90
4.2.4 Variables basadas en el test de parestesia:	90
4.3 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO.....	93
4.3.1 Obtención del consentimiento informado.....	93
4.3.2 Seguimiento (intervenciones).....	93
4.3.3 Administración y recogida de muestras.....	96
4.3.4 Procesamiento de las muestras	101
4.4 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS....	104
4.4.1 Análisis no compartimental	104
4.4.2 Análisis compartimental	105
4.4.3 Métodos estadísticos.....	105
4.5 ASPECTOS ÉTICOS	106

4.5.1	Evaluación del comité ético de investigación	106
4.5.2	Hoja de información para el paciente y consentimiento informado	106
4.5.3	Confidencialidad de los datos.....	107
V	RESULTADOS.....	111
5.1	DESARROLLO DEL PRODUCTO DE β -ALA DE LIBERACIÓN CONTROLADA.	111
5.1.1	Selección de β -ALA pura y recubrimiento.....	111
5.1.2	Liberación in vitro.....	112
5.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO	116
5.3	FARMACOCINÉTICA	117
5.3.1	Concentraciones plasmáticas de β -Alanina	117
5.3.2	Análisis farmacocinético no compartimental de β -ALA.....	123
5.3.3	Análisis farmacocinético compartimental de β -ALA	129
5.3.4	Concentraciones plasmáticas de L-Histidina.....	132
5.3.5	Análisis farmacocinético de L-Histidina	138
5.3.6	Concentraciones plasmáticas del resto de aminoácidos	139
5.4	EXCRECIÓN URINARIA DE β -ALANINA	152
5.5	ANÁLISIS FARMACODINÁMICO.	153
5.5.1	Descripción de la intensidad	153
5.5.2	Descripción de los efectos secundarios.....	155
5.5.3	Topografía de los síntomas.....	164
VI	DISCUSIÓN	171
6.1	MECANISMO DE LIBERACIÓN SOSTENIDA	171
6.1.1	Selección de β -ALA pura y recubrimiento.....	171

6.1.2	Liberación in vitro.....	172
6.2	FARMACOCINÉTICA	174
6.2.1	Análisis farmacocinético de β -Alanina. Aspectos generales.	174
6.2.2	Biodisponibilidad de β -Alanina.....	176
6.2.3	Análisis farmacocinético de L-Histidina	180
6.2.4	Concentraciones plasmáticas del resto de aminoácidos	181
6.3	ANÁLISIS FARMACODINÁMICO.	181
6.3.1	Perfil farmacodinámico e histéresis.	181
6.3.2	Descripción cualitativa de la parestesia.....	184
6.3.3	Topografía de los síntomas.....	185
VII	-CONCLUSIONES.....	189
VIII	-LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	193
IX	-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	197
X	-ANEXOS	215

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AAT	Transportadores de aminoácidos
ADP	Adenosín difosfato
AIC	Criterio de información de Alkaike
AU	Unidades arbitrarias
AUC	Area bajo la curva (concentración plasmática-tiempo)
AUEC	Área bajo la curva de efecto
ATP	Adenosín trifosfato
β -ALA	Beta-alanina
1C	Un compartimento
2C	Dos compartimentos
C	Concentración
\hat{C}	Concentración predicha
CARN	Carnosina
Cd^{2+}	Cadmio
Cl	Aclaramiento
C_{last}	Última concentración
Cl/F	Aclaramiento oral
Cu^{2+}	Cobre
CN1	Carnosinasa sérica
CN2	Carnosinasa tisular o dipeptidasa citosólica no específica.
C_{MAX}	Concentración plasmática máxima
Ca^{2+}	Calcio
Co^{2+}	Cobalto
COM	Comprimido
CS	Carnosina sintasa
CV	Coefficiente de variación
D	Dosis
E_{MAX}	Efecto máximo de parestesia
F	Biodisponibilidad
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
Fe^{2+}	Hierro (II)
Fe^{3+}	Hierro (III)
GABA	Ácido gamma-aminobutírico

H ⁺	Hidrogenión o protón de hidrógeno
HCD	Dipéptidos que contienen histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IR	Infrarrojos
ISS	Intensidad de las sensaciones
K _a	Constante de absorción
K _{el}	Constante de eliminación
K _m	Constante de Michaelis
L-His	L-Histidina
MAT	Tiempo medio de absorción
MRT	Tiempo de residencia medio
Mg ²⁺	Magnesio
Mn ²⁺	Manganeso
MrgprD	Receptor D acoplado a la proteína G
Na ⁺	Sodio
Ni ²⁺	Niquel
O ₂	Oxígeno singlete
OH	Hidroxilo
pH	Potencial de Hidrógeno
pKa	Constante de acidez
PAT	Proteína asociada a la topoisomerasa II
PEPT	Transportador de oligopéptidos
POL	Polvo
QLSI	Intensidad de las sensaciones
ROS	Especie de oxígeno reactivo
sd	Desviación estandar
SLC	Transportadores de soluto
SNC	Sistema nervioso central
SSS	Sensaciones de las superficies del cuerpo
t _{1/2}	Tiempo de semivida biológica
TauT	Transportador de Taurina
TE _{MAX}	Tiempo hasta el efecto máximo
T _{LAG}	Tiempo de latencia
T _{MAX}	Tiempo hasta la concentración plasmática máxima
VAS	Puntuación analógica visual
V	Volumen de distribución
V/F	Volumen aparente de distribución en estado estacionario
VO ₂	Cantidad máxima de oxígeno
Zn ²⁺	Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

ÍNDICE DE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la β -ALA (19).....	38
Figura 2. Contenido de Carnosina por kg de peso seco en diferentes alimentos proteicos (28).....	40
Figura 3. Manipulación de la dieta del contenido de CARN muscular (29).....	40
Figura 4. Estructura química de la L-His (66).	45
Figura 5. Reacción de síntesis de la CARN a partir de β -ALA y L-His.....	50
Figura 6. Estructura química de la CARN (98).	50
Figura 7. Roles potenciales de la CARN en las células de los músculos esqueléticos (29).....	52
Figura 8. Formas tautoméricas del anillo imidazólico de CARN (29).	53
Figura 9. Estructuras propuestas del complejo Cu^{2+} - CARN: A: Complejo de Cu^{2+} - CARN propuesto por primera vez por Dobbie y Kermack (83). B: estructuras moleculares del complejo dimérico de CARN de Cu^{2+} $[\text{Cu}_2\text{H}-2\text{L}_2]_0$ y de los dos monómeros $[\text{CuL}]^+ [\text{CuHL}]^{2+}$ (59).	55
Figura 10. CARN como eliminador de radicales OH. [Basado en Tamba y Torreggiani (100)].....	56
Figura 11. Estructuras químicas de la CARN y sus derivados naturales (29).	57
Figura 12. Vías metabólicas de la CARN. Las líneas continuas representan reacciones bien descritas que ocurren en humanos. Las líneas discontinuas representan reacciones que, o bien no ocurren en los seres humanos o no se conocen bien en la actualidad (29).....	58

Figura 13. Posibles vías de absorción intestinal de HCD (29).....	59
Figura 14. Esquema de los puntos de regulación de la CARN/liberación de β -ALA y consecuentemente síntesis de CARN en el músculo esquelético (60)	60
Figura 15. Estudios de eliminación de la CARN del músculo tras la suplementación de β -ALA (30).	63
Figura 16. Producto de prueba BETAFOR3MAX® en formato polvo.....	78
Figura 17 y 18. Equipo piloto Jet Coater 10L: Imagen del tambor rotatorio cerrado y abierto.	78
Figura 19. Equipo piloto Jet Coater 10L: tambor rotatorio desde otra perspectiva y panel de control de parámetros.....	79
Figura 20. Sala del quipo piloto Jet Coater 10L.....	79
Figura 21. Producto de referencia en formato comprimidos	83
Figura 22. Diagrama de flujo	86
Figura 23. Test de parestesia, Intensidad de la sensación (VAS).....	90
Figura 24. Test de parestesia, Intensidad de la sensación (ISS)	91
Figura 25. Test de parestesia, Inventario cualitativo de síntomas leves (QLSI)	91
Figura 26. Test de parestesia, puntuación de la sensibilidad del cuerpo (SSS)	92
Figura 27. Representación del diseño cruzado del estudio.....	94
Figura 28. Cronograma de las intervenciones del estudio.	96
Figura 29, 30, 31 y 32. Composición de los participantes tomando el producto del estudio POL o COM.....	97
Figura 33. Organización temporal con 6 participantes por día.	99
Figura 34, 35 y 36. Composición de las extracciones sanguíneas a los participantes durante los tiempos del estudio marcados.....	100

Figuras 37, 38, 39, 40, 41 y 42. Composición de la preparativa de muestra: Centrifugación	102
Figuras 43, 44, 45, 46 y 47. Composición de la preparativa de muestra: Separación del plasma.	103
Figuras 48, 49 y 50. Distintos tamaños de β -ALA. De arriba a abajo: 40 mesh, 100 mesh y 200 mesh.....	112
Figura 51. Distintos tamaños de β -ALA recubierta. De izquierda a derecha: 40 mesh, 100 mesh y 200 mesh	112
Figura 52. Ratios liberación β -ALA desarrollo 1.....	113
Figura 53. Ratios liberación β -ALA desarrollo 2.....	115
Figura 54. A: Ratios liberación β -ALA desarrollo 3 y B: gráficos residuales.....	116
Figura 55. Perfil farmacocinético plasmático de β -ALA individuales tras la administración oral de una dosis de 8 gramos..	121
Figura 56. Perfil farmacocinético plasmático medio de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos.....	123
Figura 57. Distribución individual de los principales parámetros farmacocinéticos.	127
Figura 58. Gráficos de ajuste de correlación y residuales.....	129
Figura 59. Perfil farmacocinético plasmático de L-His tras la administración oral de POL que contiene 300 mg de L-His y COM que no contiene L-His. Ambas formulaciones contienen 8 gr de β -ALA.....	136
Figura 60. Perfil farmacocinético plasmático promedio de L-His después de la administración oral a voluntarios sanos de los productos POL y COM.....	137
Figura 61. Perfil farmacocinético plasmático del resto de aminoácidos de los sujetos finalmente incluidos después de la administración oral de POL que contiene 8 gr de β -ALA y 300 mg de L-His y COM que contiene 8 gr de β -ALA.	152

- Figura 62. β -ALA en orina en los intervalos de 0-4h, 4-8h y 0-8h después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL y COM. 153
- Figura 63. Perfil intensidad – tiempo del efecto medio obtenidos con las escalas de puntuación analógica visual (A) y de puntuación de intensidad de sensación (B) para ambas formulaciones. AU, unidades arbitrarias. Media y SD..... 154
- Figura 64. Gráficos de histéresis obtenidos con las escalas de puntuación analógica visual (A) y de puntuación de intensidad de sensación (B) para ambas formulaciones. AU, unidades arbitrarias. Media y SD. 155
- Figura 65. Perfil temporal de la intensidad de los síntomas notificados después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL o en COM de liberación sostenida, utilizando el test de síntomas QLSI. Media de intensidad QLSImax, escala 0-4 . 159
- Figura 66. Descripción del número de zonas del cuerpo afectadas tras de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL o COM, utilizando el test ISS de partes del cuerpo. Comparativa por sujetos, escala 0-17 (0-8 h)..... 168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de β -ALA.....	38
Tabla 2. Especificaciones de L-His.....	46
Tabla 3. Especificaciones de CARN.....	51
Tabla 4. Tabla comparativa de características de dipeptidasas con actividad carnosinasa.....	62
Tabla 5. Seguimiento de las visitas.....	88
Tabla 6. Desarrollo del recubrimiento 1 con β -ALA de 40 mesh o 400 μ m.	113
Tabla 7. .Desarrollo del recubrimiento 2 con β -ALA de 100 mesh o 149 μ m	114
Tabla 8. Desarrollo del recubrimiento 3 con β -ALA de 200 mesh o 74 μ m	115
Tabla 9. Datos demográficos de todos los participantes en el estudio	116
Tabla 10. Concentración plasmática por sujetos de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).....	118
Tabla 11. Concentración plasmática por sujetos de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).....	119
Tabla 12. Concentración plasmática promedio de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos.....	122
Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos individuales no compartimentales de la formulación en polvo (POL).....	124
Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos individuales no compartimentales de β -ALA en la formulación en comprimidos (COM).....	125
Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de las formulaciones de polvo (POL) y de comprimidos (COM). Los datos se presentan como media \pm DS. n=11.....	128

Tabla 16. Parámetros de bondad de ajuste a modelos compartimentales: r (coeficiente de correlación entre los valores observados y predichos), S (estimación de la desviación estándar residual), AIC (criterio de información de Akaike) para cada modelo probado: monocompartimental (1C), 1C con tiempo de latencia (1C Tlag), bicompartimental (2C) y 2C con tiempo de latencia (2C Tlag). DF: grados de libertad.	130
Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos compartimentales de las formulaciones de polvo (POL) y comprimidos (COM).....	131
Tabla 18. Concentración plasmática por sujetos de L-His después de la administración oral de 300 mg a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).....	133
Tabla 19. Concentración plasmática por sujetos de L-His después de la administración oral a voluntarios sanos del producto de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM). Los datos representan los niveles basales.....	134
Tabla 20. Concentración plasmática promedio de L-His después de la administración oral a voluntarios sanos.	137
Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos individuales no compartimentales de L-His en la formulación en polvo (POL). La pendiente terminal no pudo calcularse.	138
Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de la formulación de polvo (POL) Los datos se presentan como media \pm DS. n=11	139
Tabla 23. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de ÁCIDO ASPÁRTICO tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.	140
Tabla 24. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de TREONINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	140
Tabla 25. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de SERINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	141
Tabla 26. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de ASPARAGINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	141

Tabla 27. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de ÁCIDO GLUTÁMICO tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	142
Tabla 28. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de GLUTAMINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	142
Tabla 29. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de PROLINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	143
Tabla 30. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de GLICINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	143
Tabla 31. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de ALANINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	144
Tabla 32. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de VALINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	144
Tabla 33. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de METIONINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	145
Tabla 34. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de ISOLEUCINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	145
Tabla 35. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de LEUCINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	146
Tabla 36. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de TIROSINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	146
Tabla 37. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de FENILALANINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	147
Tabla 38. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de LISINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	147
Tabla 39. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de ORNITINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	148
Tabla 40. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de 1-METIL-HISTIDINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.....	148

Tabla 41. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de 3-METIL-HISTIDINA tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.	149
Tabla 42. Recuperación en orina de β -ALA para las formulaciones de polvo (POL) y comprimidos (COM).	152
Tabla 43. Modelo del análisis independiente del efecto de parestesia después de la administración de una dosis de 8 gramos de β -ALA en la formulación POL o en comprimido (COM).	154
Tabla 44. Tiempos individuales de percepción de las primeras sensaciones de parestesia tomando tiempo inicial el momento de la toma de producto).....	156
Tabla 45. Descripción de los síntomas notificados después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL de liberación sostenida, utilizando el test de síntomas QLSI. Media de intensidad QLSI _{max} , escala 0-4 (0-8 h).....	157
Tabla 46. Descripción de los síntomas notificados después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato COM de liberación sostenida, utilizando el test de síntomas QLSI. Media de intensidad QLSI _{max} , escala 0-4 (0-8 h).....	158
Tabla 47. Parámetros farmacodinámicos individuales calculados mediante técnicas no compartimentales de sensaciones percibidas de formulación (POL).	161
Tabla 48. Parámetros farmacodinámicos individuales calculados mediante técnicas no compartimentales de sensaciones percibidas de formulación COM.	162
Tabla 49. Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de sensaciones percibidas en la formulación de polvo (POL) y de comprimidos (COM).....	163
Tabla 50. Número de zonas afectadas después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL de liberación sostenida, utilizando el test de partes del cuerpo.	165
Tabla 51. Número de zonas afectadas después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato COM de liberación sostenida, utilizando el test de partes del cuerpo. ...	166

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Estudios de suplementación con β -alanina.....	215
ANEXO 2. Efectos secundarios según las dosis de β -ALA	217
ANEXO 3. Certificados de análisis de ingredientes y producto final de BETAFOR3MAX®.....	219
ANEXO 4. Farmacopea Europea. 2.9.3- Test de disolución para formas sólidas de dosificación.	223
ANEXO 5. Test de parestesia.....	224
ANEXO 6. Hoja de consentimiento informado.....	226
ANEXO 7. Comité de Ética de Investigación de la Universidad Católica de Murcia (código CE021902).....	228
ANEXO 8. .Certificados de análisis de β -ALA de distintos tamaños.....	229
ANEXO 9. Concentración plasmática por sujetos del resto de aminoácidos después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL) y formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).	232

I - INTRODUCCIÓN

I – INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIONES

1.1.1 Complementos alimenticios

Los complementos alimenticios son muy populares en todo el mundo, especialmente en Europa y EE.UU. Se definen en la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo como fuentes concentradas de nutrientes u otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico, cuya finalidad es complementar la dieta normal. Se comercializan en forma de dosis, por ejemplo, como píldoras, comprimidos, cápsulas o líquidos en dosis medidas, etc. Los complementos no sustituyen una dieta equilibrada (1). Mientras que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE.UU., los define como un producto destinado a la ingestión que contiene un ingrediente dietético destinado a agregar un mayor valor nutricional para (complementar) la dieta. Se pueden encontrar en muchas formas de administración, como comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, cápsulas de gel, líquidos o polvos. Algunos complementos alimenticios pueden ayudar a asegurar que se obtenga una ingesta dietética adecuada de nutrientes esenciales, otros pueden ayudar a reducir riesgo de enfermedades (2).

Los complementos alimenticios en el mercado actual están enfocados a mejorar las propiedades nutricionales, fisiológicas o efectos ergogénicos. Los aminoácidos son unos de los complementos más populares debido a que, además de prevenir la deficiencia nutricional, mejoran la función muscular y disminuyen los daños musculares, cuya consecuencia final es mejorar el rendimiento en el ejercicio físico. Los atletas son por lo tanto, una población focal de particular interés (3). Sin embargo, es difícil tener una idea clara de qué aminoácidos tienen un impacto ergogénico real. Aunque se han realizado estudios clínicos que evalúan efectos específicos de aminoácidos concretos en atletas (glutamina, arginina, leucina, etc.), es la ingesta crónica de la β -alanina (β -ALA) la única que ha demostrado un efecto ergogénico en atletas, con la literatura más consistente y

extensa. Si bien la β -ALA está considerada como una buena ayuda ergogénica para ejercicios de entre 30 segundos y 10 minutos (4) de intensidad, pero ineficaz para ejercicio de resistencia, todavía se necesita mucha investigación para obtener suficiente evidencia y poder recomendar cualquier otro aminoácido específico para su uso por atletas. Finalmente, también conviene remarcar alguna evidencia emergente de su posible papel terapéutico en el envejecimiento, las enfermedades neurológicas, la diabetes y el cáncer (5).

Así, entre una gran cantidad de complementos alimenticios disponibles para la mejora del rendimiento, la β -ALA es uno de los complementos más empleados entre los atletas (6): el 61% de deportistas de equipos competitivos recientemente encuestados indicaron el uso de β -ALA (7).

1.1.2 Fatiga muscular

La actividad muscular a través del entrenamiento o cualquier otro estímulo siempre provoca una disminución de glucógeno intramuscular, fosfocreatina y agotamiento de las reservas de ATP, así como aumento intracelular de iones fosfato, lactato e hidrógeno inorgánico, $[H^+]$ (8). Estos factores contribuyen a la fatiga periférica que aparece cuando se produce el agotamiento de las reservas de energía, o se acumulan subproductos del catabolismo (por ejemplo, ADP, protones y Mg^{2+}) provocando que el mecanismo contráctil del músculo se deteriore durante el ejercicio (9,10). De hecho, durante las contracciones musculares intensas, el ATP no mitocondrial se usa ampliamente generando ADP (11) y aumentando la producción de $[H^+]$, su acumulación da lugar a una disminución del pH intracelular que afecta la fosforilación oxidativa mediada por enzimas debido a la inactivación de enzimas glucolíticas (por ejemplo, fosfofructoquinasa) así como a una disminución del flujo glucolítico (12). Estos cambios conducen a una reducción de la eficiencia contráctil de los miofilamentos y pérdida de rendimiento muscular, (13) coordinación motora subóptima (14) y finalmente a fatiga (15). Esta fatiga periférica conduce a la activación de los nociceptores, que envían señales de dolor al sistema nervioso central para que las interprete y tome las medidas adecuadas. Por otro lado, el ejercicio intenso, la fatiga y el daño muscular están asociados con

el estrés oxidativo. Las fuentes de oxígeno reactivo (ROS) durante el ejercicio provocan la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y de neutrófilos activados, entre otros. Asimismo, el ejercicio intenso también puede inducir reacciones inflamatorias similares a la respuesta de fase aguda que ocurre en la lesión, que contribuye a un aumento en la producción de ROS, particularmente durante los ejercicios de fatiga.

Para revertir o al menos disminuir este proceso, suelen administrarse dosis de β -ALA que al ser ingerida tras su absorción intestinal accede al torrente sanguíneo donde puede combinarse con la L-histidina (L-His) para formar un dipéptido llamado carnosina (CARN) que ejerce propiedades amortiguadoras del pH (16,17), elimina ROS y protege contra la peroxidación lipídica. Adicionalmente, unos pocos estudios sugieren que ciertos antioxidantes pueden proteger contra la lesión muscular durante el ejercicio y mejorar el rendimiento general (18).

La popularidad de la β -ALA se debe, por tanto, a su gran capacidad para mejorar la capacidad de amortiguación muscular intracelular, lo que retrasa la fatiga durante el ejercicio de alta intensidad al aumentar el contenido de dicha CARN (6).

1.2 β -ALANINA

1.2.1 Estructura y propiedades físico-químicas

Todos los aminoácidos que comprenden proteínas son α -aminoácidos, lo que significa que el grupo amino en la estructura del aminoácido está unido al grupo de carbono adyacente al grupo carboxilo. Los β -aminoácidos contienen su grupo amino en el carbono siguiente a esa posición, como es el caso de la β -ALA (18). Se trata de un aminoácido no esencial y no proteico producido en el hígado (5), precursor de los péptidos CARN (β -alanina-L-histidina), anserina (β -alanina-N-metilhistidina) y balenina (β -alanina-N-tau-metilhistidina) u ophidina (β -alanina-3-metilhistidina). Es uno de los cinco β -aminoácidos que se encuentran en los mamíferos, los otros cuatro son taurina (contiene un grupo de ácido sulfónico

en lugar del grupo ácido carboxílico), R- β -aminoisobutirato, S- β -aminoisobutirato y β -leucina (18).

A continuación, se representa su estructura química y sus propiedades más importantes (Figura 1 y Tabla 1):

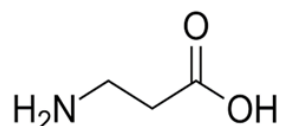


Figura 1. Estructura química de la β -ALA (19).

Tabla 1. Especificaciones de β -Alanina (20):

*Fórmula empírica	C3H7NO2
*Fórmula lineal	NH2CH2CH2CO2H
* Naturaleza	Polvo color blanco con sabor ligeramente dulce
* Peso molecular	89,09 g/mol
* Nombre IUPAC	Ácido 3-aminopropanoico
*Nº CAS	107-95-9
*Punto de fusión	200 °C
*Solubilidad	Soluble en agua , ligeramente soluble en etanol, insoluble en éter y acetona
*pKa	3,63 (a 5°C)

Una vez ingerido, ya sea a través de los alimentos o como un suplemento dietético, se combina con L-His dentro del músculo esquelético y otros órganos para formar CARN. Harris et al. (2006) fueron los primeros en demostrar que la β -ALA aumenta significativamente el contenido en CARN (21). Cuando la β -ALA

se combina con la L-His, el pKa del anillo de imidazol del residuo de L-His se incrementa a 6.83, lo que le permite actuar como un tampón de pH intracelular altamente eficaz (22). Se considera que la β -ALA es el paso limitante de la velocidad en la síntesis de la CARN muscular, basado en que la concentración de ésta en los tejidos es mucho menor que la de L-His (23). Por lo tanto, el objetivo principal de la suplementación con β -ALA es aumentar el contenido de CARN en el músculo esquelético, mejorando así la capacidad de tamponamiento intracelular, permitiendo una mayor tolerancia a la actividad anaeróbica sostenida (6).

1.2.2 Síntesis y fuentes de β -alanina

La β -ALA es un aminoácido no esencial, lo que significa que puede producirse en el cuerpo. Se sintetiza en el hígado mediante degradación del uracilo (24) a través de la enzima β -ureidopropionasa, tercera enzima en la vía catabólica de las bases de pirimidina uracilo y timina, también conocida como β -ALA sintasa (18).

Otra fuente de aporte es a través de la dieta con alimentos proteicos de origen animal como carne roja, pescado y aves de corral, en forma de compuestos que la contienen como la CARN (Figura 2) (25). La CARN en sí misma cuando se usa como un suplemento nutricional se hidroliza rápidamente en el plasma (18).

Los niveles de CARN en el músculo esquelético de los omnívoros son significativamente más altos que los observados en los vegetarianos (26,27). En los vegetarianos, la única fuente de β -ALA para la síntesis muscular es la degradación del uracilo en el hígado. Este proceso es demasiado lento o la disponibilidad de uracilo para la degradación es muy limitada para mantener niveles normales de síntesis de CARN en el músculo. La Figura 3 proporciona el contenido de CARN en función de la ingesta de β -ALA.

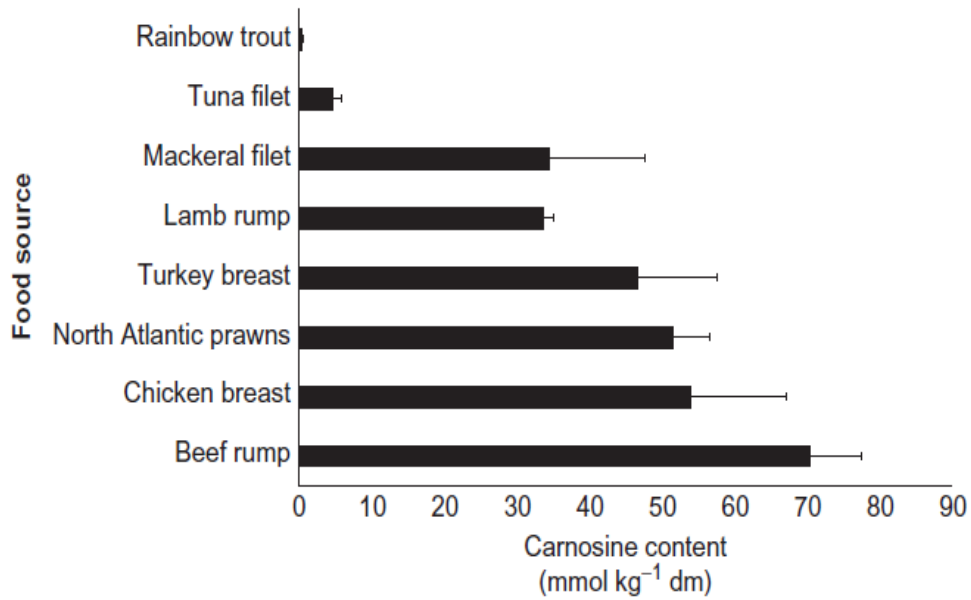


Figura 2. Contenido de Carnosina por kg de peso seco en diferentes alimentos proteicos (28).

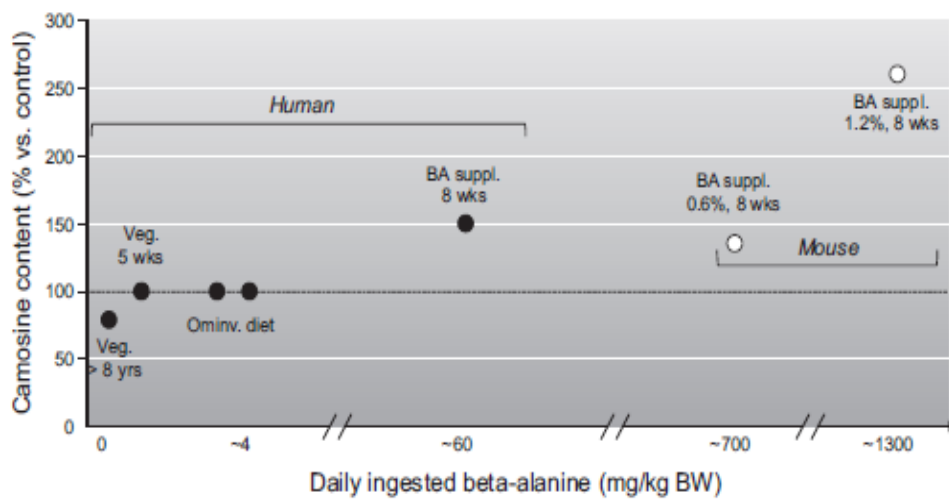


Figura 3. Manipulación de la dieta del contenido de CARN muscular (29).

1.2.3 Farmacocinética de β -Alanina

La β -ALA se absorbe rápidamente en sangre y aunque los seres humanos han desarrollado procesos de síntesis endógena de β -ALA en el hígado a partir de la degradación del uracilo (24), la administración óptima de β -ALA (principalmente carne o suplementos) es necesaria para disponer de β -ALA suficiente para la síntesis de CARN muscular (30). Desde un punto de vista mecanístico, el transporte de β -ALA a través del intestino se logra mediante el transportador de aminoácidos H^+ -acoplado PAT1 / SLC36A1, que también se conoce como el portador de aminoácidos (31) y tiene lugar mayoritariamente en la zona distal del intestino.

Al ingerir 10 mg/kg de β -ALA, lo que equivaldría a una dosis de 800 mg para un adulto de 80 kg, se aumentan las concentraciones de β -ALA en el plasma alcanzándose un pico entre 30 y 40 minutos después de su ingesta (32). En cuanto a su semivida biológica, (tiempo en el que hay una reducción del 50% de la concentración plasmática) es de 25 minutos, aunque se ha visto que permanece con concentraciones eficaces en la circulación durante aproximadamente 3 horas desde la ingesta (21).

La incorporación y transporte de β -ALA a la célula muscular es a través de un transportador de β -aminoácidos, dependiente de sodio y cloruro con una constante de afinidad del transportador de β -ALA, K_m de 40 μM , concretamente el transportador 2 (PEPT2 / SLC15A2) y el transportador de taurina (TauT / SLC616) (30).

Por tanto, los aumentos en la CARN muscular están directamente relacionados con la ingestión de β -ALA (30). En un estudio de Hill et al. (2007) (33), examinaron 25 hombres físicamente activos utilizando un protocolo de dosificación inicial de 4,0 g/día durante la primera semana que luego aumentaron en 800 mg/semana hasta la semana cuatro y se mantuvo en 6,4 g/día durante seis semanas adicionales. Las dosis administradas durante las primeras cuatro semanas dieron como resultado un aumento del 58.8% en la concentración de CARN muscular, mientras que un aumento adicional del 21% se observó en la

semana décima. (6) Se cree que la síntesis de la CARN muscular sigue una cinética de orden cero con respecto a la disponibilidad de β -ALA (32,34), mientras que la disminución en la CARN muscular sigue la cinética de primer orden (30,35). La combinación de ambas cinéticas hará que en este modelo se alcance un estado estacionario con cualquier dosis proporcionada (22). Everaert et al. (2011) (26) no observaron una relación significativa entre el consumo de β -ALA en la dieta y el contenido de CARN muscular, por lo tanto, la suplementación con β -ALA puede ser el medio más eficaz para aumentar el contenido de CARN muscular (6).

1.2.4 Estudios

Recientemente ha crecido el interés por el uso de β -ALA en ciencias del deporte. Se considera uno de los suplementos más populares que utilizan los atletas de competición debido a su capacidad para mejorar el rendimiento físico en una serie de deportes mixtos y pruebas de ejercicio por parte de individuos entrenados y desentrenados (6,16,36–39). Como precursor de la CARN, ayuda a retrasar la fatiga del músculo esquelético (18), siendo su literatura sobre los efectos ergogénicos de β -ALA la más consistente.

Su eficacia se ha resumido en una serie de revisiones recientes (23,37,38). En el primer meta-análisis en 2012, se determinó que la β -ALA era eficaz para ejercicios con una duración de entre 1 y 4 minutos de intensidad, para mejorar el rendimiento en deportistas (36). Cuatro años después, en 2016, Saunders et al (40) realizaron otro meta-análisis en el que ajustaron el rango de aplicabilidad a ejercicios que se realizaban entre 30 segundos y 10 minutos de duración. Concluían que la β -ALA podría ser una buena ayuda ergogénica para los ejercicios de intensidad durante dicho intervalo de duración, aunque no efectivo para el ejercicio de resistencia (5). Algunos ejemplos de deportes en los que se ha estudiado el rendimiento a través de la suplementación con β -ALA son el ciclismo, uno de los deportes con resultados más beneficiosos, entre ellos un estudio con pruebas de 1, 4 y 10 km, obteniendo resultados favorables en la prueba de 4 km (40), que se confirman con otro estudio (41) en el que la suplementación con β -ALA aumentó el tiempo hasta el agotamiento

concomitante con una capacidad anaeróbica aumentada durante el ciclismo de intensidad supramáxima, durante una prueba también de 4 km de ciclismo, lo que resultó en un rendimiento general mejorado. La natación, otro de los deportes más estudiados, entre ellos un estudio de 100 y 200 m (42), el combate como judo o boxeo (43,44) y el waterpolo entre 4-6 semanas con suplementación entre 4,8 - 6,4 g/días (45-47).

En cuanto a su forma de administración en formulaciones de liberación sostenida, un estudio con una ingesta de 1,6 g de un comprimido de β -ALA de liberación sostenida dio como resultado una concentración plasmática máxima menor que la misma dosis de una cápsula de β -ALA pura. Asimismo, el tiempo para alcanzar la concentración máxima fue mayor (48). Sin embargo, no se observaron diferencias en su biodisponibilidad al comparar las respectivas áreas bajo la curva concentración plasmática-tiempo (AUC).

1.2.5 La seguridad

Teniendo en cuenta que la β -ALA es un aminoácido de origen natural con un importante papel fisiológico en el cuerpo, se trata de un suplemento muy seguro de usar (6). El consumo de β -ALA con las pautas de suplementación empleadas hasta el momento no suponen ningún riesgo para la salud, y su uso es seguro, ya que dispone de elevada evidencia de seguridad (49-51).

El único factor que limita la ingesta de β -ALA es que, en dosis agudas genera una incómoda sensación de duración aproximada de 1 hora, conocida como parestesia (32). La parestesia se puede definir como una sensación de entumecimiento u hormigueo en la piel y sus síntomas generalmente desaparecen dentro de los 60-90 min después de la administración de suplementos (34). Esta sensación se da comúnmente entre individuos cuando consumen β -ALA a dosis mayores 800 mg en una forma de liberación no sostenida (32). Se piensa que ocurre como consecuencia de la activación de una vía neural dependiente de histamina, mediante la unión de la β -ALA a los receptores neuronales periféricos MrgprD, que se expresa en las terminaciones neurales cutáneas de la piel provocando picor, hormigueo o irritación en la piel (52). Para evitar esto, se han

desarrollado comprimidos de β -ALA de liberación prolongada que dan como resultado una cinética de absorción más lenta y que reducen la incidencia de parestesia (48).

En unos primeros estudios, Harris et al. En el 2006, (21) observaron que la administración aguda de una dosis de 3.2 g de β -ALA produjo sensaciones de parestesia transitorias en la piel con síntomas que comenzaron a partir de los 20 minutos y duraron hasta una hora. Para evitar estos síntomas, las dosis puras de β -ALA se dividieron en fracciones de 800 mg, las cuales fueron administradas 4 veces al día por una duración total de 2-4 semanas, y así consiguieron que sólo un 25% de los sujetos reportaran síntomas de parestesia leves. En este mismo estudio no encontraron cambios en electrocardiograma, bioquímica sanguínea y datos de seguridad hematológica tras 4 semanas. Tampoco hubo cambios en otros estudios con protocolos de suplementación más largos (8-12 semanas) usando distintas dosis de entre 0.8 y 3.2 g/día, tanto en jóvenes (34) como en poblaciones de adultos mayores (53,54). En un meta-análisis llevado a cabo por Eimear et al (55), concluyeron que la parestesia ocurre con mayor frecuencia y/o intensidad en mujeres, asiáticas, con peso menor de 75 kg, en comparación con hombres, caucásicos, de peso mayor de 85 kg. Por otra parte, Church et al. (2017) (56) no encontraron diferencias en los síntomas de parestesia entre los participantes que consumieron el placebo y los que consumieron una dosis diaria de 12 g de β -ALA de liberación prolongada distribuidos en cuatro dosis de 3 g al día, siendo ésta la dosis más alta dada hasta el momento en un estudio. A pesar de todos estos estudios con resultados positivos, se desconoce el efecto a largo plazo de la suplementación con β -ALA (6).

Por lo tanto, la administración oral de β -ALA en dosis mayores a 800 mg, ha demostrado causar estas sensaciones transitorias de hormigueo que tienen una duración de entre 60 y 90 minutos, relacionadas con mecanismos cinéticos de la β -ALA en plasma (30).

Para evaluar la parestesia, se llevan a cabo unos cuestionarios sensoriales durante las extracciones, que se basan en procedimientos para evaluar los efectos secundarios con distintos tipos de escala de donde se obtiene una percepción de

la intensidad, categoría de la sensación, distribución de sensaciones en un cuestionario corporal y apariencia visual (57).

1.3 L-HISTIDINA

1.3.1 Estructura y propiedades físico-químicas

Se trata de un α -aminoácido esencial en humanos y otros mamíferos, con un grupo funcional imidazol que le aportará la mayoría de sus propiedades. Fue aislada por primera vez por el médico alemán Albrecht Kossel en 1896 (58).

Las fuentes dietéticas probablemente representan la mayor parte de la L-His en el cuerpo (58). La Organización Mundial de la Salud sugiere que la cantidad diaria recomendada de L-His para adultos es de 12 mg / kg, o 840 mg en un adulto de 70 kg (59). La L-His plasmática en adultos normales en ayunas varía de aproximadamente 4 a 20 mg/L, o de 26 a 130 μ M (60–64). Como con la mayoría de los aminoácidos, las concentraciones intracelulares de L-His son mayores que las de los fluidos extracelulares. Así, un estudio encontró una L-His en plasma de $80 \pm 12 \mu\text{mol/L}$ en sujetos masculinos normales, mientras que la L-His en tejido muscular homogeneizado de estos sujetos fue de $370 \pm 14,5 \mu\text{mol/L}$ (64).

A continuación, se representa su estructura química donde cabe destacar el anillo imidazol de carácter básico, y algunas de sus propiedades más importantes (Figura 4 y Tabla 2):

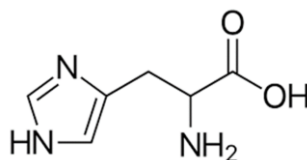


Figura 4. Estructura química de la L-His (65).

Tabla 2. Especificaciones de L-His (66):

*Fórmula empírica	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂
* Naturaleza	Polvo cristalino o blanco, inodoro con sabor dulce
* Peso molecular	155,15 g/mol
* Nombre IUPAC	(2 S) -2-amino-3- (1 H -imidazol-5-il) propanoico
*Nº CAS	71-00-1
*Punto de fusión	287 °C
*Solubilidad	Soluble en agua. Insoluble en éter etílico, acetona; ligeramente soluble en etanol
*pKa	2,76 (a 0°C)

Fisiológicamente, se trata de un precursor de la biosíntesis de histamina y CARN, con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de varios dipéptidos biológicamente importantes (58), que incluyen CARN (β -alanil-L-histidina), anserina (β -alanil-3-metil-L-histidina) y homocarnosina (l-aminobutiril-L-histidina) (67).

Sus propiedades como antiinflamatorio se atribuyen a la capacidad del anillo de imidazol para secuestrar especies de oxígeno reactivo (ROS) generadas por las células durante la respuesta inflamatoria aguda (68). Se trata de un neutralizante del radical hidroxilo (69) y oxígeno singlete (forma molecular excitada energéticamente, O₂). En el primer caso, interactuando químicamente al interferir con las reacciones redox que involucran a los iones metálicos que producen el radical hidroxilo, y en el segundo caso, por interacciones directas del anillo imidazol de la L-His con el oxígeno singlete (58):

Radical hidroxilo: La L-His fue uno de los eliminadores más eficaces entre los 29 compuestos biológicos probados, junto con otros aminoácidos, proteínas albúminas, colágeno e histonas (69), al ser estos agregados en estudios *in vitro* de "atrapamiento de espín" utilizando química Fentontype para generar el radical hidroxilo, esto es, un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo (OH·) usando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) catalizado con metales de transición, generalmente hierro.

Erickson y Hultin sugirieron que, la capacidad de la L-His para inhibir la peroxidación lipídica puede deberse a su capacidad para coordinarse con el hierro, evitando así la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ (70,71). La L-His se une y, en dosis altas, modula la absorción de metales como el zinc, el cobre, y el hierro (58).

Oxígeno singlete: Se trata de una especie de oxígeno tóxica no radicalaria biológicamente importante que es altamente reactiva debido a un electrón excitado promovido a un orbital de mayor energía (72). El oxígeno singlete está implicado en gran parte del daño tisular producido por el anión superóxido a través de la reacción clásica de Haber-Weiss (reacción del superóxido con peróxido de hidrógeno para producir oxígeno molecular y un OH·) (73), además de en procesos patológicos que van desde la lesión por reperusión de isquemia hasta el envejecimiento cutáneo inducido por luz ultravioleta y los efectos de cloración en el agua (67,74–80).

La L-His se trata del aminoácido más activo en la captación de oxígeno singlete (81). En general la constante de velocidad química para la reacción de L-His con oxígeno singlete se ha calculado en el rango de 4×10^7 a 1×10^8 M⁻¹s⁻¹. (81,82). El atrapador hidrosoluble de L-His no es un inhibidor físico, sino que interactúa químicamente con el oxígeno singlete a través de un endoperóxido (82).

La eficacia de la L-His como secuestrante de especies tóxicas de oxígeno, particularmente oxígeno singlete, ha llevado a investigar su eficacia como agente antioxidante citoprotector en modelos no clínicos de inflamación mediada por estas especies (58).

Por lo tanto, como ya hemos visto, la L-His es un metabolito esencial en la síntesis de CARN, combinándose con la β -ALA, y aunque no se trate del metabolito limitante, que en este caso sería la B-ALA (83), aporta importantes propiedades (58).

1.3.2 Farmacocinética de la L-Histidina

La L-His se absorbe rápidamente, y la biodisponibilidad de las dosis orales alcanza el 80% o más. Las concentraciones plasmáticas máximas se observan aproximadamente 1 hora después de la administración oral y dosis intravenosas, y el aclaramiento es similar por ambas vías de administración (60,61,84). Un análisis de los datos de la literatura sugiere que la relación de la dosis de L-His (oral o intravenosa) y la concentración plasmática máxima es lineal hasta al menos dosis de 200 mg/kg (M. Wade, datos no publicados) (58).

Sitton et al (60) administraron unos 6,4 g (100 mg/kg) de L-His a trece adultos y calcularon una concentración plasmática máxima 8,8 veces por encima del valor basal, un tiempo hasta la concentración plasmática máxima de $0,72 \pm 0,04$ horas y una semivida biológica de $1,69 \pm 0,19$ horas. En otro estudio complementario, se administraron dosis orales de 50 mg/kg a seis mujeres normales, lo que resultó en una concentración plasmática 4,7 veces superior al valor inicial y un tiempo de semivida de $1,14 \pm 0,13$ horas (60). Otros estudios de dosis orales de L-His administradas a sujetos normales han mostrado absorción y aclaramiento similares y han demostrado que dosis orales tan bajas como 3,7 g pueden producir aumentos en L-His en plasma 1,35 veces por encima del valor inicial al menos 4 horas después de la dosificación (62,63,85).

Las vías implicadas en la biotransformación de L-His humana se han descrito detalladamente (58,62,86). La L-His es metabolizada a urocanato por la enzima histidasa (amidonilasa histidina) principalmente en el hígado y la piel. En el hígado, el urocanato se metaboliza a glutamato en una serie de reacciones iniciadas por la enzima urocanasa mientras que se acumula en la piel al carecer de urocanasa donde puede isomerizarse en cis-urocanato en presencia de radiación

ultravioleta, ejerciendo un papel protector a la radiación ultravioleta de la hipersensibilidad de contacto (87,88). Por otra parte, la L-His también puede descarboxilarse enzimáticamente a histamina en un porcentaje muy bajo (0,008-0,02%)(89). Es importante señalar que se han atribuido efectos conductuales debidos al aumento de histamina cerebral después de dosis grandes de L-His administradas en roedores. Sin embargo, estos efectos fisiológicos atribuibles a la histamina no se han observado en humanos, ni siquiera con grandes dosis orales o dosis intravenosas de L-His (58).

La L-His también presenta excreción renal y se encontró inalterada junto con urocanato, ácido imidazolpropiónico, ácido imidazolacético y ácido imidazoláctico en orina (62).

1.3.3 La seguridad

La administración de L-His no conlleva problemas de seguridad relacionados con la dosificación aguda o crónica. Así, la administración intravenosa de 30 g en 30 minutos no produjo ningún efecto indeseado (90) y tras la administración oral crónica en el rango de 5 a 10 g/día en pacientes con artritis reumatoide tampoco se mostró ningún problema de seguridad (91). Estudios clínicos de carcinogenicidad de 104 semanas en rata no han mostrado potencial carcinogénico en dosis de hasta el 2,5% de la dieta. Otros estudios metabólicos, con dosis de aproximadamente 2000 mg/kg/día durante 98 días en rata (92) y 330 días en ratón, (93) y aproximadamente 3000 mg/kg durante 320 días en monos recién nacidos (94) han sido completamente seguros sin ningún tipo de toxicidad. (58).

1.4 CARNOSINA

1.4.1 Estructura química y generalidades

La carnosina (CARN) (β -alanil-L-histidina) es un dipéptido citoplasmático compuesto por el aminoácido esencial L-His y el aminoácido no esencial natural β -ALA (Figura 5) (30). La CARN fue identificada por primera vez en extracto de

músculo de vaca hace más de 100 años por el bioquímico ruso Gulewitsch (95). Dada su alta concentración en el músculo, fue nombrado como carno, que traducido del latín significa "carne / carne" (30). Está presente en tejidos excitables, sobre todo en tejido muscular con concentraciones similares a la fosforilcreatina, la creatina y el ATP (96) y en menor concentración en el sistema nervioso central (21).

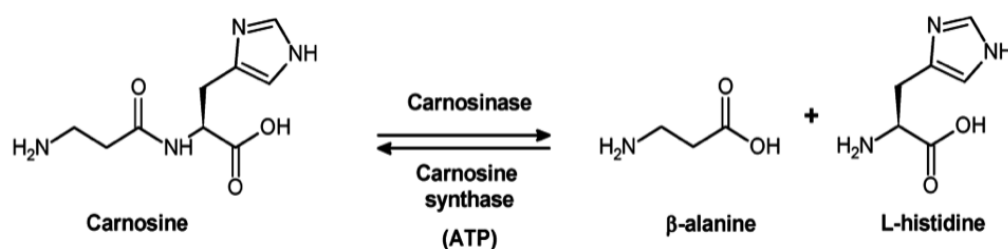


Figura 5. Reacción de síntesis de la CARN a partir de β -ALA y L-His.

A continuación, se representa su estructura química y sus propiedades más importantes (Figura 6 y Tabla 3):

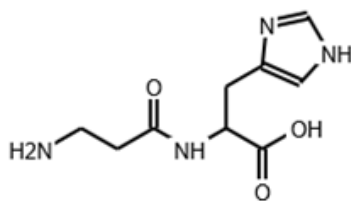


Figura 6. Estructura química de la CARN (97).

El peso molecular de la enzima es de 57 kDa; pI 5.5; y el valor constante de Michaelis (K_m) para la CARN es inferior a 0,4 mM/ L (68).

Tabla 3. Especificaciones de CARN (68):

*Fórmula empírica	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₃
* Naturaleza	Sólido
* Peso molecular	226,23 g/mol
* Nombre IUPAC	β -alanil-L-histidina
*Nº CAS	305-84-0
*Punto de fusión	253-256 °C
*Solubilidad	384 mg/mL

La CARN presenta diversas funciones fisiológicas incluyendo la de antioxidante, prevención de reacciones de glicación en proteínas, incremento de la sensibilidad del calcio en la contracción muscular y una gran capacidad de tamponamiento intracelular de hidrogeniones (H⁺) (16,17). Asimismo, se ha considerado como un eliminador/supresor natural de especies reactivas de oxígeno, productos finales de glicación avanzada y aldehídos reactivos (Figura 7). Su distribución tisular es en el rango milimolar en el músculo esquelético y el bulbo olfatorio. La CARN es medible en otros tejidos como el cerebro y fluidos corporales, pero en concentraciones de 10 a 1,000 veces más bajas que en el músculo (29). Estas características le confieren posibles efectos terapéuticos, particularmente en aquellas condiciones originadas por estrés oxidativo exacerbado, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes y senescencia (Figura 7) (98).

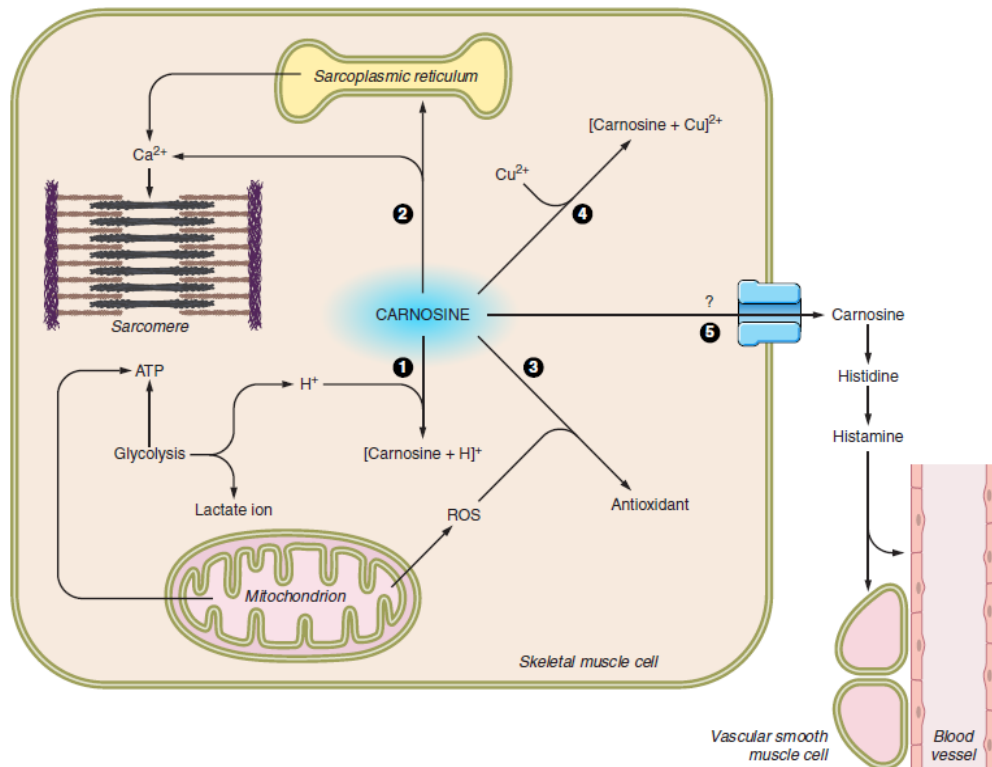


Figura 7. Roles potenciales de la CARN en las células de los músculos esqueléticos (29)

De todas sus funciones fisiológicas, son dependientes de la disponibilidad de β -ALA y L-His su capacidad tampón para regular el equilibrio ácido-base, actividad quelante de iones metálicos y neutralización de ROS entre otras.

1.4.2 Funciones fisiológicas y relevancia

1.4.2.1 Función moduladora del pH intracelular

El papel de la CARN como tampón de pH en el músculo esquelético tiene relevancia debido a que, durante las contracciones musculares de alta intensidad, la glucólisis anaeróbica conduce a la producción de ácido láctico que se disocia inmediatamente en protones (H^+) e iones lactato a valores fisiológicos de pH. La

acidosis resultante puede alcanzar valores de pH de 6.5 y menores y a menudo se ha asociado con fatiga contráctil muscular, aunque el papel de la acidosis en la fatiga muscular sigue siendo un tema de debate (13,99).

Por otro lado, investigaciones recientes han sugerido que la CARN intramuscular también puede actuar como un intercambiador difusible de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ a nivel del sarcómero, aumentando la producción de fuerza del músculo esquelético (100,101). Debido a que la CARN puede unir ambos, H^+ y Ca^{2+} , el aumento de la unión de H^+ a la CARN puede inducir la descarga de Ca^{2+} en el sarcómero, aumentando posteriormente la formación de puentes cruzados y la producción de fuerza (6). Se trata de un regulador del acoplamiento excitación-contracción muscular a través del aumento de la sensibilidad al calcio (102).

Mecánicamente, el anillo imidazol de la L-His lo hace altamente polar, muy soluble en agua (103). En la CARN, este anillo regula la actividad tampón debido a que los valores de pKa de la CARN son muy cercanos a 7,0, por lo que su capacidad de secuestro de protones es alta (29,104) Además, la CARN tiene otros dos grupos ionizables: el grupo carboxílico (pKa 2.76) y el grupo amino de la β -ALA (pKa 9.32) (105), por lo que a pH fisiológico la CARN se encuentra en la forma zwitteriónica con diferentes porcentajes para cada tautómero (Figura 8).

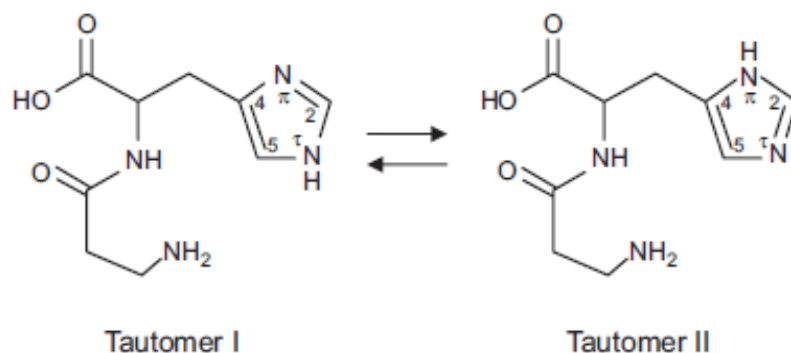


Figura 8. Formas tautoméricas del anillo imidazólico de CARN (29).

A pH entre 7 y 9, el tautómero I es la especie predominante (75%) debido a su mayor estabilidad energética en comparación con el tautómero II (106), existiendo un equilibrio entre las dos formas a pH neutro (107) que se vería afectado por la formación de complejos de iones metálicos y dímeros de Cu (II). En este caso el tautómero II predomina por la implicación del N en la quelación de metales (108).

1.4.2.2 Actividad quelante de iones metálicos

La CARN tiene una gran capacidad para formar complejos con Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} , destacando los complejos de cobre y zinc por su implicación en la capacidad tamponadora y su actividad farmacológica ante lesiones de las mucosas respectivamente:

Complejo de cobre-carnosina: Su interés radica en la capacidad para amortiguar los cambios de pH según varios modelos del complejo Cu^{2+} - CARN en solución acuosa incluyendo una estructura del complejo en la que el Cu^{2+} estaría unido a un N imidazólico y a los N amino y péptido, formando dos anillos quelatos de seis miembros (Figura 9-A) (109). Mecanísticamente, la forma monomérica presenta el Cu^{2+} unido al N imidazólico y al aumentar el pH, los N amino y péptido se desprotonan y se unirían al metal (110). Esta forma monomérica estaría en equilibrio con una forma dimerica (Figura 9-B) donde el Cu^{2+} estaría unido al grupo amino, el N peptídico, un átomo de oxígeno carboxílico y un N imidazólico de la segunda molécula de péptido (107,108,110,111). La especie dimerica $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]^0$ existe en equilibrio con los complejos monoméricos $[\text{CuLH}]^{2+}$ y $[\text{CuL}]^{1+}$ que estaría presentes a un pH más bajo (107). Sin embargo, el complejo del dímero es insignificante *in vivo*, mientras que la presencia de una especie monomérica se ha podido confirmar (112).

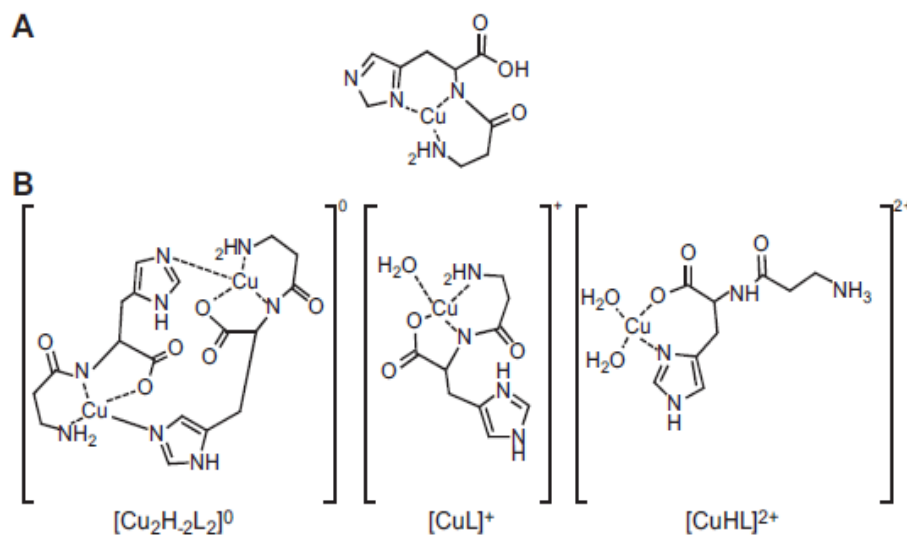


Figura 9. Estructuras propuestas del complejo Cu²⁺ - CARN: A: Complejo de Cu²⁺ - CARN propuesto por primera vez por Dobbie y Kermack (83). B: estructuras moleculares del complejo dimérico de CARN de Cu²⁺ [Cu₂H₂L₂]⁰ y de los dos monómeros [CuL]⁺ [CuHL]²⁺ (59).

Complejo zinc-CARN: El complejo de Zn²⁺ -CARN es de gran interés por su implicación farmacológica (113). Así, el complejo Polaprezinc o Z-103 protege contra las lesiones de la mucosa (114,115) y es eficaz contra la gastritis asociada a *Helicobacter pylori* (116). De forma similar al Cu²⁺, el complejo de Zn²⁺ -CARN el dímero es la especie más prevalente a pH neutro (117), junto con el complejo monomérico cargado, [ZnHL]²⁺ (108) y en condiciones ácidas predomina el complejo monomérico, [ZnL]⁺.

1.4.2.3 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de la CARN fue primero estudiada por Boldyrev et al. (118–120) y está mediada por diferentes mecanismos que implican quelación de iones metálicos y eliminación de especies de oxígeno reactivo (ROS) y radicales peroxilo (29).

Reacción con ROS: La CARN forma un complejo con el radical superóxido que cambia la reactividad del $O_2^{\cdot-}$ (121) y de forma similar con los radicales OH (Figura 10) (122). La reacción puede tener lugar con la presencia de cobre por lo que es el grupo imidazol el sitio preferido para la unión a OH en presencia de cobre. Cabe destacar que esta reacción es dos a cuatro veces más rápida con la CARN que la L-His libre (123).

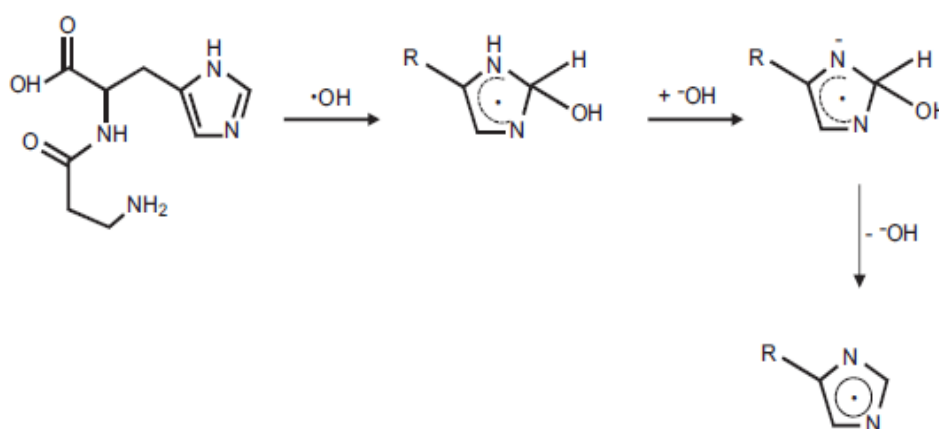


Figura 10. CARN como eliminador de radicales OH. [Basado en Tamba y Torreggiani (100)]

Reacción con radicales peroxilo: La capacidad de la CARN para eliminar radicales peroxilo fue identificada y confirmada *in vitro* (67,124,125) y presenta una capacidad de atrapar radicales peroxilo con una potencia similar a la mostrada por L-His pero por un mecanismo diferente (29).

1.4.2.4 Otras actividades y compuestos relacionados

Otras propiedades de la CARN incluyen la prevención de formación de productos finales de lipoxidación y de glicoxidación avanzadas involucrados tanto en el proceso de envejecimiento como en el inicio y la propagación de varias

enfermedades basadas en la oxidación, como la diabetes, la aterosclerosis y la enfermedad de Alzheimer (29).

La CARN es el arquetipo de una familia de derivados naturales, principalmente dipéptidos que contiene histidina (HCD) como la anserina y la ophidina, análogos metilados (Figura 11) (29) que dependen del metabolismo anaeróbico y están ampliamente distribuidos en el tejido de los mamíferos, pero es la CARN el único HCD en el músculo esquelético humano (126).

Otros análogos de CARN implican la sustitución de β -ALA por GABA (homocarnosina) o L-His por histamina (carcinina) o incluyen la formas acetiladas de la β -ALA (acetil-carnosina) (Figura 12) (29).

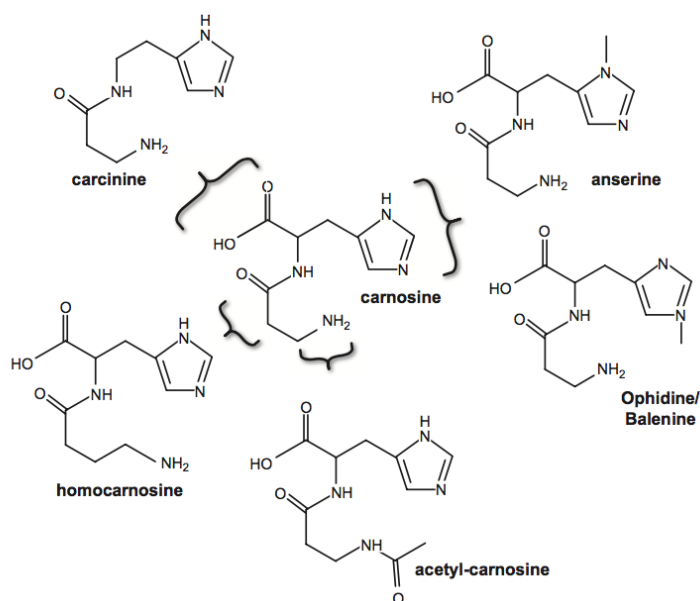


Figura 11. Estructuras químicas de la CARN y sus derivados naturales (29).

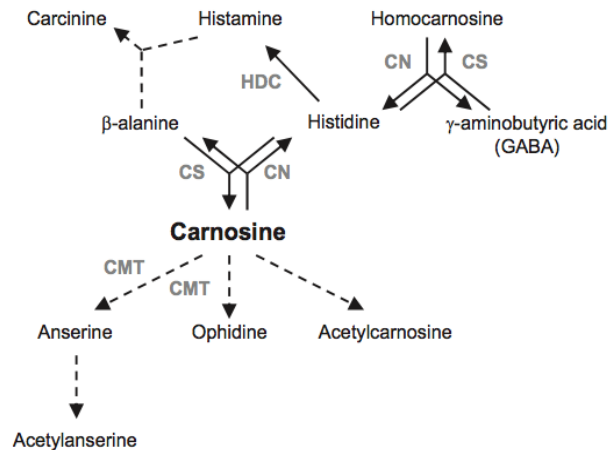


Figura 12. Vías metabólicas de la CARN. Las líneas continuas representan reacciones bien descritas que ocurren en humanos. Las líneas discontinuas representan reacciones que, o bien no ocurren en los seres humanos o no se conocen bien en la actualidad (29).

1.5 INTEGRACIÓN DE LA β-ALANINA, L-HISTIDINA Y CARNOSINA

El contenido de CARN será el resultado del equilibrio entre su síntesis y su degradación / eliminación. En concreto, la síntesis de CARN muscular está determinada por disponibilidad de β-ALA sarcoplásmica que viene condicionada por la absorción intestinal de β-ALA, su captación y transporte a las células musculares y su síntesis muscular (30). En humanos, parece que la β-ALA se transporta fácilmente a través del tracto gastrointestinal (21), y por lo tanto, este paso no parece limitar la síntesis de CARN muscular (30).

Por otra parte, la CARN se puede absorber en el intestino delgado, y al menos parte de ella alcanza la circulación sanguínea no hidrolizada (127,128). La captación de CARN a través de la membrana con borde de cepillo se logra mediante el transportador PEPT1. Cuando la CARN entra en los enterocitos, se hidroliza, presumiblemente por la enzima carnosinasa tisular CN2, o se transporta a través de la membrana basolateral. PEPT1 es un cotransportador de

péptido / protón y, por lo tanto, su actividad aumenta con un pH luminal / apical más bajo (Figura 13) (29).

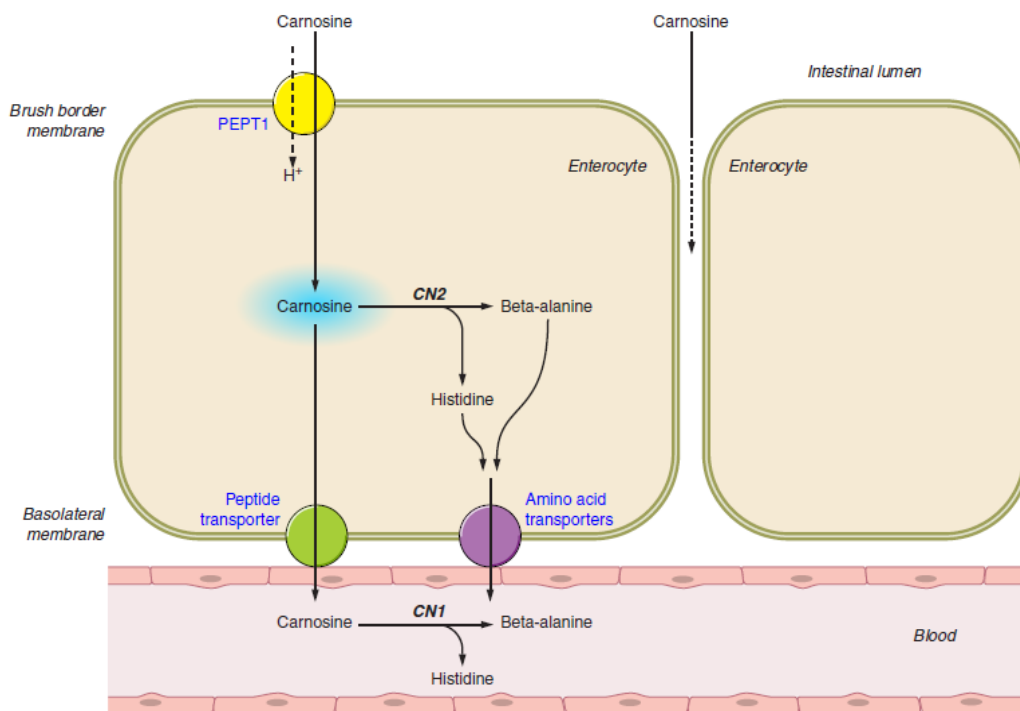


Figura 13. Posibles vías de absorción intestinal de HCD (29).

La CARN ingerida a través de la dieta que llega al torrente sanguíneo se hidroliza rápidamente debido a la alta actividad de la enzima carnosinasa sérica (CN1) (129), lo que significa que sus concentraciones son insignificantes (130), aunque pequeñas cantidades de CARN se han detectado en la orina 4 h después de su ingestión (98). La CARN intacta en la sangre no puede ser captada por las células musculares, ya que parece que carecen del transportador dipeptídico relevante. La mayor parte de la CARN absorbida activa se escinde en β -ALA y L-His (21).

En músculo y en las células del sistema nervioso central (SNC) se sintetiza la CARN a partir de L-His y β -ALA por la enzima carnosina sintasa (CS) (34). También a nivel citosólico en el tejido muscular se encuentra la enzima hidrolítica

carnosinasa tisular o dipeptidasa citosólica no específica (CN2) aunque con baja actividad sobre CARN lo que permite que sus concentraciones sean estables tras elevarse mediante suplementación (98). Esta enzima se expresa ampliamente en otros tejidos humanos, incluido el cerebro (131) y el lóbulo olfativo (132) lo cual sugiere que algunas células neuronales expresen el transportador de CARN PEPT2, demostrado en ratas (133). Esto permitiría a la CARN transferirse a través de la barrera hematoencefálica. Además, la carnosina sintasa (CS) no solo está presente en músculo esquelético y cardíaco, sino en ciertas regiones del cerebro (134) como las neuronas olfatorias lo que tiene sentido debido a su alto contenido de CARN (135,136). Complementariamente, la β -ALA se transporta fácilmente a través del cerebro por el sistema de transporte de β -aminoácidos dependientes de Na^+ que permitiría la síntesis de CARN o actuar como un neuromodulador / neurotransmisor por sí mismo (98,137).

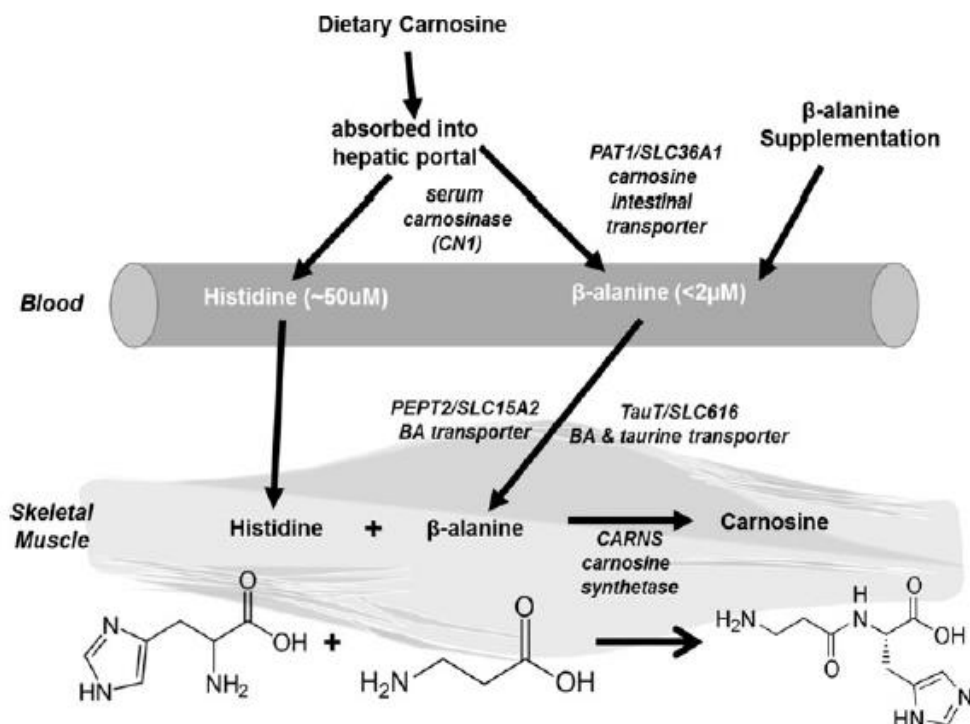


Figura 14. Esquema de los puntos de regulación de la CARN/liberación de β -ALA y consecuentemente síntesis de CARN en el músculo esquelético (60).

Varias enzimas están involucradas en la biotransformación de la CARN y dipéptidos relacionados incluyendo la CS, encargada de la síntesis de la CARN muscular, dos enzimas hidrolíticas, la CN1 que está altamente activa en el plasma (138) y la carnosinasa tisular o dipeptidasa citosólica no específica (CN2) en el tejido muscular (29). Así, a nivel muscular, la síntesis de CARN va acompañada de una disminución abrupta del contenido de L-His y β -ALA (139) con la concurrencia de Mg^{2+} y ATP. CS parece tener una amplia especificidad de sustrato, permitiendo que otros dipéptidos puedan formarse por sustitución de β -ALA o L-His (140). La CARN y los compuestos relacionados son metabolizados por las enzimas hidrolíticas denominadas CN1 o CN sérica y CN2 o CN tisular o dipeptidasa no específica citosólica. La CN1 es una enzima secretada a nivel hepático, presente y activa en el plasma humano (138) y responsable de la hidrólisis rápida e íntegra de CARN tras administración oral (128,141). Su actividad presenta una gran variabilidad interindividual con mayor actividad en mujeres en comparación con los hombres (26,142). En cuanto a la CN2, denominada carnosinasa tisular o dipeptidasa citosólica no específica, presenta ausencia de actividad en varios tipos de músculo esquelético (143,144). Esto configura que la CARN permanezca estable en el músculo esquelético, con un perfil de disposición lenta después de la administración de suplementos de β -ALA (141). De hecho, recientemente se ha sugerido que a pesar de que la velocidad catalítica de CN2 es notablemente inferior a la de CN1, la CARN podría ser hidrolizada por CN2 en condiciones fisiológicas (145) aunque queda por determinar el nivel de su implicación en la degradación de la CARN en tejidos con abundante contenido de CARN y en la pared intestinal (29).

En la siguiente tabla 4 se puede ver las diferencias funcionales de CN1 y CN2:

Tabla 4. Tabla comparativa de características de dipeptidasas con actividad carnosinasa		
	Carnosinasa sérica (CN1)	Carnosina tisular ó dipeptidasa citosólica no específica (CN2)
Tejidos	Cerebro, hígado, suero, riñón.	Ubicuamente expresado; no en suero o líquido cefalorraquídeo
Localización subcelular	Secretado	citosólico
Cofactor ión metálico	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	Mn ²⁺
pH óptimo para hidrólisis de CARN	8.5	9.5
Especificidad del sustrato	CARN > anserina > ophidina > homocarnosina.	Anserina / ophidina > Haa-L-His > CARN. No homocarnosina.

Cuando se suspende la administración de suplementos de β -ALA, se observa un retorno gradual de las concentraciones de CARN muscular a los niveles basales. Baguet et al. (2009) (146) estudiaron el aumento en los niveles de CARN muscular tras 6 semanas con una ingesta de 4.8 g al día de suplementos de β -ALA. Después de 3 semanas del cese de la ingesta del suplemento, las concentraciones medias de CARN en tres músculos se vieron disminuidas en un 31,8% y tras 9 semanas volvió a los niveles basales con una disminución exponencial con una semivida ($t_{1/2}$) de 8,6 semanas (35). Otros autores han sugerido que la tasa de retorno de la CARN muscular a sus niveles basales es una función del aumento inicial tras la suplementación (30). Una vez que se cesa la administración de β -ALA, prevalece la degradación y eliminación de la CARN sobre la síntesis (Figura 15) (30).

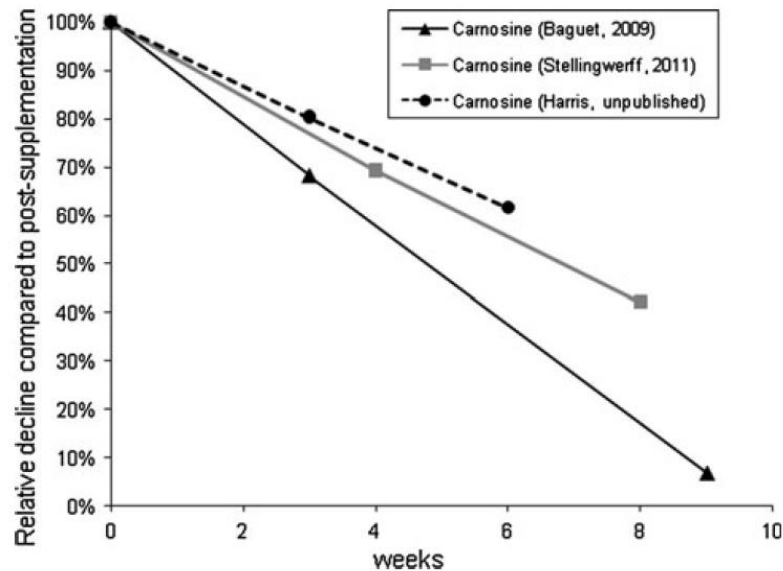


Figura 15. Estudios de eliminación de la CARN del músculo tras la suplementación de β -ALA (30).

Se puede concluir, que la capacidad de la CARN para desarrollar su actividad farmacológica (amortiguador de pH, captación de iones y radicales y como antioxidante) se debe al efecto combinado de sus dos aminoácidos, β -ALA y L-His y no a uno solo (por ejemplo, su capacidad antioxidante se basa en la de L-His pues la β -ALA no es eficaz en si (125). El ejercicio de alta intensidad provoca tanto un descenso del pH intracelular muscular como una respuesta significativa al estrés oxidativo, causando inflamación y daño muscular (147), la sostenibilidad de los niveles adecuados de CARN mediante su síntesis a partir de β -ALA y L-His, podrían conducir a la atenuación del estrés oxidativo y beneficiar el proceso de recuperación y el rendimiento posterior del ejercicio (148,149).

1.6 ANTECEDENTES

Durante los últimos 10 años, se han acumulado evidencias que respaldan el beneficio ergogénico de elevar la CARN muscular (23,36,37,150). El primer estudio humano para aumentar con éxito la CARN muscular mediante la administración de suplementos de β -ALA se publicó en 2006 (21). Desde 2006,

muchos estudios diferentes han demostrado claramente que la suplementación prolongada de β -ALA (1,6-6,4 g al día durante 4 semanas) en humanos, da como resultado un aumento del 40-65% en el contenido de CARN muscular (21,33,34,141,151-154). El efecto ergogénico de la suplementación con β -ALA se ha reportado tanto en las poblaciones recreativas como atléticas competitivas que realizan actividad de alta intensidad (33,151,155-159). También se ha demostrado que los estudios en hombres y mujeres previamente desentrenados mejoran el rendimiento (158,159) y que el aumento absoluto en la CARN muscular solo depende de la β -ALA total consumida, y no depende de la CARN muscular basal, el tipo de músculo o la cantidad diaria de β -ALA suplementado. Además, con una ingesta de tan solo 1.6 g de β -ALA al día, se pueden aumentar significativamente las reservas de CARN muscular en las 2 semanas posteriores a la administración del suplemento (34). Stellingwerff, Anwander, et al, (34) utilizando un modelo empírico, sugirieron que un total de 230 g de β -ALA consumida durante varias semanas, usando esquemas de dosificación de 1.6-6.4 g al día, daría como resultado un aumento del 50% en la CARN muscular. Esto sugirió una dependencia lineal ($R^2 = 0.921$) entre el aumento en el contenido de CARN muscular y la cantidad total de β -ALA consumida, independientemente del tipo de músculo. Otros autores, a partir de un metaanálisis, han indicado que una ingesta acumulada de 179 g de β -ALA) dará como resultado una media de mejora del rendimiento del 2,85% en comparación con un placebo (6,36).

En resumen, hasta la fecha, los estudios de suplementación de β -ALA han tenido éxito al aumentar el contenido de CARN muscular en 45-60% después de 4 semanas, con el objetivo de mejorar la capacidad anaeróbica y la función muscular durante el ejercicio (32,154). Se han utilizado modalidades diversas de ejercicio y suplementación, donde se consumieron dosis diarias de entre 1,6 y 6,4 g de β -ALA durante varias semanas. Véase ANEXO 1 con la suplementación de β -ALA en estudios anteriores.

Actualmente, se han empezado a utilizar formulados de β -ALA de liberación sostenida, que en comparación con el formato puro en solución, ralentiza la tasa de aparición y reduce el valor del pico de β -ALA en la sangre, reduciendo los síntomas de parestesia (160). En consecuencia, los estudios utilizan

ahora dichos formatos, que permiten la suplementación diaria y el cumplimiento de normas más prácticas al reducir el número de dosis para una prescripción determinada (34,48,153). Las formulaciones de β -ALA todavía alcanzan concentraciones plasmáticas efectivas que están por encima del transportador β -ALA Km de 40 μ M, demostrando la síntesis de CARN muscular altamente eficaz con un suplemento de liberación sostenida (30,34). Como se vio anteriormente, las dosis superiores a 6,4 g al día generalmente no se han examinado debido al mayor riesgo de aparición de síntomas de parestesia. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizaron antes de la disponibilidad de una formulación de liberación sostenida de β -ALA, que permite dosis mayores sin el riesgo de parestesia (161). Véase ANEXO 2 con efectos secundarios según la suplementación de β -ALA en estudios anteriores.

En un estudio de Decombaz et al. (48), se compararon la cinética plasmática y los síntomas después de la administración de β -ALA pura o en comprimidos de liberación sostenida. Once adultos sanos ingirieron 1,6 g de la referencia pura, 1,6 g en comprimidos de β -ALA de liberación sostenida o un placebo después de un ayuno nocturno. Durante las siguientes 6 h, se midieron las concentraciones plasmáticas y urinarias de β -ALA y se completaron cuestionarios sobre la intensidad, la naturaleza (hormigueo, picazón, enrojecimiento, irritación, entumecimiento, dolor) y la distribución espacial de sensaciones inusuales. La concentración plasmática máxima fue menor con β -ALA de liberación sostenida que con la pura (82 frente a 248 μ mol/L, $p < 0,001$), con un retraso en el tiempo hasta el pico (1,0 frente a 0,5 h, $p < 0,01$) sin diferencia en el área bajo la curva, reduciéndose la pérdida de orina (202 frente a 663 μ mol, $p < 0,0001$), y mejorando la retención (98,9 vs 96,3%, $p < 0,001$). Los síntomas descritos como "alfileres y agujas" se percibieron rápidamente en la piel de los brazos y el tronco después de la toma del producto puro ($T_{max} = 15$ min) y su curso temporal casi imitó las concentraciones plasmáticas. Las puntuaciones de intensidad máxima fueron más débiles con β -ALA de liberación sostenida que, con la pura, mientras que los comprimidos de liberación sostenida no difirieron con respecto a los efectos secundarios del placebo. En resumen, la ingestión de 1,6 g de β -ALA en comprimidos de liberación sostenida en lugar de pura en solución, da como resultado una cinética de absorción más lenta, una mejor retención de todo el

cuerpo y efectos secundarios sensoriales que no se pueden diferenciar del placebo.

Un estudio más reciente comparó dos protocolos de dosificación (6 g frente a 12 g día) de formulación de liberación sostenida sobre el contenido de músculo en CARN (56). Un total de 30 participantes (18 hombres y 12 mujeres) se aleatorizaron en tres grupos: placebo, 6 g al día de β -ALA o 12 g al día de β -ALA. El placebo y los grupos de 6 g al día se suplementaron durante 4 semanas, mientras que el grupo de 12 g al día se suplementó durante 2 semanas. Tanto los grupos de 12 g al día ($P = 0.026$) como los de 6 g al día ($P = 0.004$) aumentaron significativamente la CARN muscular en comparación con el grupo placebo, pero no se observaron diferencias entre los grupos de ingestión de β -ALA. Este estudio presentó evidencia de que doblar la dosis diaria puede alcanzar cantidades similares de CARN muscular en la mitad del tiempo. Sin embargo, probablemente sería un error extrapolar estos resultados a una mayor duración de la ingesta diaria alta de β -ALA. Los aumentos en el contenido de CARN muscular con la suplementación con β -ALA parecen depender de varios factores, incluidos el historial de entrenamiento, la dosis de suplemento y la duración del uso del suplemento.

II - JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

La oferta de productos en el mundo de la nutrición deportiva ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Son múltiples las funciones que se le atribuyen a estos productos. Sin embargo, no han sido tantos los productos que han podido demostrar desde un punto de vista estrictamente científico basado en la evidencia, tener un efecto probado de cara a mejorar el rendimiento o la capacidad del deportista. Es por esto que surge la necesidad de desarrollar nuevas fórmulas y nuevos productos de efectividad probada cuyos resultados se puedan después reproducir y demostrar en posteriores ensayos clínicos.

El principal ingrediente a investigar en esta tesis es la β -ALA, cada vez más usada en deporte y salud ya que incrementa la síntesis de CARN muscular, la cual tiene como función principal regular el pH, entre muchas otras actividades celulares. Teniendo en cuenta que el rendimiento físico disminuye cuando el pH miocelular decrece durante la actividad física, el consumir β -ALA ayuda considerablemente a amortiguar ese proceso durante la práctica deportiva, retrasando la aparición de la fatiga y en consecuencia mejorando el rendimiento deportivo, dándole un plus diferencial al deportista.

La β -ALA tiene la limitación de generar un efecto secundario conocido como parestesia, por lo que se han creado sistemas de liberación sostenida con el fin de disminuir este efecto asociado a altas concentraciones plasmáticas de β -ALA. En esta tesis, se estudia un nuevo producto con una liberación mejorada en formato polvo, que pretende mejorar la biodisponibilidad y reducir las parestesias, además de permitir la ingesta de cantidades más grandes.

III - OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo final y último de la tesis es investigar el desarrollo preliminar de una matriz en polvo de liberación sostenida de β -ALA, para proporcionar unos niveles constantes y estables de absorción del ingrediente activo evitando los picos altos de concentración plasmática de β -ALA, mediante un estudio farmacocinético de biodisponibilidad comparada en voluntarios sanos tras la administración de 8 gr de β -ALA en una única dosis y evaluar los efectos secundarios asociados a su consumo, parestesia.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

Para lograr el objetivo anterior, es necesario alcanzar, entre otros, los siguientes objetivos intermedios:

- Buscar, identificar y seleccionar los ingredientes de interés según la funcionalidad buscada.

- Desarrollar una formulación preliminar en formato polvo que disponga de un perfil de liberación sostenida manteniendo un umbral constante de principio activo en sangre, sin caídas bruscas o picos de liberación, que se aproxime a los siguientes ratios de liberación:
 - 1 hora: 15 %
 - 2 horas: 30 %
 - 4 horas: 70 %
 - 6 horas: 100 %

- Estudiar los posibles modelos cinéticos de disposición, estimar los parámetros farmacocinéticos correspondientes y evaluar su biodisponibilidad relativa.
- Correlacionar las concentraciones de β -ALA obtenidas en plasma con los efectos de la parestesia.

IV - MATERIAL Y MÉTODO

IV – MATERIAL Y MÉTODO

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Desarrollo de un nuevo producto con β -ALA de liberación sostenida para la posterior realización de un estudio de biodisponibilidad, con un ensayo clínico aleatorizado, simple ciego y cruzado, donde se compararon dos productos de liberación controlada (producto de prueba desarrollado y producto de referencia) con la misma cantidad de β -ALA, pero en formatos diferentes.

Los sujetos fueron asignados al azar a un grupo u otro para la secuencia cruzada (Epidat 4.2, 2016) y se les administró por vía oral β -ALA 8 g en ambos casos. Para que el cálculo de la cantidad de producto a ingerir contuviera 8 g de β -ALA pura, se tuvo en cuenta la cantidad de recubrimiento para la liberación controlada y los excipientes del producto: El producto de prueba fue una formulación de mezcla de polvo (POL) de liberación controlada que contenía 8 g de β -ALA, 300 mg de L-His y 100 mg de CARN por dosis. El producto de referencia fueron comprimidos (COM) de liberación controlada, que requirió 10 comprimidos para alcanzar 8 g de β -ALA y 20 mg de zinc. El producto de prueba fue proporcionado por el fabricante y el producto de referencia estaba disponible comercialmente.

Se analizó, β -ALA y L-His en plasma y orina tras la ingesta del suplemento durante 8 horas. Simultáneamente se hizo un test de parestesia para estudiar los efectos secundarios.

Previamente a la iniciación del estudio, el protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Católica de Murcia (código CE021902)

4.1.1 Producto de investigación

Se les administraron dos suplementos de liberación controlada:

-PRODUCTO DE PRUEBA (BETAFOR3MAX®, Martínez Nieto SA, Cartagena, España): Suplemento en formato polvo de β -ALA de liberación sostenida (POL). Compuesto por los siguientes ingredientes cuyos certificados de análisis se encuentran en el ANEXO 3:

- 8 g β -ALA recubierta.
- 300 mg L-His.
- 100 mg CARN.

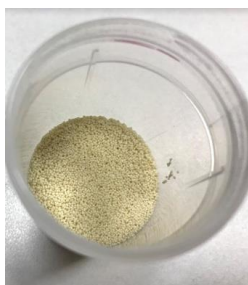


Figura 16. Producto de prueba BETAFOR3MAX® en formato polvo

Para obtener la β -ALA recubierta, se llevaron a cabo distintas pruebas de recubrimiento con el equipo piloto Jet Coater 10L:



Figura 17 y 18. Equipo piloto Jet Coater 10L: Imagen del tambor rotatorio cerrado y abierto.



Figura 19. Equipo piloto Jet Coater 10L: tambor rotatorio desde otra perspectiva y panel de control de parámetros.

Se reservó una sala en el área de sólidos para colocación del equipo piloto. La sala cumple con las normas de buenas prácticas de fabricación, estando dotadas de control de humedad y temperatura y bajo clasificación ISO 8 correspondiente a la elaboración de productos sólidos no estériles en sala blanca.

En la siguiente imagen se muestra como es el espacio destinado a las pruebas antes de proceder a la instalación de la maquinaria. Igualmente, se aprecia la existencia de un foco de aspiración y extracción localizada para la eliminación del solvente empleado en la reconstitución de los excipientes de recubrimiento.



Figura 20. Sala del equipo piloto Jet Coater 10L.

Las materias utilizadas para obtener la β -ALA recubierta fueron:

- β -ALA pura
- Material de recubrimiento: hidroxipropilcelulosa (E463), dióxido de silicio coloidal (E551), talco alimentario (E553b) y shellac (goma laca) (E904).
- Solvente: alcohol isopropil.

Se desarrollaron las pruebas de recubrimiento con β -ALA pura de base, cambiando el tamaño de partida (40 mesh o 400 μm ; 100 mesh o 149 μm y 200 mesh o 74 μm de tamaño), para poder determinar las condiciones idóneas en la obtención del recubrimiento deseado:

PRUEBA 1: Recubrimiento de muestra 1.- β -ALA de 40 mesh o 400 μm .

Peso total a recubrir: 1.0 Kg

- 450 gramos de material de recubrimiento.
- 4.050 gramos de alcohol isopropil.

PRUEBA 2: Recubrimiento de muestra 1.- β -ALA de 100 mesh o 149 μm .

Peso total a recubrir: 1.0 Kg

- 450 gramos de material de recubrimiento.
- 4.050 gramos de alcohol isopropil.

PRUEBA 3: Recubrimiento de muestra 1.- β -ALA de 200 mesh o 74 μm .

Peso total a recubrir: 1.0 Kg

- 450 gramos de material de recubrimiento.
- 4.050 gramos de alcohol isopropil.

En todas las pruebas, se siguió el mismo procedimiento con las mismas condiciones:

- 1- Mezclado y disolución en solvente/s de los diferentes componentes del recubrimiento en orden de aporte específico hasta conseguir una mezcla solida homogénea:
 - Se coloca la cantidad pesada del solvente, en este caso alcohol isopropilo en un recipiente de mezcla y se inició la agitación.
 - Se añade la cantidad necesaria del material de recubrimiento en el centro del recipiente que se encuentra en agitación continua con un flujo lento y constante, mantuvimos la agitación durante 5 minutos más.
 - Una vez que todo el material de recubrimiento y solventes han sido añadidos, se reduce la velocidad de agitación y se mantiene agitando durante 45 minutos más. Es importante mantener la agitación de la suspensión durante todo el proceso de recubrimiento.

- 2- Carga en tanque de la máquina de recubrimiento:
 - Se carga la β -ALA en polvo en el tambor para proceder a recubrimiento.
 - Se coloca la disolución para el recubrimiento, continua en agitación.

- 3- Control de condiciones para el proceso. Las condiciones óptimas para la obtención del recubrimiento deseado fueron las siguientes:
 - Temperatura externa, interna del tambor y de mezcla intermedia debe ser de 37°C. Se precalentó el tambor junto con la β -ALA en polvo antes de comenzar con el esprayado.

- Condiciones de la bomba peristáltica y presión de nebulización durante las pruebas a distintos tiempos:
 - i. -A t=0 min:
 - 1. 8 rpm bomba peristáltica
 - 2. 1.2 bares de presión de nebulización
 - ii. -A t=20 min:
 - 1. 10 rpm bomba peristáltica
 - 2. 1.2 bares de presión de nebulización
 - iii. -A t=60 min:
 - 1. 13 rpm bomba peristáltica
 - 2. 1.2 bares de presión de nebulización

- 4- Velocidad de rotación del tambor (revoluciones por minuto) fue de 24 vueltas por minuto.

- 5- El tiempo total del proceso fue de 115 minutos

Una vez obtenida la β -ALA recubierta, para los ensayos de liberación a diferentes tiempos, se empleó el método oficial de la Farmacopea Europea 8^a Edición, 2.9.3- Test de disolución para formas sólidas de dosificación, incluido en el ANEXO 4.

El equipo utilizado para la liberación in vitro fue:

- Equipo utilizado: Agilent 100 Automated Disintegration.

Y los reactivos utilizados fueron:

- Agua purificada
- Etanol
- Metanol,
- H_3PO_4 ,
- $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$,
- $C_7H_{15}NaO_3S$

Para el cálculo y seguimiento del perfil de liberación sometimos cada una de las muestras obtenidas en el ensayo de recubrimiento al test de disolución, en tiempos de 1, 2, 4 y 6 horas, procediendo al análisis del activo β -ALA presente para cada una de estas salidas a diferentes tiempos (en tanto por ciento) en solución acondicionada conforme indica Farmacopea. El método fue dado como válido cuando se obtuvo constancia en los resultados obtenidos.

-PRODUCTO DE REFERENCIA (Etixx Sports NV, Bélgica): suplemento en formato comprimido de β -ALA de liberación sostenida (COM).

Compuesto por:

- 8 g β -ALA.
- 20 mg Zinc

El listado completo de ingredientes del producto de referencia es:

β -ALA - agentes de carga: hidroxipropil metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, y goma de celulosa, celulosa microcristalina - bisglicinato Zinc - antiaglomerante: dióxido de silicio, sales de magnesio de ácidos grasos.



Figura 21. Producto de referencia en formato comprimidos

4.1.2 Población de estudio.

Todos los voluntarios fueron informados con detalle del estudio, los riesgos que pudieran derivarse de su participación y pudieron preguntar todas sus dudas para tomar una decisión libre e informada de su participación.

La selección de la población de estudio contempla los siguientes criterios:

4.1.2.1 Criterios de selección:

- Hombres y mujeres con edades comprendidas entre 18 y 40 años.
- Realización de ejercicio físico al menos 3 veces a la semana

4.1.2.2 Criterios de exclusión:

- Sujetos en tratamiento ante cualquier patología.
- Ser alérgico a cualquier componente de los productos de estudio.
- Suplementación con productos de β -ALA en el pasado.
- Realizar cambios en la dieta o ejercicio durante el estudio.

4.1.2.3 Criterios de retirada

El investigador podía retirar a un sujeto del estudio si consideraba que este ya no cumplía con la totalidad de los requisitos del mismo. Los procedimientos no conllevan ningún riesgo para los participantes.

Para la realización de las pruebas se requirieron unos requisitos que los sujetos debían cumplir en los días previos a la consecución de la prueba. El incumplimiento de alguno de estas condiciones supondría la retirada del sujeto del estudio. Estas condiciones eran:

- No encontrarse en periodo post-prandial los días de medición (debiendo los participantes venir en ayunas la noche anterior a la prueba).

- No haber consumido ningún tipo de estimulante o droga el día de la prueba o estar bajo efectos agudos o crónicos de sustancias que generen alteraciones físicas o psicológicas.
- No poder realizar todas las pruebas de las condiciones experimentales en el mismo momento del día.
- No reproducir la misma dieta las 24 horas anteriores de cada una de las pruebas.

Además, el sujeto sería excluido del estudio si ocurrían alguno de los siguientes acontecimientos:

- Presencia de acontecimiento adverso.
- Otras violaciones del protocolo.
- Decisión facultativa.
- Renuncia del individuo a continuar en el estudio.
- Pérdida de seguimiento.

4.1.2.4 Abandono y sustitución de pacientes

Los participantes podían abandonar el estudio en cualquier momento, con o sin motivos, y sin perjuicio para ellos. El sujeto participante en el estudio pudo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin expresión de causa y sin que por ello se derivara para el sujeto participante responsabilidad ni perjuicio alguno.

Además, los individuos no se sometían a un seguimiento adicional ni fueron sustituidos. En todos los casos de abandonos se registró el motivo expresado por el voluntario. Por otra parte, los integrantes del equipo investigador tenían total libertad para retirar a un sujeto del estudio si se consideraba oportuno en base a incumplimiento de alguno de los criterios de permanencia. Los datos recogidos sobre los sujetos que se retuvieron se conservaron y utilizaron en el análisis global.

4.1.3 Aleatorización de los participantes

Una vez que los individuos firmaron el consentimiento informado del estudio y pasaron el proceso de selección de la muestra cumpliendo los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión, fueron considerados como elegibles para ser incluidos en el estudio.

Los sujetos fueron asignados al azar por ordenador en una misma proporción a uno de los dos grupos A o B de los que constaba el estudio para la secuencia cruzada (Epidat 4.2, 2016): grupo que consumió producto POL y grupo que consumió producto COM. Se asignaron a todos los participantes números de identificación exclusivos.

Los participantes que tomaban producto POL que resultó de la aleatorización en fase 1; durante la fase 2, pasaron a tomar el producto COM y viceversa. Véase a continuación el diagrama de flujo:

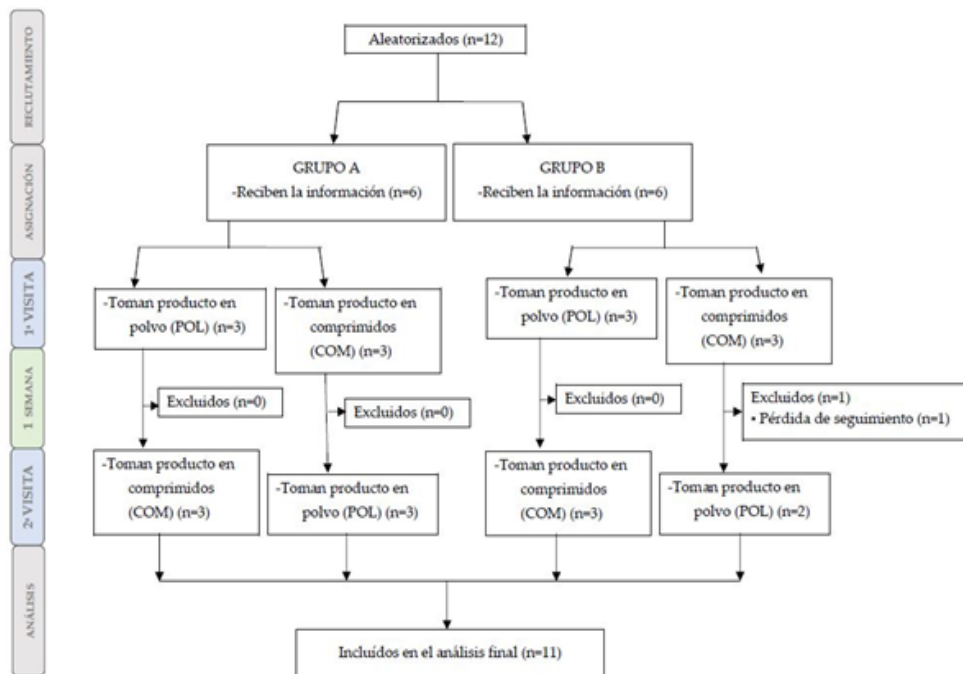


Figura 22. Diagrama de flujo

4.1.4 Cegamiento

Se seleccionaron dos productos POL y COM con β -ALA, ambos de liberación controlada.

Los productos iban marcados con una etiqueta que los identificaba como pertenecientes al ensayo clínico con código de protocolo y código de aleatorización de cada paciente.

El investigador conocía ambos productos a ingerir, así como la cantidad de β -ALA que incluían ambos productos; los participantes sabían que iban a ingerir β -ALA, no así la cantidad incluida.

4.1.5 Lugar y realización del estudio

El reclutamiento de la muestra se realizó desde la Universidad Católica de Murcia por medio de nota informativa (correo electrónico). Con los posibles voluntarios interesados se concertó mediante llamada telefónica, una visita informativa del estudio en las instalaciones de la Cátedra de Fisiología del Ejercicio en la Universidad Católica San Antonio de Murcia que dispone de las instalaciones, el aparataje y el personal sanitario y técnico necesario para la correcta ejecución del estudio.

VISITA 1. Se realizó una visita donde se tomaron muestras en sangre y orina durante 8 horas tras la ingesta de una dosis fijada de los productos. La mitad de los participantes consumieron el producto POL y la otra mitad el producto COM. Simultáneamente, se rellenó un test de parestesia y se hizo un control nutricional.

Tras la primera visita los participantes esperaron una semana para realizar la segunda visita.

VISITA 2. Una semana después, se realizaron las mismas tomas de muestra con el mismo test que en la visita 1, cruzando los productos. Simultáneamente, se rellenó un test de parestesia y se hizo un control nutricional.

La preparativa y posterior congelación de las muestras, se realizó en el laboratorio de la Universidad Católica San Antonio de Murcia. El análisis de muestras sanguíneas se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos, Centro médico Virgen de la Caridad, Cartagena, España.

Tabla 5. Seguimiento de las visitas

Seguimiento	Previo	V1	V2
Historia clínica		+	
Crit. incl/excl.	+		
Consentimiento		+	
Aleatorización	+		
Entrega del producto POL o COM		+	+
Extracción sanguínea		+	+
Muestras de orina		+	+
Test de parestesia		+	+
Control nutricional	+	+	+

4.2 VARIABLES DEL ESTUDIO.

Para el desarrollo del estudio y durante su realización se midieron las siguientes variables:

4.2.1 Características demográficas:

Se analizaron las características generales de los sujetos participantes en el estudio.

- Edad: En años. Se toma como valor el día de comienzo de las mediciones.
- Experiencia previa con β -ALA: si o no.
- Sexo: masculino o femenino.
- Días de entrenamiento a la semana: días que dedica al
- entrenamiento para la mejora del rendimiento.
- Peso: medido en Kg. Báscula Tanita BC-420MA.
- Talla: medida en cms. Tallímetro Seca model 711.
- Masa grasa: medido en Kg. Báscula Tanita BC-420MA.
- Masa magra: medido en Kg. Báscula Tanita BC-420MA.
- Masa muscular: medido en Kg. Báscula Tanita BC-420MA.
- Agua total corporal: medido en Kg. Báscula Tanita BC-420MA.
- Masa ósea: medido en Kg. Báscula Tanita BC-420MA.

4.2.2 Variables sanguíneas

Las variables determinadas fueron:

- Concentración de β -ALA en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de L-His en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Ácido aspártico en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Treonina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Serina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Asparagina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Ácido glutámico en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Glutamina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Prolina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Glicina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Alanina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Valina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Metionina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Isoleucina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Leucina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Tirosina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Fenilalanina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$

- Concentración de Lisina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de Ornitina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de 1-Metil-histidina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$
- Concentración de 3-Metil-histidina en plasma en $\mu\text{Mol/L}$

4.2.3 Determinaciones en orina

Las variables determinadas fueron en volumen total de orina hasta las 4 y las siguientes 4 h desde el inicio del estudio

- Concentración de β -ALA en orina en $\mu\text{Mol/g}$ creatinina.

4.2.4 Variables basadas en el test de parestesia:

La parestesia se evaluó de forma concomitante después de cada extracción de muestra de sangre utilizando cuestionarios de calificación perceptiva presentados siempre en la misma secuencia sin permitir que los sujetos retrocedieran para revisarlos. Dicho test se puede encontrar en el ANEXO 5.

Las variables que se recogieron fueron:

- La puntuación visual analógica (VAS) se centra en la intensidad percibida de los síntomas. Su determinación consiste en una línea horizontal, continua de 10 cm con marcas verticales finales etiquetadas como "sin sensación inusual" y "sensación más intensa imaginable". El sujeto dibuja una marca a la distancia más adecuada a su intensidad de percepción. El parámetro de medida de la intensidad es la longitud del segmento desde el extremo izquierdo.



Figura 23. Test de parestesia, Intensidad de la sensación (VAS)

- La puntuación de la intensidad de la sensación (ISS) presenta una escala basada en categorías que permite cambios de percepción de intensidad no lineales con 9 categorías que van desde "ausente" (1) a "inaguantable" (9) con niveles intermedios: débil (2- 3), moderada (4-6) e intensa (7-8). El tema marcaría la categoría más adecuada.

9	Inaguantable
8	Muy muy intenso
7	Muy intenso
6	intenso
5	Media, moderado
4	débil
3	Muy débil
2	Muy muy débil
1	ausente

Figura 24. Test de parestesia, Intensidad de la sensación (ISS)

- El Inventario cualitativo de síntomas leves (QLSI) calificó la naturaleza de la sensación dentro de un subconjunto de seis atributos descriptivos: "alfileres y agujas", "cosquilleo y picazón", "estremecimiento y escalofríos", "hipersensibilidad táctil e irritación", "entumecimiento e insensibilidad" y "dolor". Junto a cada atributo hay una escala de 5 niveles desde 0 = 'ausente' a 4 = 'extrema'. El sujeto debe registrar el nivel más apropiado para cada descriptor. Hay una categoría adicional que permite descripciones de texto libre.

0 1 2 3 4	Alfileres y agujas.
0 1 2 3 4	Cosquilleo y picazón
0 1 2 3 4	Estremecimiento y escalofríos.
0 1 2 3 4	Hipersensibilidad táctil, irritación.
0 1 2 3 4	Entumecimiento, insensibilidad
0 1 2 3 4	Dolor
0 1 2 3 4	Otros...

Figura 25. Test de parestesia, Inventario cualitativo de síntomas leves (QLSI)

- La puntuación de la sensibilidad del cuerpo (SSS) para identificar las áreas del cuerpo más afectadas por los síntomas. Se usó una imagen esquemática del cuerpo, con lados frontal y posterior con áreas rectangulares marcadas. Los sujetos marcaron con " x " cada área donde percibieron síntomas, sin tener en cuenta su naturaleza e intensidad. Los registros (0 o 1) se contaron como la suma de todas las áreas marcadas para todo el cuerpo (puntuación máxima posible = 17).

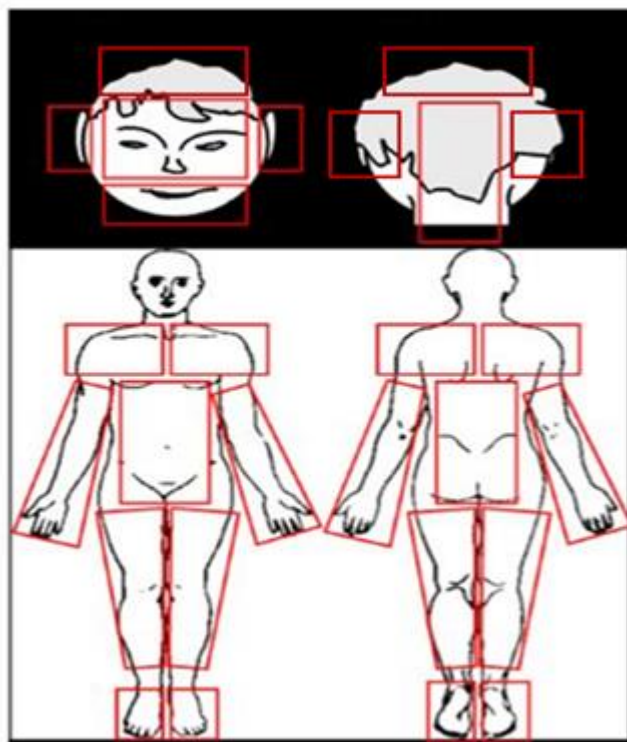


Figura 26. Test de parestesia, puntuación de la sensibilidad del cuerpo (SSS)

- Por último, el cuestionario rubor basado en una inspección visual discreta del sujeto participante. Un investigador evaluó los cambios en la apariencia de la piel en la cara, las orejas y los antebrazos (por ejemplo, piel roja, nariz roja, manchas de color).

4.3 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO

4.3.1 Obtención del consentimiento informado

Antes de que se llevase a cabo alguna prueba o procedimiento específicos del estudio, se pidió a los participantes que cumplieren los criterios de participación y que firmasen el documento de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético (ANEXO 6).

El investigador informó a cada individuo de forma oral y por escrito de la metodología del estudio, así como de los beneficios y riesgos potenciales derivados de la participación en el estudio y de los posibles efectos indeseables que podían aparecer como consecuencia de las distintas determinaciones que se realizaban (extracciones sanguíneas y efectos secundarios tales como parestesia).

De la misma manera, fueron informados de la voluntariedad del proyecto tanto en lo referido a su participación como en lo referido al abandono en cualquier momento del mismo, sin ningún tipo de perjuicio. Se le dio tiempo suficiente para que revisasen el documento de consentimiento informado y para que se respondiese a sus preguntas antes de firmar. Todos ellos firmaron un consentimiento informado de participación en el proyecto.

4.3.2 Seguimiento (intervenciones)

Los participantes del estudio se asignaron a una de las dos ramas del mismo realizándose dos visitas al centro de investigación. En la primera visita los participantes fueron sometidos a las condiciones experimentales 1 y 2, cruzando las condiciones en la segunda visita. En función de la rama asignada, el individuo tomó primero un producto u otro.

- Condición experimental 1. Toma del producto POL
- Condición experimental 2. Toma del producto COM

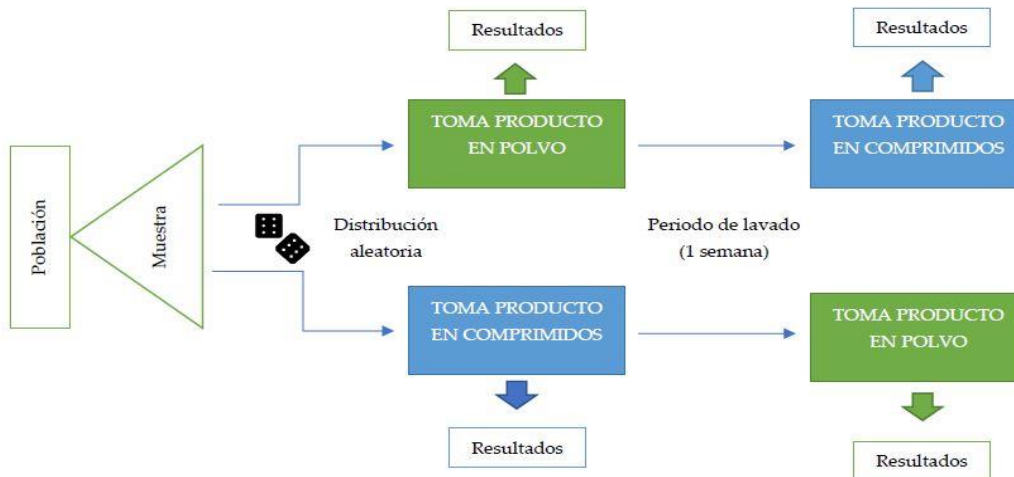


Figura 27. Representación del diseño cruzado del estudio.

En el día acordado, cada participante del estudio vino al laboratorio de fisiología deportiva de la Universidad Católica de Murcia. En la primera visita, se les revisó la información del estudio que el participante tenía por escrito con toda la información acerca del procedimiento. Se procedió a firmar el consentimiento informado previo a cualquier toma de datos y características generales de cada individuo participante.

Se realizó una historia médica completa en la que se recogieron las características generales de cada participante, datos de filiación, antecedentes personales, se midió peso, talla y masa (Báscula Tanita BC-420MA y tallímetro Seca model 711), y un control de actividad física previa. Además, se hizo un control nutricional para poder controlar la dieta a lo largo de todo el proceso y el investigador se aseguró de que no habían consumido en el pasado β -ALA y de que todos los participantes estaban en ayunas desde la noche anterior.

Se explicó el cuestionario del test de parestesia con mucho detalle cada pregunta para que no hubiera ninguna duda a lo largo de todo el proceso. Los participantes rellenaron este cuestionario por separado para familiarizarse con éste y así comprobar que no tenían ninguna patología previa al estudio.

Una vez verificada que la información estaba completa, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Canalización de una vía periférica (vena antecubital) para la extracción sanguínea.
2. Toma de muestra sanguínea (10 ml) previa a la ingesta de uno de los productos de investigación.
3. Ingesta de un producto u otro en función de la aleatorización asignada a cada participante: toma de producto POL o toma de producto COM.
4. Se recolectaron muestras de sangre (10 ml) de la vena antecubital a los siguientes tiempos hasta las 8 horas: tiempo 0 (línea de base previa a la dosis), 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 y 480 min. La muestra fue recogida en tubos con EDTA tripotásico para su posterior análisis de aminoácidos séricos.
5. La evaluación de la parestesia se realizó de forma concomitante tras cada extracción sanguínea, utilizando cuestionarios de calificación perceptiva (VAS, ISS, QLSI), presentados siempre en la misma secuencia y sin permitir que los sujetos retrocedieran para revisarlos.
6. Recolección de orina a las 4 h tras la administración del producto, y a las 8 horas con medición del volumen total de orina.

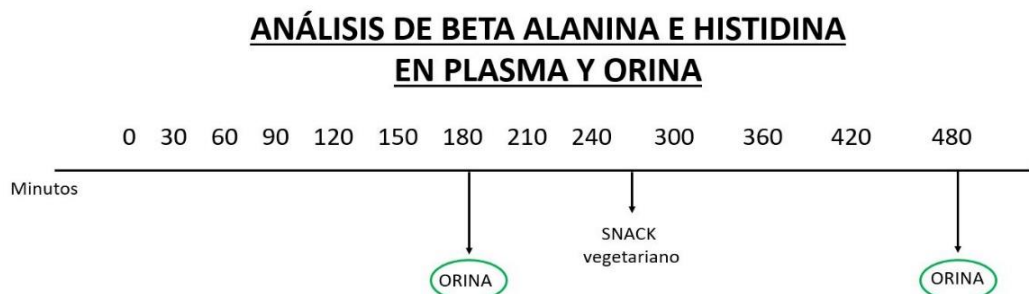


Figura 28. Cronograma de las intervenciones del estudio.

4.3.3 Administración y recogida de muestras

Una vez recopilados los datos de todos los participantes, se le canalizó una vía periférica para la extracción sanguínea en la vena antecubital a cada participante. Se hizo una primera toma de muestra sanguínea (10 ml) previa a la administración de uno de los productos de investigación para tener una base referencial de cada sujeto.

Seguidamente se proporcionó a los participantes el producto de acuerdo con la aleatorización de la secuencia. Los productos POL y COM se proporcionaron en un recipiente sin ningún etiquetado para preservar el cegamiento. Los sujetos se aislaron de los investigadores y los participantes para evitar interferencias en sus respuestas. Los productos se administraron en una sola dosis oral después de ayunar durante la noche y se dejó agua ad libitum. La mitad de los participantes tomaron el producto POL y la otra mitad el producto COM, aleatoriamente, con la misma dosis fijada: 8 gramos de β -ALA. Para preservar el cegamiento durante el ensayo, así como el posterior manejo de dato. Un miembro del personal verificó que se consumiera el producto y se completaran los cuestionarios.

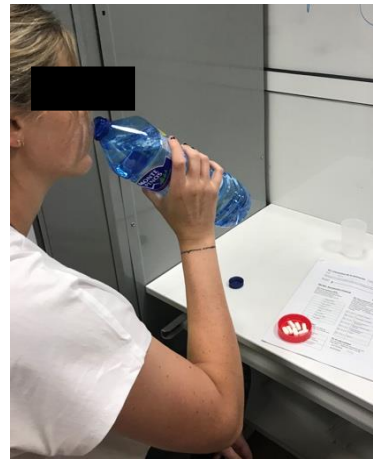
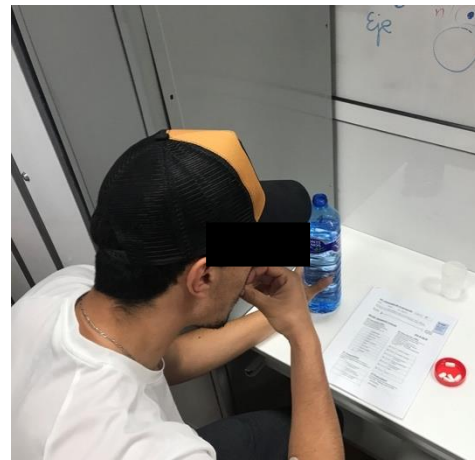
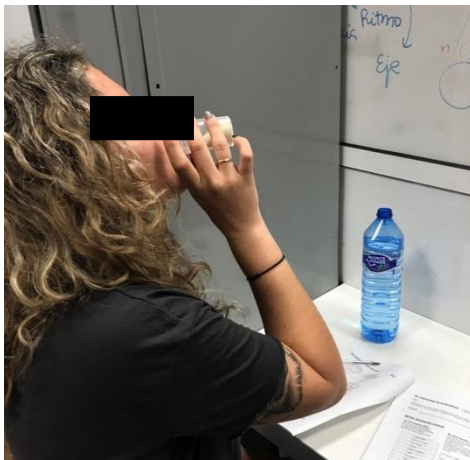


Figura 29, 30, 31 y 32. Composición de los participantes tomando el producto del estudio POL o COM.

Se recogieron muestras de sangre (10 ml) de la vena antecubital. Todas las muestras fueron obtenidas el mismo día durante un total de 8 horas, a tiempo 0 (línea de base previa a la dosis), 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 y 480 min en tubos con EDTA tripotásico para la preparativa de la muestra. Tras introducir la muestra en tubos que contenían K₂EDTA, se centrifugaron a 4500 rpm, durante 5 min y se congeló el plasma resultante a -20°C hasta su transporte a la unidad analítica.

Se recogió la muestra de orina total durante las 4 primeras horas y las 4 siguientes desde el comienzo de la toma de producto hasta la finalización del estudio.

Los participantes bebieron la cantidad de agua que quisieron durante todo el estudio. Cuatro horas después del comienzo del estudio, se proporcionó una comida vegana estandarizada libre de alimentos con β -ALA y L-His. Incluía ensaladas frescas, verduras a la parrilla (cocidas y aderezadas con aceites vegetales), mayonesa sin huevo, especias secas y frutas. A los sujetos se les prohibió cualquier alimento o bebida diferente excepto el agua.

MINUTOS	HORAS	EXTRACCIÓN	ORINA
0	0	Extracción	
30		Extracción	
60	1	Extracción	
90		Extracción	
120	2	Extracción	
150		Extracción	
180	3	Extracción	Orina
210		Extracción	
240	4	Extracción	
270			
300	5	Extracción	
330			
360	6	Extracción	
390			
420	7	Extracción	
450			
480	8	Extracción	Orina

ENFERMERA 1
SUJETO 1
SUJETO 2
SUJETO 3
SUJETO 4
SUJETO 5
SUJETO 6
SUJETO 7
SUJETO 8
SUJETO 9
SUJETO 10

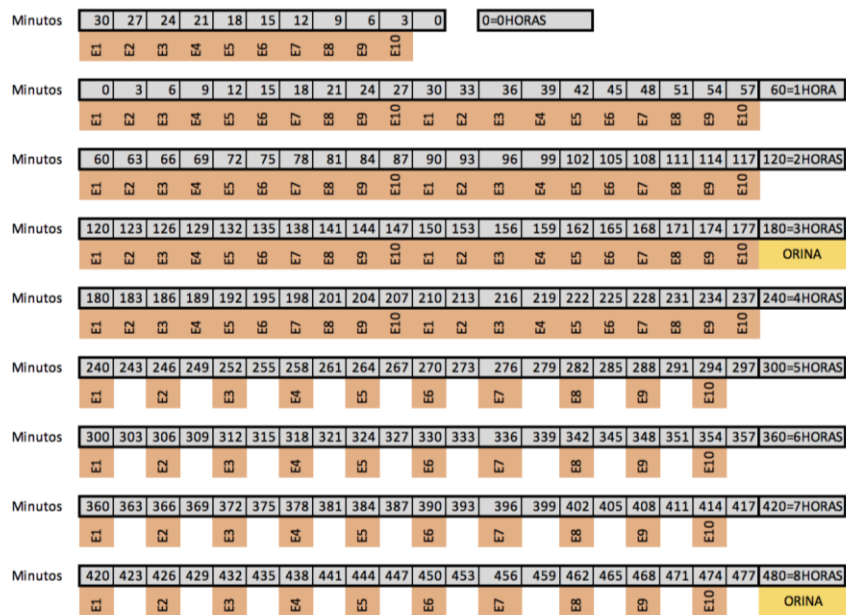


Figura 33. Organización temporal con 6 participantes por día.



Figura 34, 35 y 36. Composición de las extracciones sanguíneas a los participantes durante los tiempos del estudio marcados.

Posteriormente a la toma de cada muestra de sangre, se le dio a cada voluntario el test de parestesia que contenía distintas cuestiones:

- Percepción de intensidad (analógica visual (VAS), puntuación de la intensidad (ISS))
- Inventario cualitativo de los síntomas (QLSI)
- Distribución de las sensaciones en el cuestionario corporal (ISS)
- Rubor.

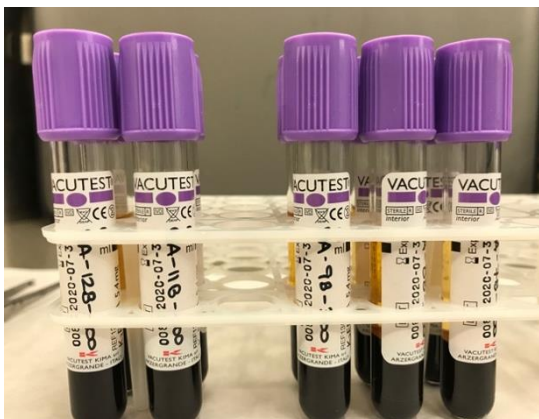
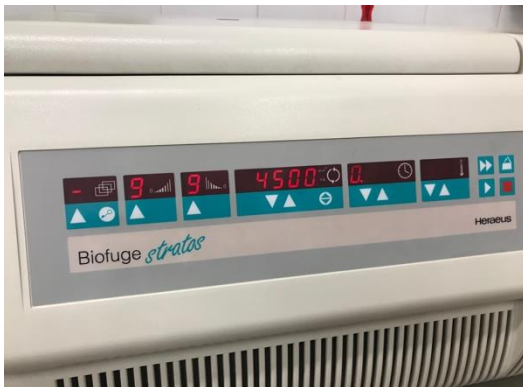
Todos los cuestionarios excepto rubor, fueron autoadministrados

Después de completar el cuestionario, se dio la vuelta a la página y no se permitió al sujeto navegar hacia atrás para revisar.

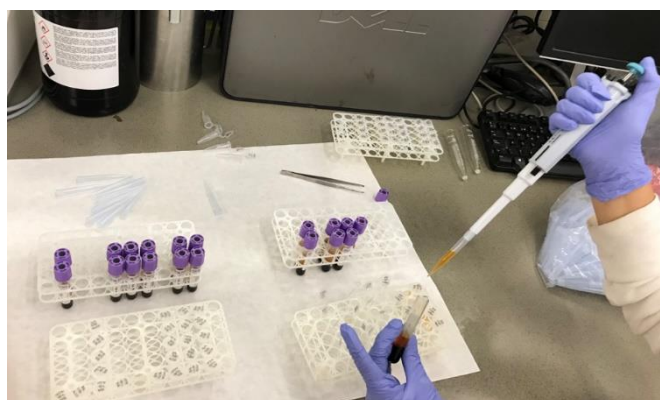
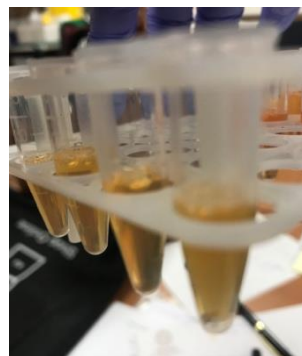
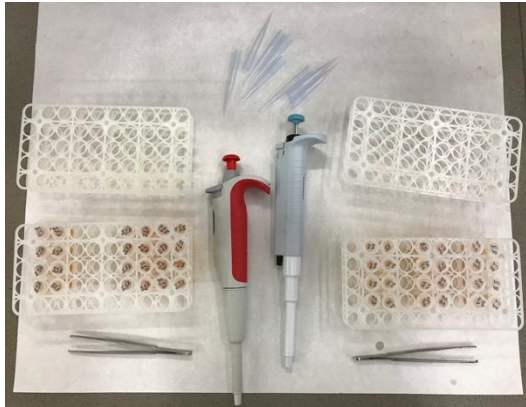
4.3.4 Procesamiento de las muestras

Inmediatamente tras la extracción de sangre, las muestras se centrifugaron (4500 rpm, 5 min, 4 ° C) el sobrenadante se separó y se mantuvo congelado a -20 ° C hasta la determinación de β -ALA, L-His y resto de aminoácidos, llevada a cabo por el Laboratorio de Análisis Clínicos, Centro médico Virgen de la Caridad, Cartagena, España.

El método utilizado fue el descenso crioscópico. El descenso crioscópico es el método considerado “gold standard” en la medición de osmolalidad que permite la determinación de la concentración. Usaron el programa de control externo o comparación interlaboratorios para asegurar la calidad del método. El equipo utilizado fue el Osmo1, de Advanced Technologies, diseñado para muestras clínicas de tipo acuoso como serían suero y orina.



Figuras 37, 38, 39, 40, 41 y 42. Composición de la preparativa de muestra: Centrifugación



Figuras 43, 44, 45, 46 y 47. Composición de la preparativa de muestra: Separación del plasma.

Transcurrido el período de lavado de una semana entre las dos fases del estudio, los voluntarios regresaron al laboratorio para la administración del segundo producto según la secuencia establecida en el cruce. Se repitió exactamente el mismo protocolo de ensayo de la visita 1 cruzando los productos.

4.4 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS

4.4.1 Análisis no compartimental

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando Phoenix® 8.2 (Certara USA, Inc., Princeton, NJ). Se utilizaron técnicas no compartimentales para calcular los principales parámetros farmacocinéticos individuales tanto de β -ALA como de L-His. La concentración plasmática máxima de β -ALA (C_{MAX}) y el tiempo hasta C_{MAX} (T_{MAX}) se obtuvieron a partir de los perfiles farmacocinéticos; la constante de velocidad de eliminación (k_{el}) se calculó mediante regresión log-lineal de los datos de concentración-tiempo en la pendiente terminal; la semivida de eliminación ($t_{1/2}$) fue de $\ln 2/k_{el}$; el área bajo la curva hasta la última concentración ($AUC_{0 \rightarrow last}$) se calculó utilizando el método de los trapezoides, el AUC extrapolado ($AUC_{last \rightarrow \infty}$) fue C_{last} / k_{el} (C_{last} es la última concentración) y la exposición total ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) fue la adición de ambas áreas. El tiempo de residencia medio $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ y $MRT_{0 \rightarrow last}$ se calcularon como $AUMC_{0 \rightarrow last} / AUC_{0 \rightarrow last}$ y $AUMC_{0 \rightarrow \infty} / AUC_{0 \rightarrow \infty}$ respectivamente, donde AUMC es el área bajo el primer momento de la curva. El aclaramiento oral (Cl / F) se calculó como $D / AUC_{0 \rightarrow \infty}$ donde D es la dosis y el volumen aparente de distribución en estado estacionario (V / F) fue $MRT \times Cl / F$.

La constante de velocidad de absorción K_a se calculó con la ecuación $MRT_{PO} = MAT + MRT_{IV}$ donde MAT es el tiempo medio de absorción o $1 / K_a$ y MRT_{IV} es el MRT tras la administración IV o $1 / k_{el}$, asumiendo que el aclaramiento permanece constante entre las vías oral e intravenosa. De manera similar, el efecto máximo (E_{MAX}), el tiempo hasta E_{MAX} ($T_{E_{MAX}}$) y el área bajo la curva de efecto (AUEC) se calcularon a partir de las curvas individuales respuesta (intensidad de parestesia)-tiempo.

4.4.2 Análisis compartimental

Se realizó un análisis compartimental del perfil de concentración plasmática-tiempo para evaluar el modelo farmacocinético que mejor describiera los perfiles de β -ALA e L-His usando las concentraciones promedio para cada tiempo para cada brazo del estudio. Seguidamente, se realizó el ajustado monocompartimental y bicompartimental con ausencia o inclusión de tiempo de latencia a los datos promedio con ponderación uniforme a $1/C$ utilizando el algoritmo de Gauss-Newton (Levenberg y Hartley). Los parámetros se obtuvieron informados como media \pm DE y coeficiente de variación.

También se realizó un análisis de correlación entre la concentración plasmática y los valores de intensidad de parestesia tanto individualmente como los valores promedio de concentración e intensidad de parestesia para evaluar su aparición tras la administración oral de ambos productos. Por tanto, se obtuvieron gráficos de histéresis para evaluar el perfil concentración-efecto con ambos productos.

4.4.3 Métodos estadísticos

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos mediante técnicas no compartimentales se presentan como media \pm desviación estándar e intervalos de confianza (IC) del 95%. La comparación de parámetros y la secuencia cruzada y la evaluación de los efectos del período entre la prueba y los resultados de referencia se analizaron utilizando la prueba de Wilcoxon. La bondad de ajuste para evaluar el modelo compartimental más probable se determinó según el coeficiente de correlación y el Criterio de información de Akaike (AIC) y se seleccionó el que tenía el valor de AIC más bajo como el más probable. Se realizó una comparación entre los parámetros compartimentales usando un test-z. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Todo el análisis estadístico farmacocinético se realizó usando las herramientas estadísticas incluidas en el software Phoenix 8.2.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se realizó siguiendo las Normas de Buena Práctica Clínica y las condiciones que deben regir los estudios de investigación con humanos que se delimitan en la Declaración de Helsinki (última conferencia en Fortaleza (Brasil), 2013).

4.5.1 Evaluación del comité ético de investigación

Siguiendo las recomendaciones generales sobre investigación con seres humanos, el estudio se sometió a la consideración del Comité de Ética de la Universidad Católica San Antonio de Murcia que dio su aprobación (código de estudio CE021902) (ANEXO 7).

4.5.2 Hoja de información para el paciente y consentimiento informado

Antes de que se llevara a cabo alguna prueba o procedimiento específico del estudio, se pidió a los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión que revisaran el documento de consentimiento informado, realizaran las preguntas necesarias para que pudieran ser respondidas antes de firmar el documento de consentimiento informado aprobado por el Comité Ético.

Cada individuo fue informado de forma oral y por escrito de la metodología del estudio, así como de los posibles efectos indeseables que podían aparecer como consecuencia de las distintas determinaciones que se realizaron (extracciones sanguíneas y parestesia). De la misma forma, los participantes fueron informados de la voluntariedad del proyecto tanto en lo referido a su participación como en lo referido al abandono en cualquier momento del mismo sin ningún tipo de perjuicio o explicación necesaria. Así mismo, todos fueron conocedores de las características del producto que ingerirán y de los posibles efectos indeseables que podían aparecer durante su toma. Todos ellos firmaron un consentimiento informado de participación en el proyecto y otro para las extracciones sanguíneas.

4.5.3 Confidencialidad de los datos

Siempre se mantuvieron los niveles más altos de conducta profesional y confidencialidad y se cumplió la legislación nacional vigente sobre protección de datos (Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales). El derecho de los pacientes a la confidencialidad debía ser respetado. La identidad de los pacientes se codificó en los documentos del estudio y sólo personal debidamente autorizado tuvo acceso a los datos personales identificables cuando los procedimientos de verificación de datos exigían la inspección de esa información.

Asimismo, fue responsabilidad del investigador informar al sujeto a estudio de modo expreso, preciso e inequívoco, de que sus datos se incorporaron a una base de datos informática, la cual sólo se empleó con finalidades de investigación y que el paciente no podría ser identificado de ninguna forma en dicha base de datos, y de la identidad y dirección del responsable del tratamiento de dicha base de datos.

Todos los datos consignados en los cuadernos de recogida de datos fueron tratados de forma confidencial. En ninguno de los registros efectuados ha constado el nombre de los pacientes, sino que éstos fueron identificados a través de un número correspondiente al código del paciente.

Los datos se incorporaron a una base de datos propiedad de Universidad Católica San Antonio de Murcia, los cuales serán cancelados cuando dejen de ser necesarios y no serán usados para finalidades incompatibles con aquellas para las que los datos hubieran sido recogidos.

V - RESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1 DESARROLLO DEL PRODUCTO DE β -ALA DE LIBERACIÓN CONTROLADA.

5.1.1 Selección de β -ALA pura y recubrimiento.

Para realizar el recubrimiento, se procedió primero a la búsqueda de β -ALA pura, ingrediente principal de nuestro formulado. Durante el desarrollo del recubrimiento, se observó que el tamaño de partida de las partículas era fundamental para la realización del proceso de recubrimiento y cumplimiento del perfil de liberación. Por lo tanto, se analizaron distintos tamaños hasta obtener una que cumpliera con especificaciones necesarias para los productos diseñados. Se comenzó con un tamaño de 40 mesh, siendo este demasiado grande y dificultosa para ingesta de las cantidades marcadas, una segunda β -ALA pura de 100 mesh, con mejores resultados organolépticos aunque no los idóneos para las cantidades de ingesta planeadas. Por último, se llegó al resultado adecuado en formato de β -ALA de 200 mesh de tamaño. Los certificados de análisis se encuentran en el ANEXO 8.

En las fotografías se pueden comprobar los distintos tamaños de β -ALA hasta conseguir el tamaño óptimo:



Figuras 48, 49 y 50. Distintos tamaños de β -ALA. De izquierda a derecha: 40 mesh, 100 mesh y 200 mesh

Seleccionadas las distintas β -ALA puras, se procedió al recubrimiento con el equipo piloto Jet Coater 10L. En las fotografías se puede comprobar cómo ha ido variando el tamaño de β -ALA recubierta hasta conseguir el tamaño óptimo:



Figura 51. Distintos tamaños de β -ALA recubierta. De izquierda a derecha: 40 mesh, 100 mesh y 200 mesh

5.1.2 Liberación in vitro

La propuesta del proyecto es que la dosificación con la fórmula piloto desarrollada de liberación controlada sea capaz de mantener niveles constantes β -ALA en plasma de forma estable y sin caídas bruscas o picos debidos a la liberación del ingrediente activo durante su periodo de absorción.

Los resultados obtenidos en los test de liberación sostenida de las formulaciones preliminares fueron los siguientes:

PRUEBA 1: Recubrimiento de muestra 1.- β -ALA de 40 mesh o 400 μm .

En esta prueba los porcentajes de liberación no fueron constantes y el tamaño de partícula resultó demasiado grande:

Tabla 6. Desarrollo del recubrimiento 1 con β -ALA de 40 mesh o 400 μm .

Tiempo transcurrido	% Liberación
1 hora	14.4%
2 horas	51.8%
4 horas	89.4%
6 horas	101.6%

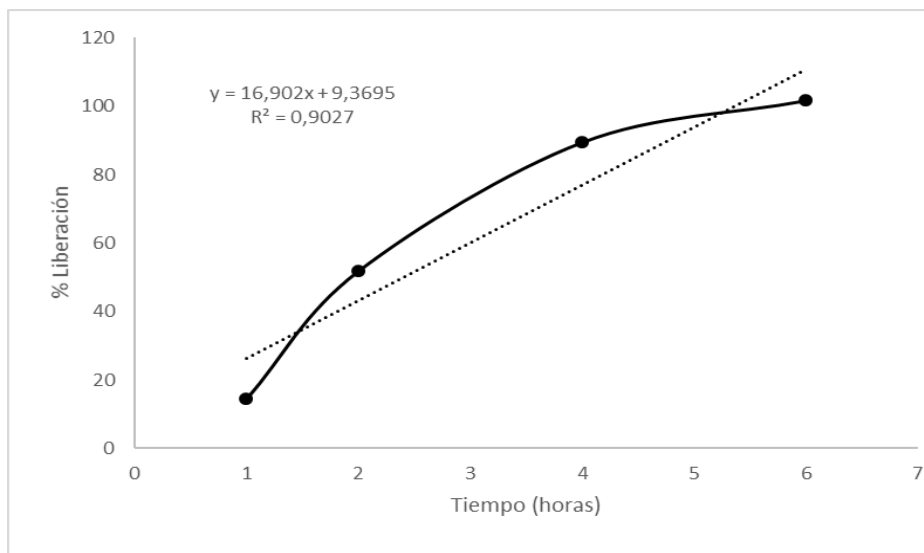


Figura 52. Ratios liberación β -ALA desarrollo 1.

PRUEBA 2: Recubrimiento de muestra 2.- β -ALA de 100 mesh o 149 μm .

En esta segunda prueba se observa que hay una liberación constante, pero a nivel sensorial se comprobó que la granulometría obtenida resultó inadecuada para la ingesta planificada.

Tabla 7. Desarrollo del recubrimiento 2 con β -ALA de 100 mesh o 149 μm

Tiempo transcurrido	% Liberación
1 hora	5.5%
2 horas	19.3%
4 horas	67.6%
6 horas	96.8%

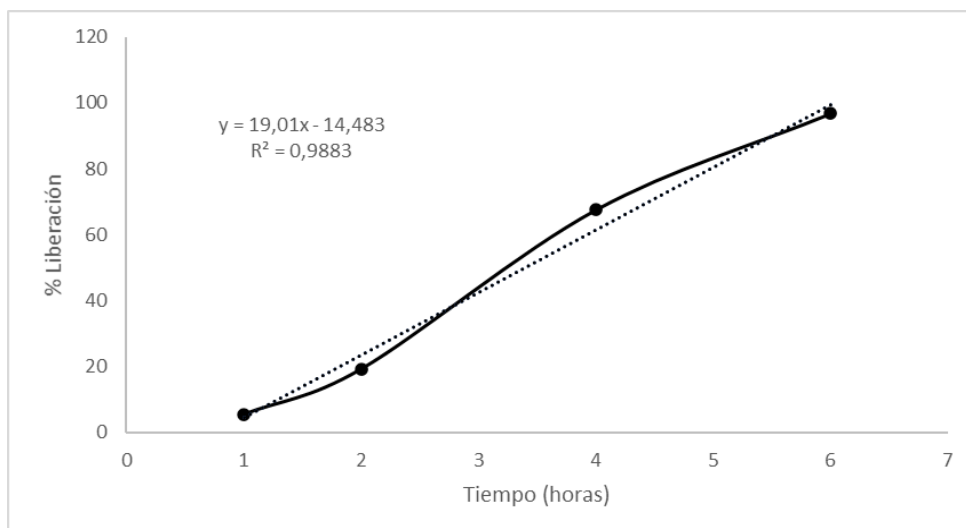


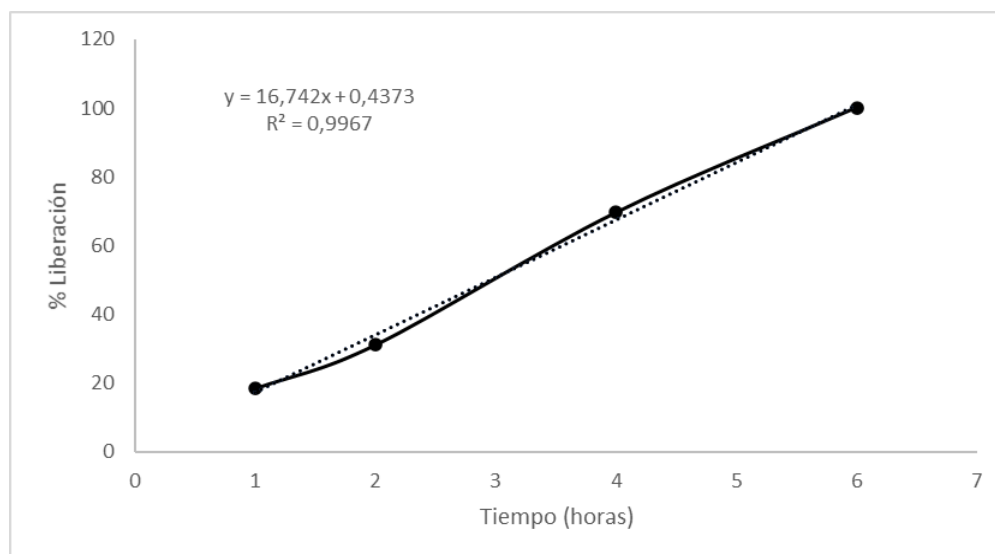
Figura 53. Ratios liberación β -ALA desarrollo 2.**PRUEBA 3:** Recubrimiento de muestra 3.- β -ALA de 200 mesh o 74 μm .

En esta última prueba se observa que tenemos liberación hasta el tiempo objetivo de 6 horas y los % de liberación durante el transcurso del tiempo son constantes consiguiendo el propósito perseguido. A nivel sensorial se comprobó que la granulometría obtenida resultó conforme. Su ajustado resultó en una pendiente de 16.742 ± 1.3679 y una ordenada en origen de 0.4373 ± 5.1639 y r^2 0,9967.

Tabla 8. Desarrollo del recubrimiento 3 con β -ALA de 200 mesh o 74 μm

Tiempo transcurrido	% Liberación
1 hora	18.4%
2 horas	31.3%
4 horas	69.6%
6 horas	100.1%

A



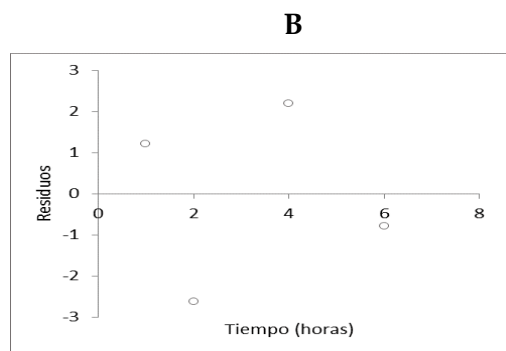


Figura 54. A: Ratios liberación β -ALA desarrollo 3 y **B:** gráficos residuales

5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio doce voluntarios sanos (seis hombres y seis mujeres) de nacionalidad europea o sudamericana, todos ellos de raza blanca de los cuales once lo completaron (un sujeto masculino no acudió a la segunda visita). Los sujetos tenían 25.6 ± 3.2 años (rango: 24–32 años), pesaban 68.1 ± 8.0 kg (50.3–83 kg), 1.74 ± 0.10 m (1.51–1.83 m) de estatura y su masa magra media era 52.1 ± 9.0 kg (38,1–67,6 kg). Las características demográficas individuales se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Datos demográficos de todos los participantes en el estudio

Sujeto	Edad	Sexo	Peso (Kg)	Altura (cm)	Masa magra (Kg)
1	24	F	61,5	162	41,5
2	-	M	-	-	-
3	30	F	68,2	171	43,2
4	25	M	72,9	182	61,2
5	27	F	68,2	177	42,5
6	32	M	76,0	179	60,1
7	28	F	58,8	158	39,5
8	21	M	83,0	183	67,7
9	26	F	50,3	157	40,3
10	23	M	61,4	168	50,1
11	24	M	85,1	177	67,0
12	23	F	55,0	151	38,1

5.3 FARMACOCINÉTICA

5.3.1 Concentraciones plasmáticas de β -Alanina

Se determinaron las concentraciones de β -ALA en cada voluntario tras la administración de POL o COM según su secuencia aleatoria. Las tablas 10 y 11 muestran las concentraciones de β -ALA individuales en cada tiempo de muestra tras la administración de POL o COM respectivamente. Asimismo, la Figura 55 muestran los perfiles farmacocinéticos individuales tras la administración de POL o COM.

Tabla 10. Concentración plasmática por sujetos de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de β -ALA (polvo) (μ Mol/L)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1,00	-	1,80	5,80	3,70	1,00	8,30	6,30	1,00	3,50	3,70	1,00
30	313,20	-	72,40	263,40	87,00	299,30	95,80	225,50	52,00	92,70	106,30	309,00
60	838,70	-	642,10	1146,80	541,10	1230,80	1096,40	646,50	548,00	950,70	704,80	798,20
90	1280,70	-	1101,10	823,60	860,70	1419,70	1551,40	745,00	812,30	1131,00	881,40	803,80
120	1338,70	-	**	852,50	**	1016,60	1171,90	724,90	800,10	1127,40	752,60	779,10
150	738,40	-	644,70	809,50	587,20	264,40	1407,40	529,90	639,10	1004,40	609,40	709,70
180	331,00	-	585,50	567,10	451,30	257,10	836,30	369,00	410,10	699,90	276,60	740,90
210	387,50	-	359,40	286,40	197,90	174,70	291,70	168,30	597,90	461,20	133,20	518,40
240	140,40	-	206,00	243,70	109,40	75,60	227,80	176,70	361,80	271,00	119,70	760,90
300	25,80	-	170,90	94,30	49,50	**	**	68,80	140,50	140,50	55,00	**
360	56,20	-	56,70	51,50	34,20	41,00	37,60	46,90	50,20	62,40	28,40	117,80
420	9,70	-	37,00	38,40	35,50	30,90	28,60	35,00	53,50	50,30	19,30	110,20
480	25,70	-	19,00	20,90	18,50	5,90	17,50	24,30	37,50	49,40	21,30	54,90

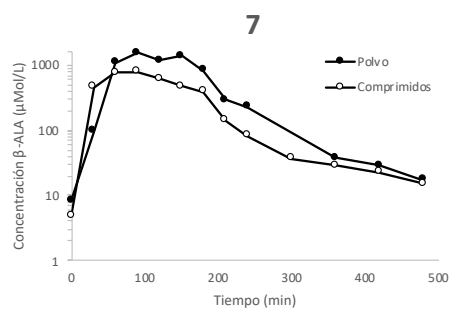
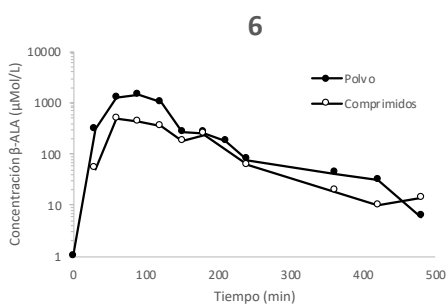
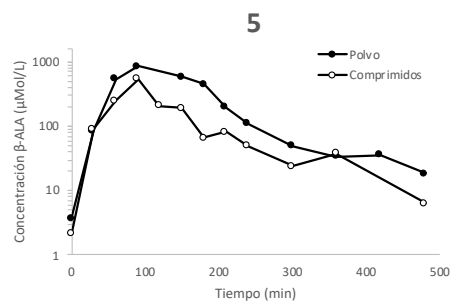
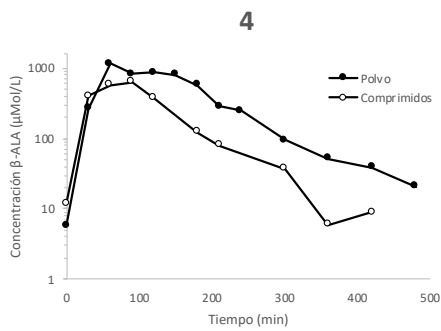
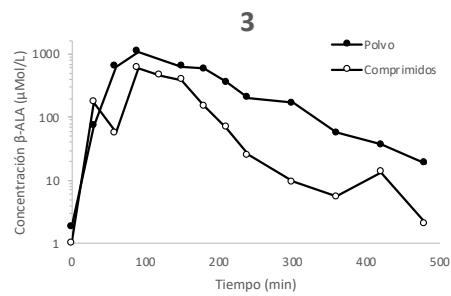
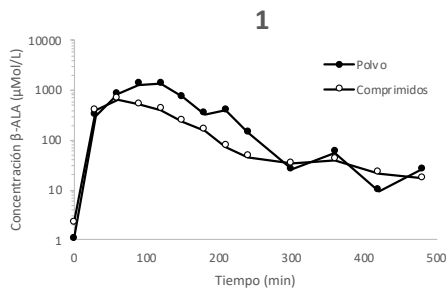
*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no válida.

Tabla 11. Concentración plasmática por sujetos de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de β -ALA (comprimidos) (μ Mol/L)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	2,10	-	1,00	11,80	2,10	**	4,90	6,70	8,90	3,40	1,00	1,00
30	400,70	-	173,50	400,10	89,70	50,50	456,30	117,40	42,40	128,00	147,20	135,70
60	666,10	-	57,50	569,30	252,70	485,70	765,10	513,50	272,80	423,80	175,10	807,20
90	516,00	-	599,00	631,40	546,40	419,30	786,20	855,40	1008,50	698,90	306,80	627,70
120	402,00	-	454,30	372,40	208,90	349,00	616,10	366,40	738,00	420,60	202,00	281,60
150	232,40	-	390,20	**	194,20	174,50	480,90	292,30	762,50	284,20	177,70	98,80
180	157,60	-	151,20	124,10	65,10	236,50	391,50	177,90	418,80	164,90	88,20	61,40
210	74,00	-	68,50	79,60	81,30	**	142,20	136,70	***	96,60	80,50	29,10
240	45,40	-	25,60	**	49,00	60,80	82,60	86,40	219,20	88,20	**	53,50
300	34,10	-	9,60	36,50	24,10	**	36,50	88,40	149,30	40,30	19,40	31,00
360	40,30	-	5,50	6,00	37,70	18,80	29,20	22,30	75,40	26,80	12,40	12,80
420	21,60	-	13,60	9,00	**	9,90	22,80	18,10	41,40	16,30	20,80	19,50
480	17,30	-	2,10	**	6,30	13,50	15,10	19,70	31,30	26,00	***	15,90

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** muestra no válida; y *** muestra no tomada.

A continuación, se representan los perfiles individuales tras la administración oral de β -ALA en el producto POL y COM:



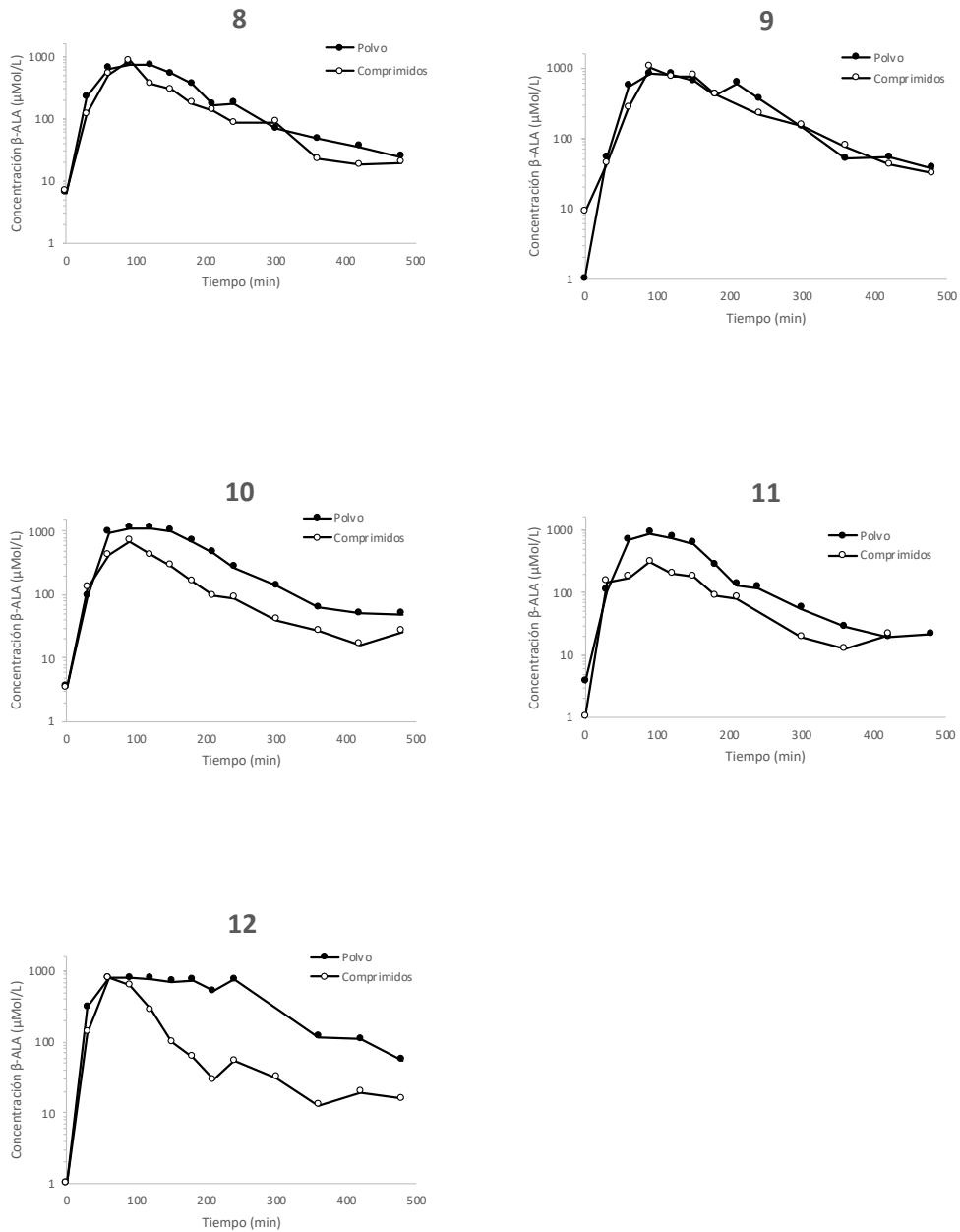


Figura 55. Perfil farmacocinético plasmático de β -ALA individuales tras la administración oral de una dosis de 8 gramos. (●) formulación en polvo de liberación controlada (POL), (○) comprimidos de liberación controlada (COM).

Asimismo, en la tabla 12 se muestran los valores promedio de las concentraciones de β -ALA para ambas formulaciones y en la Figura 56 se representa la curva concentración plasmática – tiempo de β -ALA obtenida con los valores promedio de las concentraciones de β -ALA, donde pueden contrastarse las diferencias en sus perfiles farmacocinéticos.

Tabla 12. Concentración plasmática promedio de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos.

Tiempo (min)	Concentración β -ALA (μ Mol/L)	
	Polvo	Comprimidos
0	3,37 \pm 2,53	4,29 \pm 3,75
30	174,24 \pm 106,78	194,68 \pm 149,75
60	831,28 \pm 243,98	453,53 \pm 256,58
90	1037,34 \pm 278,27	635,96 \pm 194,65
120	951,53 \pm 219,95	401,03 \pm 168,51
150	722,19 \pm 291,14	308,77 \pm 200,38
180	502,25 \pm 196,96	185,20 \pm 125,67
210	325,15 \pm 154,34	87,61 \pm 34,64
240	244,82 \pm 189,92	73,01 \pm 60,12
300	87,37 \pm 52,13	46,22 \pm 41,57
360	52,99 \pm 23,87	26,87 \pm 21,03
420	40,76 \pm 26,13	17,32 \pm 9,00
480	27,03 \pm 14,63	16,80 \pm 9,51

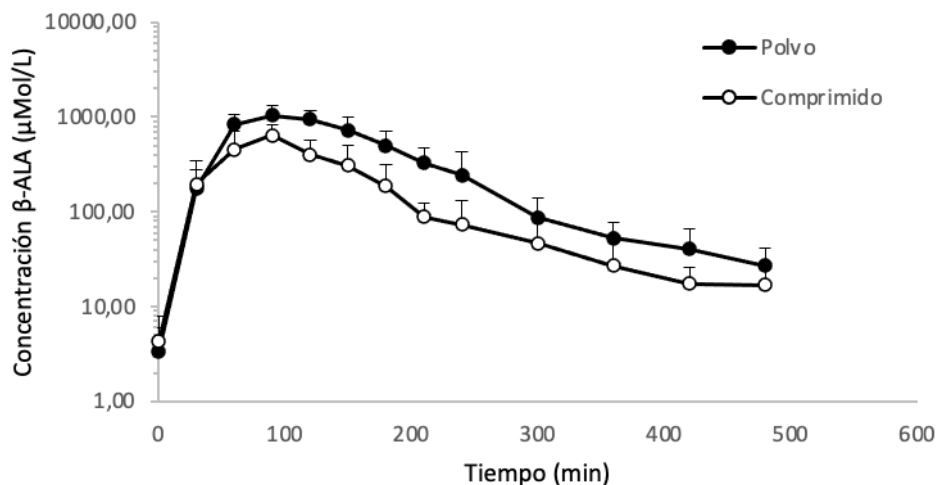


Figura 56. Perfil farmacocinético plasmático medio de β -ALA después de la administración oral de 8 gramos a voluntarios sanos. (●) formulación en polvo de liberación controlada (POL), (○) comprimidos de liberación controlada (COM).

5.3.2 Análisis farmacocinético no compartimental de β -ALA

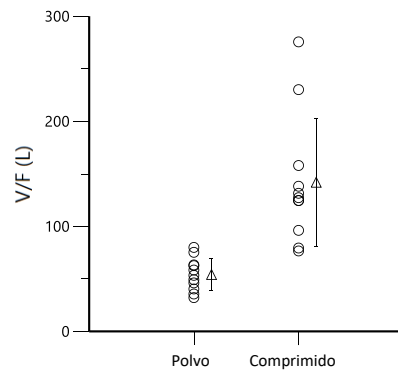
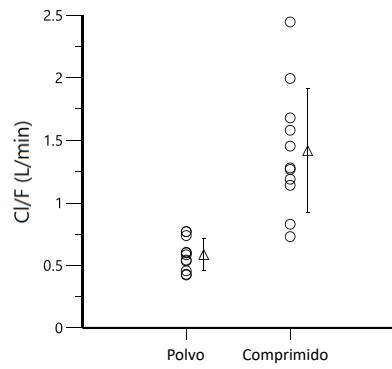
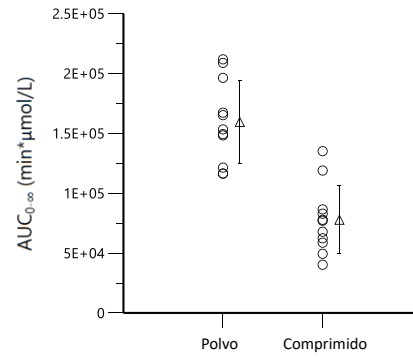
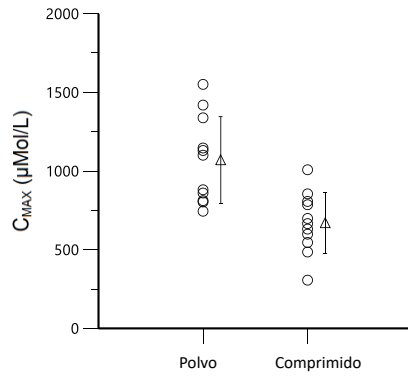
Se realizó el análisis no compartimental de los perfiles individuales de cada formulación tras la administración de POL o COM según su secuencia aleatoria. Las tablas 13 y 14 muestran los valores individuales de los principales parámetros farmacocinéticos y la figura 57 la distribución individual de los principales parámetros farmacocinéticos.

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos individuales no compartimentales de la formulación en polvo (POL).

Sujetos	Parámetros farmacocinéticos (POL)									
	K_e (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	T_{MAX} (min)	C_{MAX} ($\mu\text{mol/L}$)	$AUC_{0 \rightarrow last}$ (min* $\mu\text{mol/L}$)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (min* $\mu\text{mol/L}$)	V/F (L)	Cl/F (L/min)	$MRT_{0 \rightarrow last}$ (min)	$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (min)
1	0,0151	46,04	120	1338,7	165606,82	167313,71	35,61	0,5361	125,65	129,95
3	0,011	63,23	90	1101,1	151617,12	153350,39	53,36	0,5849	152,61	157,34
4	0,011	62,81	60	1146,8	163328,72	165222,55	49,19	0,5429	138,79	143,74
5	0,0102	67,7	90	860,7	114583,69	116390,70	75,28	0,7707	140,89	147,67
6	0,0104	66,95	90	1419,7	147781,07	148350,96	58,4	0,6046	114,57	116,34
7	0,0132	52,64	90	1551,4	210506,72	211835,72	32,16	0,4234	136,26	138,89
8	0,0092	75,04	90	745	118819,72	121450,29	79,95	0,7386	140,62	150,32
9	0,0096	72,23	90	812,3	145524,72	149432,34	62,55	0,6003	165,19	176,15
10	0,0099	70,05	90	1131	191378,53	196370,59	46,16	0,4568	150,37	161,32
11	0,0122	56,99	90	881,4	114777,06	116528,38	63,29	0,7698	131,68	138,15
12	0,0106	65,17	90	803,8	203716,76	208878,84	40,38	0,4294	178,06	187,84

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos individuales no compartimentales de β -ALA en la formulación en comprimidos (COM).

Sujetos	Parámetros farmacocinéticos (COM)									
	K_e (1/min)	$t_{1/2}$ (min)	T_{MAX} (min)	C_{MAX} ($\mu\text{mol/L}$)	$AUC_{0 \rightarrow last}$ (min* $\mu\text{mol/L}$)	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (min* $\mu\text{mol/L}$)	V/F (L)	Cl/F (L/min)	$MRT_{0 \rightarrow last}$ (min)	$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (min)
1	0,009	76,61	60	666,1	81071,73	82983,93	131,47	1,1894	117,36	128,26
3	0,0135	51,37	90	599	58603,26	58758,88	124,48	1,6797	124,79	125,92
4	0,0133	52,09	90	631,4	76442,86	77119,23	96,18	1,2798	105,26	108,68
5	0,0087	79,97	90	546,4	48753,29	49480,12	230,13	1,9947	135,69	142,45
6	0,01	69,25	60	485,7	61097,74	62446,5	157,91	1,5806	133,72	143,36
7	0,0105	66,32	90	786,2	117550,07	118994,89	79,36	0,8294	120,7	126,23
8	0,009	77,37	90	855,4	84356,66	86555,59	127,28	1,1403	135,09	146,69
9	0,0095	72,7	90	1008,5	131896,42	135179,17	76,58	0,7301	163,88	174,1
10	0,0102	68,14	90	698,9	75312,79	77868,77	124,61	1,2675	133,43	148,04
11	0,0089	78,07	90	306,8	37997,59	40340,42	275,58	2,4467	125,03	148,7
12	0,0105	65,88	60	807,2	66374,13	67885,28	138,18	1,4539	109,85	120,2



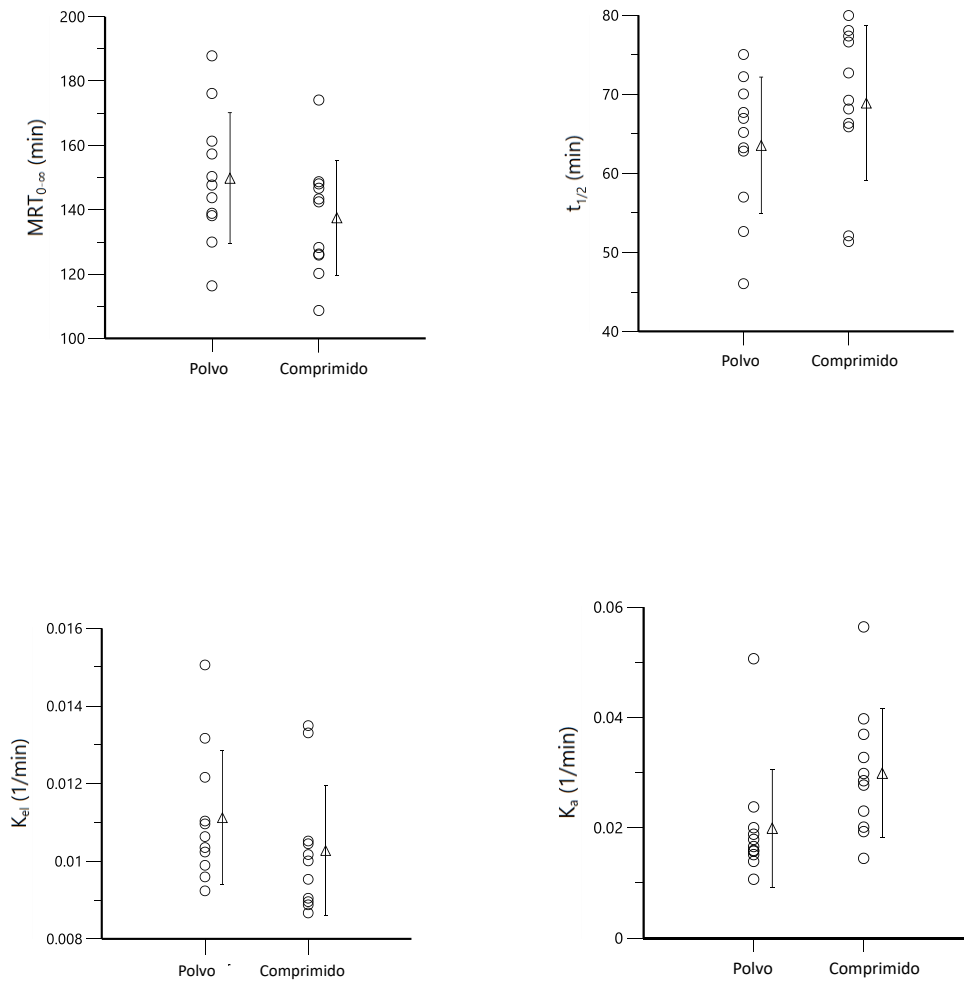


Figura 57. Distribución individual de los principales parámetros farmacocinéticos.

En la siguiente tabla 15 se muestran los valores promedio de parámetros farmacocinéticos principales para ambas formulaciones indicando los que mostraron diferencias significativas entre ambas formulaciones.

Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de las formulaciones de polvo (POL) y de comprimidos (COM). Los datos se presentan como media \pm DS. n=11.

Parámetros (unidades)	Polvo	Comprimidos	Valor p
K_e (1/min)	0.0111 \pm 0.002	0.0103 \pm 0.0020	0.2850
$t_{1/2}$ (min)	63.5 \pm 8.7	68.9 \pm 9.8	0.1994
T_{MAX} (min)	90 \pm 13	82 \pm 14	0.2767
K_a (min ⁻¹)	0.0199 \pm 0.0107	0.0299 \pm 0.0121	0.0834
C_{MAX} (μ mol/L)	1072 \pm 276	672 \pm 192	0.0045
$AUC_{0 \rightarrow last}$ (min* μ mol/L)	157058 \pm 34097	76314 \pm 27838	< 0.0001
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (min* μ mol/L)	159557 \pm 34708	77965 \pm 28275	< 0.0001
V/F (L)	54.2 \pm 15.5	142.0 \pm 60.9	0.0004
CL/F (L/min)	0.587 \pm 0.128	1.417 \pm 0.498	< 0.0001
$MRT_{0 \rightarrow last}$ (min)	143 \pm 19	128 \pm 16	0.0449
$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (min)	150 \pm 20	138 \pm 18	0.1373

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en C_{MAX} , AUC, V/F, CL/F y MRT. La C_{MAX} , $AUC_{0 \rightarrow last}$ y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ fueron 1.6, 2.1 y 2.1 veces más altos en el producto de prueba y su AUC extrapolado fue 1.7% y 2.2% respectivamente. Esto produjo un aumento de biodisponibilidad de β -ALA de 2,1 veces en la nueva formulación POL. La K_a fue 0,67 veces más baja en el producto POL, y V/F y CL/F disminuyeron 0,38 y 0,41 veces paralelo al F más alto. Por último, el $MRT_{0 \rightarrow last}$ fue ligeramente mayor en el producto POL. Los demás parámetros, K_e , K_a , T_{MAX} , y $t_{1/2}$ no mostraron diferencias significativas entre las formulaciones administradas.

5.3.3 Análisis farmacocinético compartimental de β -ALA

Además del análisis independiente de modelo, se exploró el modelado compartimental. Se ajustaron varios modelos y condiciones a los datos medios experimentales consolidados: modelos mono- y bicompartimental, inclusión del tiempo de latencia en la absorción y varios tipos de ponderación según $1/C^n$ o \hat{C}^n donde C es la concentración y \hat{C} la concentración predicha por el modelo y n toma el valor 0 (sin ponderación), 1 y 2 como exponente. Tras una inspección visual de los perfiles generados, de la dispersión de los residuales ponderados frente a los valores predichos y los valores predichos frente a observados (Figura 58) y el CV de los parámetros, se eligió la inversa de la concentración ($1/C$) como esquema de ponderación.

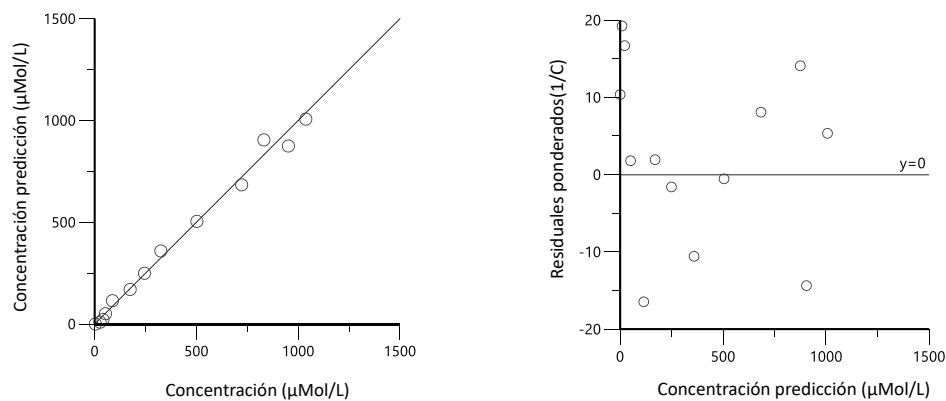


Figura 58. Gráficos de ajuste de correlación y residuales.

El ajuste inicial se realizó utilizando un modelo de un compartimento seguido del bicompartimental y posteriormente se procedió a incorporar el tiempo de latencia (T_{LAG}) en ambos modelos siguiendo el esquema de ponderación escogido. El AIC fue menor en el modelo monocompartimental en

ambos casos (140.0 y 122.5 para POL y COM respectivamente). Cuando se añadió el tiempo de latencia a tanto el modelo monocompartimental como el bicompartimental mejoraron los resultados y se obtuvieron valores de AIC similares para cada modelo en ambos productos (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros de bondad de ajuste a modelos compartimentales: r (coeficiente de correlación entre los valores observados y predichos), S (estimación de la desviación estándar residual), AIC (criterio de información de Akaike) para cada modelo probado: monocompartimental (1C), 1C con tiempo de latencia (1C Tlag), bicompartimental (2C) y 2C con tiempo de latencia (2C Tlag). DF: grados de libertad.

Estimación	1C	1C Tlag	2C	2C Tlag
DF	10	9	8	7
Polvo				
R	0.8916	0.9953	0.8908	0.9963
AIC	140.0	104.3	144.1	103.6
S	54.80	13.53	61.51	12.82
Comprimidos				
R	0.9331	0.9812	0.9333	0.9856
AIC	122.5	110.6	126.4	109.31
S	27.93	17.25	31.14	15.95

Por tanto, siguiendo el principio de parsimonia, se eligió el modelo más simple (menor número de parámetros) como el mejor para describir los datos según el siguiente modelo monocompartimental extravascular:

$$C_p = \frac{F \cdot D \cdot ka}{V (ka - ke)} (e^{-ke(t-tlag)} - e^{-ka(t-tlag)})$$

El ajuste produjo las siguientes ecuaciones:

$$\text{Formulación POL: } C_p = 8003 (e^{-0,0147 (t-26,3)} - e^{-0,0208 (t-26,3)})$$

$$\text{Formulación COM: } C_p = 1940 (e^{-0,0143 (t-23,2)} - e^{-0,031 (t-23,2)})$$

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos después del análisis compartimental para el modelo de un compartimento con tiempo de latencia, se enumeran en la Tabla 17. Además de la identificación del tiempo de latencia que fue similar en ambas formulaciones (26,3 y 23,2 min en formulación en polvo y comprimidos respectivamente) el modelo también permitió el cálculo de la constante de absorción K_a que fue levemente mayor en el producto COM ($0.0310 \pm 0.0159 \text{ h}^{-1}$) pero no alcanzó diferencias estadísticamente significativas con el producto POL ($0.0147 \pm 0.0043 \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas para C_{MAX} y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ que fueron 1,9 y 2,2 veces mayores después de la administración del producto POL ($p < 0,001$). Además, T_{MAX} fue significativamente mayor en el producto POL que en el producto COM, 83 ± 3 frente a 70 ± 7 min, respectivamente ($p < 0,05$). De manera similar, CL / F y V / F fueron 0,46 y 0,45 veces más pequeños, de acuerdo con el aumento de 2,2 veces en la biodisponibilidad.

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos compartimentales de las formulaciones de polvo (POL) y comprimidos (COM). Los datos se presentan como media \pm DS. ns: no significante, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Parámetros (unidades)	Polvo	Comprimidos	Valor p
K_e (1/min)	0.0147 ± 0.0043	0.0143 ± 0.0040	Ns
$t_{1/2e}$ (min)	50.0 ± 13.7	48.5 ± 13.5	Ns
K_a (1/min)	0.0208 ± 0.0078	0.0310 ± 0.0159	Ns
$t_{1/2a}$ (min)	33.2 ± 12.4	22.3 ± 11.6	Ns
t_{lag} (min)	26.3 ± 0.9	23.2 ± 3.0	Ns
T_{MAX} (min)	83.0 ± 3.5	69.5 ± 6.5	*
C_{MAX} ($\mu\text{mol/L}$)	1012 ± 47	540 ± 54	***
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (min* $\mu\text{mol/L}$)	158721 ± 5632	73320 ± 5062	***
V/F (L)	38.3 ± 10.9	85.6 ± 23.0	*
CL/F (L/min)	0.565 ± 0.020	1.223 ± 0.085	***
$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (min)	67.8 ± 19.5 (28.8%)	70.0 ± 20.1	Ns

5.3.4 Concentraciones plasmáticas de L-Histidina

Se determinaron las concentraciones de L-His en cada voluntario tras la administración de POL o COM según su secuencia aleatoria. Las tablas 18 y 19 se muestran las concentraciones de L-His individuales en cada tiempo de muestra tras la administración de POL o COM respectivamente. Las concentraciones obtenidas tras la administración de COM representan los niveles basales de L-His ya que esta formulación no incluía L-His, a diferencia de POL. Asimismo, la Figura 59 muestra los perfiles farmacocinéticos individuales tras la administración de POL o COM.

Tabla 18. Concentración plasmática por sujetos de L-His después de la administración oral de 300 mg a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración L-His (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	51,14	-	64,65	93,93	97,60	66,88	65,44	56,09	72,12	98,46	90,42	77,26
30	101,03	-	78,09	150,26	121,17	107,72	122,10	95,00	95,82	113,00	122,01	115,03
60	109,49	-	74,42	102,46	118,67	154,14	92,77	105,98	81,96	121,44	112,40	122,79
90	86,23	-	69,71	77,74	132,20	77,76	91,01	59,63	73,46	77,63	75,13	84,71
120	70,12	-	32,29	85,32	66,22	70,77	63,47	80,67	75,22	96,56	79,73	95,43
150	75,83	-	82,76	83,44	90,11	89,77	75,01	76,85	67,58	91,18	82,03	95,78
180	62,98	-	63,08	74,40	119,00	91,01	63,75	66,03	81,57	89,37	75,51	108,69
210	60,03	-	66,42	76,02	105,82	59,59	65,96	60,35	118,90	100,92	88,43	78,48
240	71,46	-	73,50	112,08	89,29	56,75	77,56	62,12	70,14	91,83	87,64	88,98
300	57,58	-	65,99	75,62	97,68	64,56	73,75	62,73	56,87	73,53	90,48	67,67
360	52,50	-	71,99	76,00	85,59	77,36	61,04	48,53	60,54	80,35	52,79	79,11
420	47,79	-	85,54	65,76	135,10	75,90	54,32	56,14	57,90	81,63	89,60	92,54
480	58,51	-	59,22	59,18	71,07	53,06	52,22	51,44	49,88	89,39	78,05	99,55

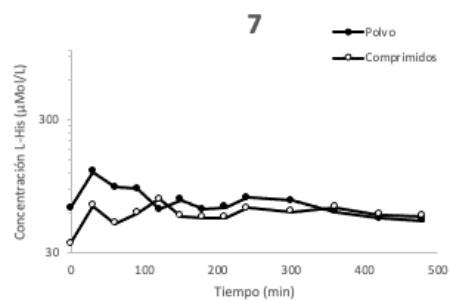
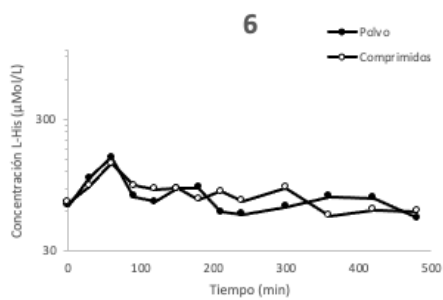
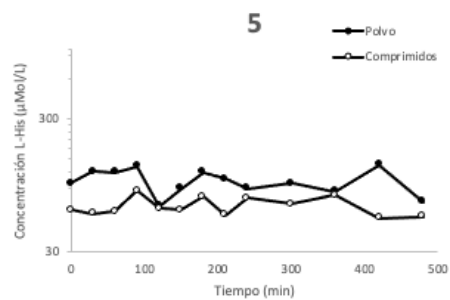
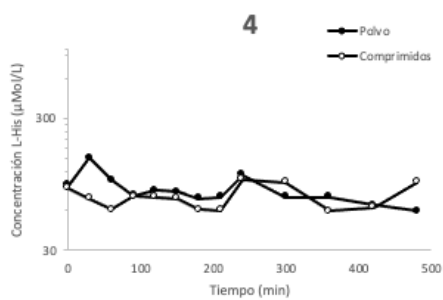
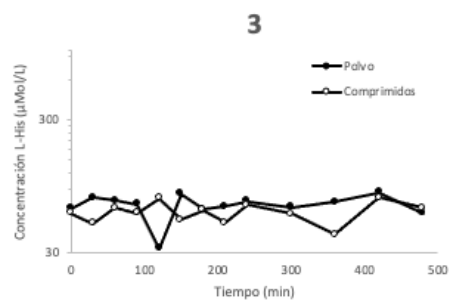
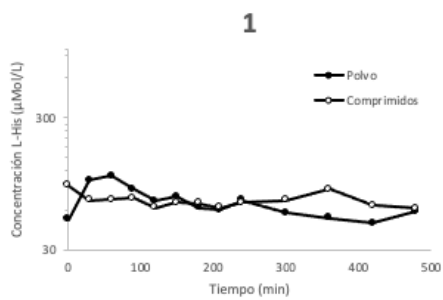
*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** muestra no válida

Tabla 19. Concentración plasmática por sujetos de L-His después de la administración oral a voluntarios sanos del producto de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM). Los datos representan los niveles basales.

Concentración L-His (comprimidos) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	91,84	-	59,84	89,19	62,04	69,61	35,34	88,12	137,00	117,77	122,59	100,73
30	71,66	-	49,73	73,75	57,90	92,83	68,05	71,40	80,14	115,33	130,39	87,57
60	72,68	-	64,76	60,71	60,40	139,04	49,88	105,66	90,87	89,38	79,71	146,26
90	73,83	-	59,90	76,78	86,14	93,60	59,54	85,55	68,44	156,98	76,52	147,11
120	62,84	-	76,72	76,07	63,63	88,49	75,86	70,51	94,80	119,30	62,57	76,35
150	68,92	-	53,22	74,27	61,75	89,97	56,80	81,28	113,07	113,58	72,78	72,10
180	67,82	-	62,48	60,86	78,25	73,69	55,09	70,47	63,21	94,48	70,61	69,34
210	62,47	-	50,27	60,47	56,77	84,73	54,81	86,31	**	82,19	115,24	55,80
240	68,47	-	68,15	103,70	75,69	71,61	65,44	103,02	63,91	81,12	72,99	105,74
300	71,71	-	58,37	98,23	68,15	90,26	61,40	68,14	55,08	117,56	103,91	64,79
360	86,60	-	41,29	59,18	80,10	55,31	65,80	57,67	59,96	118,87	58,51	93,58
420	64,84	-	78,25	63,10	53,83	61,32	58,28	50,73	51,90	70,91	119,26	66,75
480	61,92	-	65,41	98,76	55,09	60,13	56,68	93,24	73,10	66,99	**	73,29

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

A continuación se representan los perfiles individuales de L-His tras la administración oral de los productos en formato POL y COM, donde se aprecia un ligero aumento de los niveles basales.



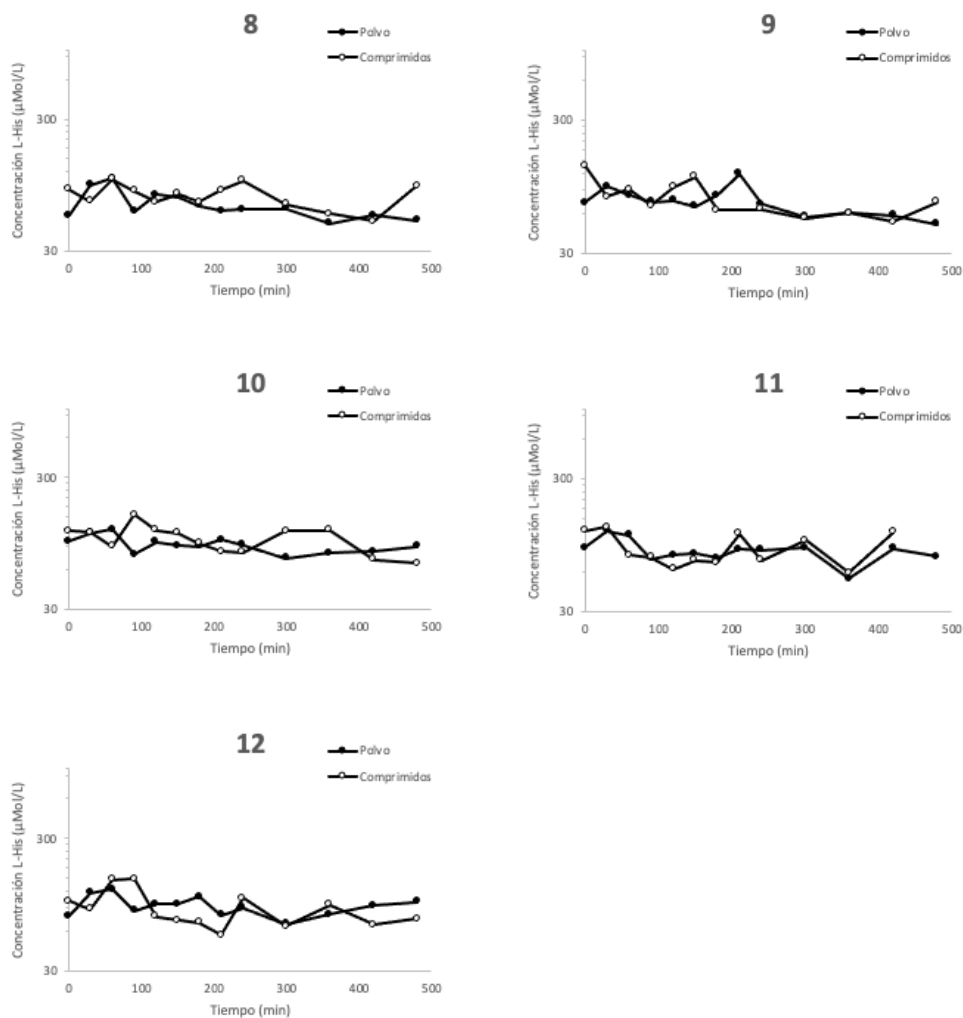


Figura 59. Perfil farmacocinético plasmático de L-His tras la administración oral de POL que contiene 300 mg de L-His y COM que no contiene L-His. Ambas formulaciones contienen 8 gr de β -ALA. (●) formulación en polvo de liberación controlada (POL), (○) comprimidos de liberación controlada (COM).

Asimismo, en la tabla 20 se muestran los valores promedio de las concentraciones de L-His para ambas formulaciones y en la Figura 60 se representa la curva concentración plasmática – tiempo de L-His obtenida con los valores promedio de las concentraciones de L-His, donde pueden contrastarse las

diferencias en sus perfiles farmacocinéticos frente a los niveles basales (COM) y la alta variabilidad inter-individual reflejada en la alta sd.

Tabla 20. Concentración plasmática promedio de L-His después de la administración oral a voluntarios sanos.

Concentración L-His ($\mu\text{Mol/L}$)		
Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	75,82 \pm 16,90	88,55 \pm 30,39
30	111,02 \pm 18,94	81,70 \pm 23,89
60	108,77 \pm 21,75	87,21 \pm 31,81
90	82,29 \pm 18,58	89,49 \pm 32,73
120	74,16 \pm 17,64	78,83 \pm 16,83
150	82,76 \pm 8,47	77,98 \pm 20,34
180	81,40 \pm 19,03	69,66 \pm 10,46
210	80,08 \pm 20,71	70,91 \pm 20,59
240	80,12 \pm 15,73	79,99 \pm 16,24
300	71,50 \pm 12,84	77,96 \pm 20,95
360	67,80 \pm 13,07	70,62 \pm 22,08
420	76,57 \pm 24,83	67,20 \pm 19,15
480	65,60 \pm 16,79	70,46 \pm 14,83

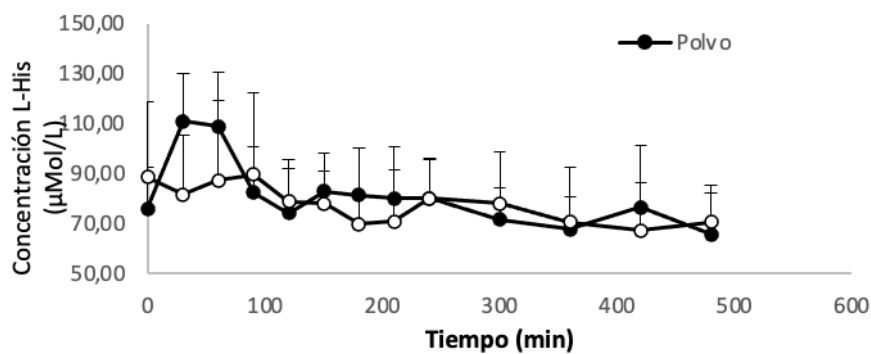


Figura 60. Perfil farmacocinético plasmático promedio de L-His después de la administración oral a voluntarios sanos de los productos POL y COM. (●) formulación en polvo de liberación controlada (POL), (○) comprimidos de liberación controlada (COM). Valores promedio.

5.3.5 Análisis farmacocinético de L-Histidina

Se realizó el análisis de los perfiles individuales de la formulación tras la administración de POL. La tabla 21 muestra los valores individuales de los principales parámetros farmacocinéticos una vez corregidos para eliminar el efecto sustracción de la concentración cero, tomándose como tal la concentración predosis.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos individuales no compartimentales de L-His en la formulación en polvo (POL). La pendiente terminal no pudo calcularse.

Parámetros farmacocinéticos (polvo)			
Sujetos	T _{MAX} (min)	C _{MAX} ($\mu\text{mol/L}$)	AUC _{0→last} (min* $\mu\text{mol/L}$)
1	60	58,4	7614
3	30	13,4	848
4	30	56,3	1946
5	90	34,6	4946
6	60	87,3	4286
7	30	56,7	3287
8	60	49,9	5567
9	30	23,7	1046
10	60	23,0	1126
11	30	31,6	1607
12	60	45,5	2723

En la siguiente tabla 22 se muestran los valores promedio de parámetros farmacocinéticos principales para la formulación POL.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de la formulación de polvo (POL) Los datos se presentan como media \pm DS. n=11

Parámetros (unidades)	Polvo
T _{MAX} (min)	49,09 \pm 20,23
C _{MAX} (μ mol/L)	43,67 \pm 21,11
AUC _{0\rightarrowlast} (min* μ mol/L)	3181,43 \pm 2193,90

De L-His solo se puede calcular AUC, C_{MAX} y T_{MAX} con bastante imprecisión pues no hay suficientes puntos. Estos valores confirman la absorción de L-His pero no tienen un valor comparativo ya que los comprimidos no llevan.

5.3.6 Concentraciones plasmáticas del resto de aminoácidos

Se determinaron las concentraciones del resto de aminoácidos en cada voluntario tras la administración de POL o COM según su secuencia aleatoria. En el ANEXO 9 se muestran las concentraciones individuales de estos aminoácidos en cada tiempo de muestra tras la administración de POL o COM respectivamente. En estos casos no se encontraron diferencias significativas con la toma de los productos en formato POL y COM.

Asimismo, en las tablas 23-41 se muestran los valores promedio de las concentraciones de estos aminoácidos para ambas formulaciones y en la Figura 61 se representa la curva concentración plasmática – tiempo obtenida con los sus valores promedio, donde pueden contrastarse que no hay diferencias en sus perfiles farmacocinéticos frente a los niveles basales (COM).

Tabla 23. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **ÁCIDO ASPÁRTICO** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	1,00 \pm 0,13	1,00 \pm 0,13
30	1,31 \pm 0,63	1,31 \pm 0,63
60	1,09 \pm 0,17	1,09 \pm 0,17
90	1,40 \pm 0,88	1,40 \pm 0,88
120	0,98 \pm 0,23	0,98 \pm 0,23
150	1,15 \pm 0,33	1,15 \pm 0,33
180	0,96 \pm 0,11	0,96 \pm 0,11
210	1,32 \pm 1,05	1,32 \pm 1,05
240	1,04 \pm 0,12	1,04 \pm 0,12
300	0,92 \pm 0,17	0,92 \pm 0,17
360	1,02 \pm 0,42	1,02 \pm 0,42
420	1,03 \pm 0,39	1,03 \pm 0,39
480	0,97 \pm 0,28	0,97 \pm 0,28

Tabla 24. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **TREONINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	138,55 \pm 44,03	148,07 \pm 45,88
30	143,68 \pm 38,34	150,98 \pm 47,09
60	145,67 \pm 40,13	145,66 \pm 43,98
90	141,78 \pm 49,42	147,29 \pm 39,96
120	114,47 \pm 30,35	137,27 \pm 22,58
150	112,40 \pm 20,29	145,73 \pm 47,58
180	127,87 \pm 35,04	123,56 \pm 30,35
210	136,85 \pm 54,10	136,99 \pm 28,41
240	127,62 \pm 50,34	131,78 \pm 26,95
300	105,59 \pm 47,48	137,11 \pm 28,81
360	101,29 \pm 19,00	114,17 \pm 26,20
420	101,30 \pm 41,55	112,85 \pm 35,23
480	100,94 \pm 28,38	113,81 \pm 27,13

Tabla 25. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **SERINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	117,68 \pm 27,28	134,89 \pm 44,08
30	116,12 \pm 22,62	126,02 \pm 34,72
60	126,21 \pm 15,50	121,64 \pm 49,83
90	112,39 \pm 11,34	127,18 \pm 39,83
120	99,81 \pm 19,26	114,44 \pm 31,42
150	102,18 \pm 7,59	118,43 \pm 23,96
180	108,78 \pm 17,27	112,17 \pm 18,07
210	113,22 \pm 53,61	104,29 \pm 20,37
240	106,01 \pm 14,65	119,30 \pm 22,71
300	98,28 \pm 12,76	119,08 \pm 25,60
360	96,70 \pm 13,90	106,59 \pm 32,10
420	99,77 \pm 22,76	106,75 \pm 32,90
480	94,80 \pm 19,03	100,44 \pm 16,28

Tabla 26. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **ASPARAGINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	75,11 \pm 31,65	78,35 \pm 35,67
30	87,84 \pm 32,13	75,80 \pm 29,03
60	86,20 \pm 23,47	88,65 \pm 41,24
90	74,17 \pm 27,51	86,97 \pm 38,42
120	60,07 \pm 20,33	70,70 \pm 36,55
150	76,05 \pm 15,37	82,82 \pm 37,10
180	75,00 \pm 22,33	71,48 \pm 19,57
210	67,49 \pm 28,38	70,11 \pm 22,21
240	77,25 \pm 35,61	81,96 \pm 25,75
300	71,29 \pm 10,85	86,86 \pm 41,48
360	81,69 \pm 13,06	88,24 \pm 39,30
420	76,35 \pm 16,26	96,84 \pm 44,82
480	74,07 \pm 15,85	83,74 \pm 36,47

Tabla 27. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **ÁCIDO GLUTÁMICO** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	73,61 \pm 23,63	76,38 \pm 43,14
30	71,19 \pm 30,52	70,47 \pm 36,44
60	86,38 \pm 49,23	82,04 \pm 60,05
90	75,96 \pm 30,71	96,35 \pm 67,00
120	62,50 \pm 24,43	72,76 \pm 50,03
150	70,18 \pm 25,26	69,86 \pm 42,90
180	66,36 \pm 26,73	66,17 \pm 29,74
210	69,51 \pm 33,62	76,07 \pm 33,69
240	67,84 \pm 24,32	86,62 \pm 56,72
300	67,60 \pm 24,97	76,22 \pm 32,13
360	66,33 \pm 21,80	83,05 \pm 50,33
420	71,85 \pm 34,60	72,20 \pm 37,36
480	70,48 \pm 36,00	78,01 \pm 36,08

Tabla 28. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **GLUTAMINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	462,80 \pm 101,69	557,63 \pm 218,91
30	490,78 \pm 74,66	552,62 \pm 136,35
60	578,84 \pm 84,81	548,20 \pm 171,44
90	487,12 \pm 67,73	560,00 \pm 155,01
120	483,73 \pm 101,53	546,94 \pm 126,64
150	548,54 \pm 84,58	548,09 \pm 141,84
180	514,83 \pm 74,88	527,22 \pm 100,96
210	552,21 \pm 172,57	498,30 \pm 104,50
240	544,19 \pm 110,76	535,17 \pm 83,34
300	438,65 \pm 43,09	531,01 \pm 140,74
360	463,61 \pm 94,06	485,19 \pm 134,09
420	497,30 \pm 130,94	497,92 \pm 109,46
480	447,31 \pm 82,28	458,96 \pm 65,35

Tabla 29. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **PROLINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	162,89 \pm 37,05	180,16 \pm 74,12
30	155,46 \pm 38,06	169,52 \pm 28,59
60	171,78 \pm 36,89	173,00 \pm 40,92
90	149,28 \pm 26,48	177,07 \pm 27,67
120	149,07 \pm 52,95	153,93 \pm 27,21
150	143,38 \pm 29,23	151,22 \pm 29,42
180	138,86 \pm 26,08	144,51 \pm 23,10
210	144,28 \pm 29,57	152,72 \pm 38,77
240	144,29 \pm 28,38	150,38 \pm 29,73
300	142,22 \pm 26,69	163,62 \pm 41,69
360	138,19 \pm 35,68	151,89 \pm 32,93
420	146,91 \pm 26,71	150,06 \pm 29,60
480	130,38 \pm 30,23	162,57 \pm 51,07

Tabla 30. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **GLICINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	192,89 \pm 21,27	214,90 \pm 75,49
30	214,63 \pm 50,34	210,61 \pm 53,49
60	220,94 \pm 53,16	218,07 \pm 61,29
90	189,66 \pm 32,05	219,87 \pm 53,07
120	185,41 \pm 43,43	191,63 \pm 26,86
150	175,30 \pm 25,21	186,43 \pm 35,16
180	187,93 \pm 41,63	173,26 \pm 26,12
210	171,96 \pm 43,18	188,18 \pm 48,39
240	176,72 \pm 43,45	197,13 \pm 62,76
300	171,61 \pm 35,61	198,84 \pm 35,00
360	169,24 \pm 32,54	200,00 \pm 42,05
420	172,61 \pm 32,08	194,51 \pm 55,41
480	168,82 \pm 34,32	172,50 \pm 29,43

Tabla 31. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **ALANINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	279,26 \pm 85,12	347,24 \pm 155,90
30	326,38 \pm 91,17	344,15 \pm 96,19
60	337,28 \pm 86,27	315,81 \pm 101,76
90	290,42 \pm 71,12	340,62 \pm 112,03
120	281,46 \pm 87,95	261,38 \pm 62,29
150	288,45 \pm 69,92	295,60 \pm 68,99
180	254,46 \pm 71,51	261,16 \pm 52,87
210	277,73 \pm 101,54	271,71 \pm 45,68
240	276,77 \pm 54,76	293,05 \pm 95,54
300	301,84 \pm 63,46	361,68 \pm 127,01
360	301,89 \pm 68,88	339,76 \pm 102,33
420	316,34 \pm 68,41	316,39 \pm 106,94

Tabla 32. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **VALINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	73,61 \pm 23,63	76,38 \pm 43,14
30	71,19 \pm 30,52	70,47 \pm 36,44
60	86,38 \pm 49,23	82,04 \pm 60,05
90	75,96 \pm 30,71	96,35 \pm 67,00
120	62,50 \pm 24,43	72,76 \pm 50,03
150	70,18 \pm 25,26	69,86 \pm 42,90
180	66,36 \pm 26,73	66,17 \pm 29,74
210	69,51 \pm 33,62	76,07 \pm 33,69
240	67,84 \pm 24,32	86,62 \pm 56,72
300	67,60 \pm 24,97	76,22 \pm 32,13
360	66,33 \pm 21,80	83,05 \pm 50,33
420	71,85 \pm 34,60	72,20 \pm 37,36
480	70,48 \pm 36,00	78,01 \pm 36,08

Tabla 33. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **METIONINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	23,36 \pm 5,48	25,96 \pm 9,96
30	23,98 \pm 4,96	24,49 \pm 6,18
60	25,37 \pm 6,31	24,65 \pm 8,20
90	21,41 \pm 3,21	25,10 \pm 6,80
120	19,20 \pm 4,77	21,64 \pm 4,04
150	20,33 \pm 3,34	21,53 \pm 5,29
180	20,29 \pm 4,14	19,78 \pm 3,33
210	21,61 \pm 6,07	21,03 \pm 4,36
240	19,46 \pm 4,87	21,51 \pm 4,10
300	17,16 \pm 3,02	20,98 \pm 5,78
360	16,80 \pm 2,68	19,44 \pm 5,67
420	17,79 \pm 4,41	20,03 \pm 4,83
480	18,21 \pm 5,12	18,87 \pm 2,62

Tabla 34. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **ISOLEUCINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	77,73 \pm 15,22	80,16 \pm 29,95
30	74,56 \pm 15,72	71,25 \pm 16,73
60	78,97 \pm 16,93	77,24 \pm 22,04
90	66,03 \pm 11,03	74,57 \pm 19,67
120	58,06 \pm 16,00	68,66 \pm 16,00
150	63,53 \pm 10,92	64,57 \pm 13,34
180	66,88 \pm 15,24	63,68 \pm 10,68
210	70,75 \pm 14,24	72,12 \pm 17,47
240	68,67 \pm 16,16	66,97 \pm 11,64
300	51,85 \pm 8,31	65,37 \pm 17,20
360	53,33 \pm 9,58	56,93 \pm 16,25
420	53,32 \pm 13,79	60,81 \pm 18,91
480	55,71 \pm 16,20	62,35 \pm 10,77

Tabla 35. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **LEUCINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	149,73 \pm 24,30	137,45 \pm 57,14
30	137,09 \pm 21,16	136,38 \pm 37,66
60	143,91 \pm 26,29	144,17 \pm 40,13
90	140,42 \pm 24,13	121,82 \pm 31,83
120	126,58 \pm 25,63	107,09 \pm 26,93
150	121,84 \pm 15,67	115,08 \pm 29,19
180	120,94 \pm 27,96	121,09 \pm 21,44
210	136,11 \pm 26,78	132,93 \pm 35,78
240	127,27 \pm 24,48	125,53 \pm 22,31
300	114,55 \pm 16,86	99,70 \pm 27,55
360	110,88 \pm 17,20	99,14 \pm 28,36
420	115,06 \pm 24,15	98,19 \pm 47,51
480	114,24 \pm 31,51	103,46 \pm 24,64

Tabla 36. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **TIROSINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	60,45 \pm 12,50	70,41 \pm 36,26
30	61,05 \pm 14,40	65,11 \pm 27,59
60	65,22 \pm 14,20	60,03 \pm 19,88
90	52,52 \pm 9,13	63,33 \pm 20,53
120	47,56 \pm 9,84	53,14 \pm 10,35
150	49,92 \pm 10,52	52,67 \pm 12,98
180	47,54 \pm 7,46	49,40 \pm 8,79
210	51,37 \pm 11,11	51,89 \pm 13,78
240	48,32 \pm 12,50	52,49 \pm 15,55
300	45,43 \pm 9,05	49,61 \pm 13,72
360	39,19 \pm 7,13	48,19 \pm 16,34
420	41,98 \pm 10,94	47,84 \pm 18,71
480	42,69 \pm 11,70	47,93 \pm 10,06

Tabla 37. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **FENILALANINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	53,64 \pm 7,57	57,61 \pm 19,80
30	54,75 \pm 9,60	55,13 \pm 14,39
60	61,16 \pm 13,54	55,05 \pm 17,15
90	48,39 \pm 6,61	57,13 \pm 19,04
120	42,95 \pm 10,92	48,10 \pm 9,42
150	49,24 \pm 9,78	50,30 \pm 11,00
180	49,86 \pm 10,35	47,09 \pm 7,57
210	52,29 \pm 15,51	50,75 \pm 15,54
240	52,35 \pm 12,33	50,65 \pm 12,31
300	48,31 \pm 7,44	50,19 \pm 15,99
360	47,58 \pm 8,95	51,12 \pm 18,50
420	50,38 \pm 11,60	51,96 \pm 15,32
480	50,40 \pm 11,94	52,37 \pm 11,59

Tabla 38. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **LISINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	157,81 \pm 34,34	177,60 \pm 55,55
30	167,78 \pm 33,84	168,53 \pm 40,89
60	180,40 \pm 49,31	179,97 \pm 60,61
90	157,33 \pm 33,20	184,06 \pm 68,17
120	144,02 \pm 38,41	164,46 \pm 38,02
150	156,96 \pm 29,49	161,16 \pm 36,69
180	154,18 \pm 42,32	154,59 \pm 29,86
210	163,77 \pm 44,18	156,63 \pm 28,20
240	164,94 \pm 49,71	170,11 \pm 44,35
300	135,24 \pm 19,07	179,61 \pm 52,09
360	145,14 \pm 31,14	165,13 \pm 61,58
420	156,72 \pm 52,20	161,04 \pm 44,26
480	149,23 \pm 54,72	154,31 \pm 35,30

Tabla 39. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **ORNITINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	47,23 \pm 14,56	47,27 \pm 16,61
30	44,79 \pm 14,53	40,53 \pm 20,41
60	53,11 \pm 17,41	42,45 \pm 12,26
90	40,36 \pm 14,40	41,22 \pm 11,96
120	44,00 \pm 20,51	37,58 \pm 11,89
150	38,30 \pm 11,67	43,80 \pm 11,75
180	38,33 \pm 13,28	45,05 \pm 12,17
210	42,27 \pm 15,53	38,09 \pm 12,40
240	44,03 \pm 10,78	46,03 \pm 9,55
300	42,50 \pm 16,07	52,01 \pm 16,34
360	44,73 \pm 14,15	41,71 \pm 11,46
420	39,27 \pm 15,28	40,24 \pm 11,60
480	36,90 \pm 12,61	38,37 \pm 13,44

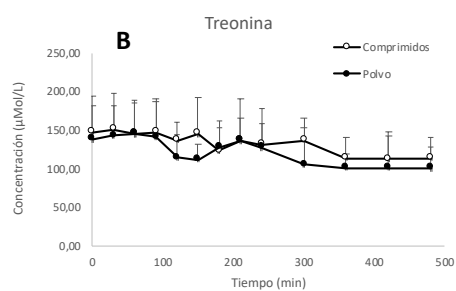
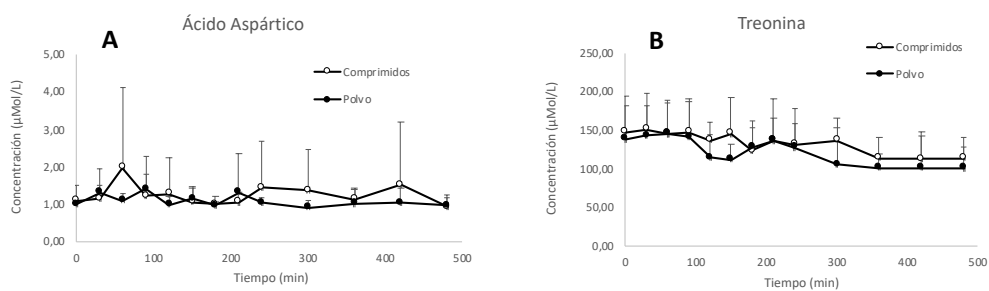
Tabla 40. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **1-METIL-HISTIDINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

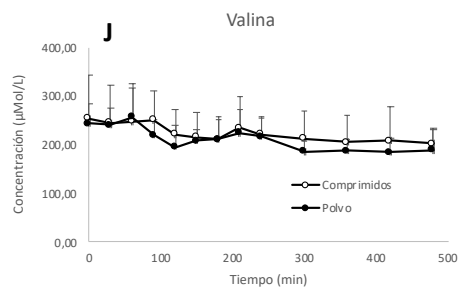
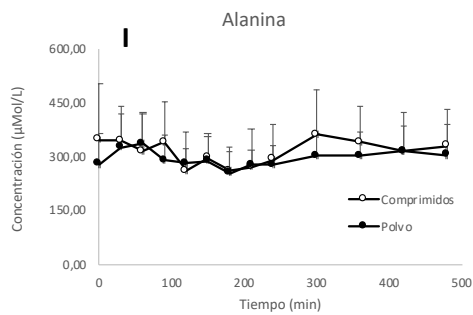
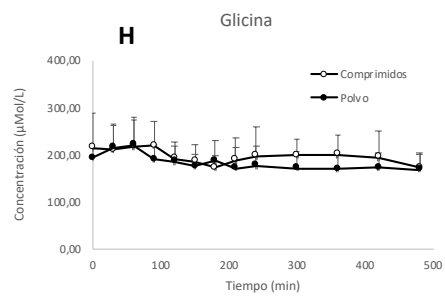
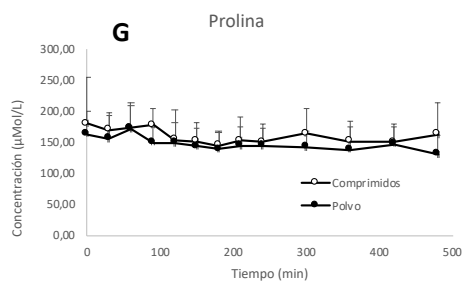
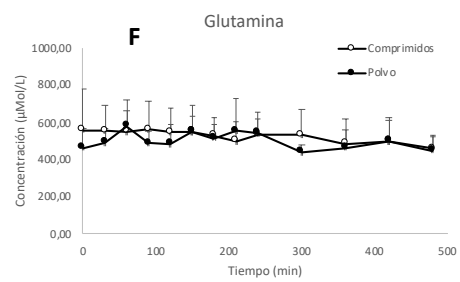
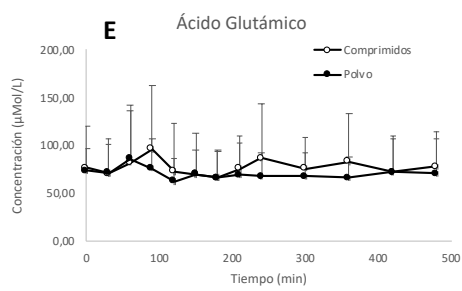
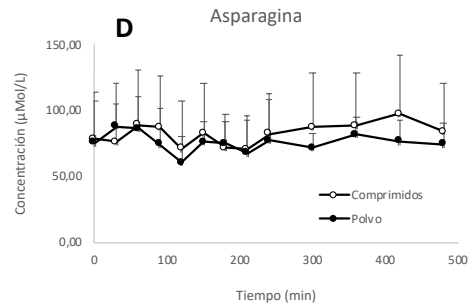
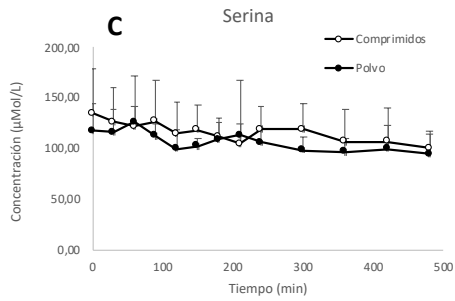
Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	14,37 \pm 13,60	10,87 \pm 13,90
30	11,83 \pm 13,99	10,32 \pm 12,48
60	13,41 \pm 18,01	12,87 \pm 12,24
90	11,06 \pm 11,76	10,83 \pm 12,54
120	6,91 \pm 8,01	10,40 \pm 13,18
150	11,44 \pm 16,32	7,28 \pm 7,17
180	10,17 \pm 10,16	8,42 \pm 9,47
210	9,70 \pm 9,72	11,10 \pm 9,86
240	9,77 \pm 9,92	8,96 \pm 8,34
300	7,70 \pm 10,79	7,27 \pm 6,62
360	9,06 \pm 9,91	8,32 \pm 9,95
420	8,65 \pm 10,74	7,02 \pm 6,97
480	8,50 \pm 6,27	6,38 \pm 5,43

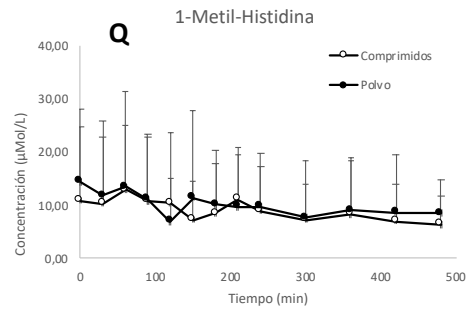
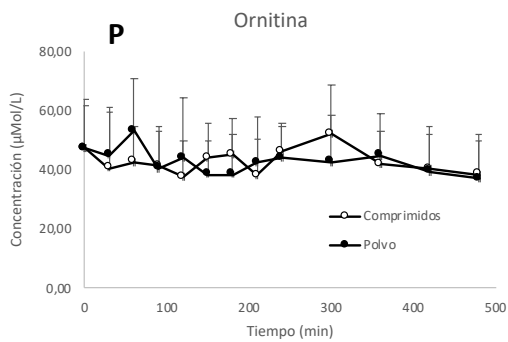
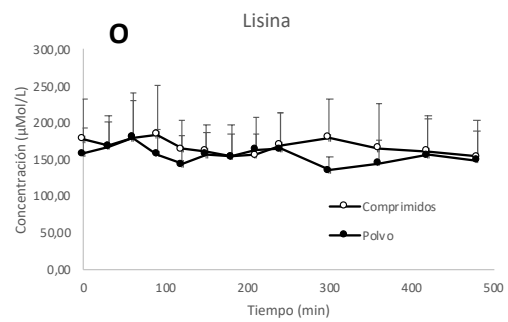
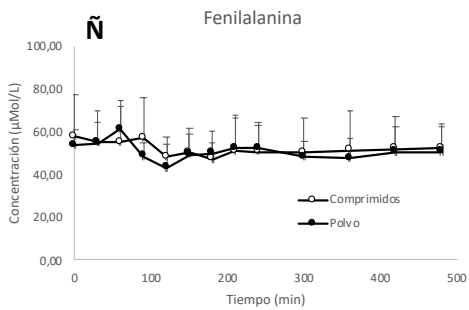
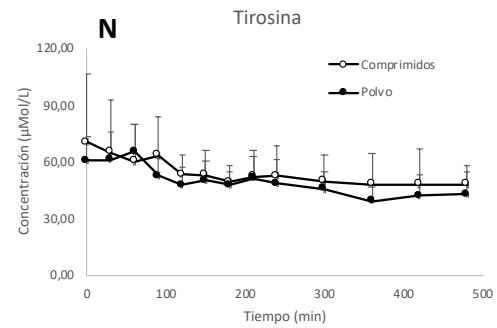
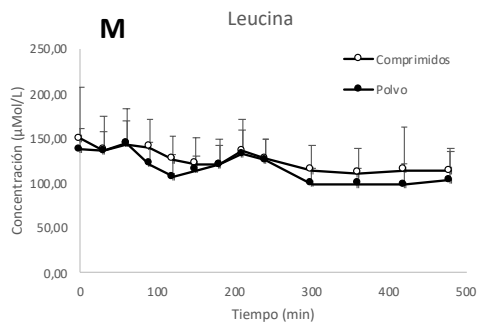
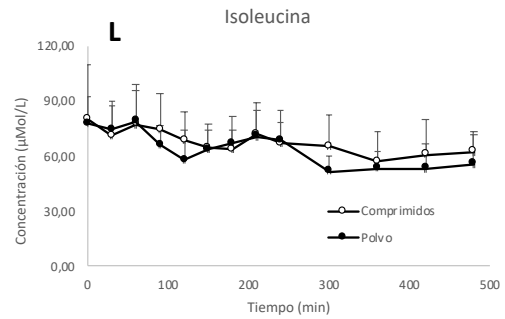
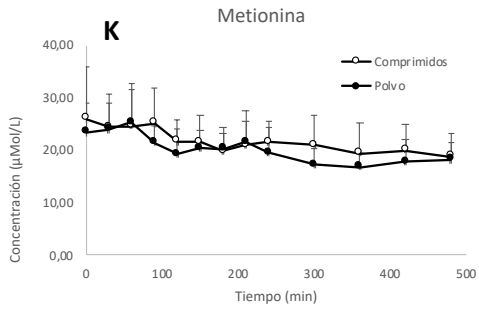
Tabla 41. Concentración plasmática ($\mu\text{Mol/L}$) promedio de **3-METIL-HISTIDINA** tras la administración oral a voluntarios sanos de los productos.

Tiempo (min)	Polvo	Comprimidos
0	4,40 \pm 1,46	4,72 \pm 1,62
30	5,60 \pm 1,28	5,73 \pm 2,24
60	5,12 \pm 2,30	6,19 \pm 2,73
90	4,86 \pm 2,38	5,71 \pm 2,01
120	4,12 \pm 0,91	5,50 \pm 1,85
150	4,58 \pm 2,28	4,87 \pm 1,97
180	4,39 \pm 1,18	5,05 \pm 1,92
210	4,60 \pm 1,18	5,11 \pm 1,80
240	4,61 \pm 1,44	5,18 \pm 1,62
300	4,64 \pm 1,37	5,04 \pm 2,05
360	4,04 \pm 1,44	5,33 \pm 2,14
420	4,10 \pm 1,41	4,75 \pm 2,17
480	4,21 \pm 1,81	4,51 \pm 1,54

A continuación se representan los perfiles medios del resto de aminoácidos tras la administración oral de los productos en formato POL y COM, donde se aprecia que la formulación no afecta a los niveles basales de aminoácidos.







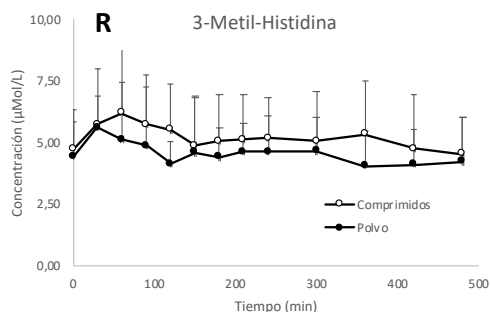


Figura 61. Perfil farmacocinético plasmático del resto de aminoácidos de los sujetos finalmente incluidos después de la administración oral de POL que contiene 8 gr de β -ALA y 300 mg de L-His y COM que contiene 8 gr de β -ALA. (●) formulación en polvo de liberación controlada (POL), (○) comprimidos de liberación controlada (COM).

5.4 EXCRECIÓN URINARIA DE β -ALANINA

Aunque no se pudieron determinar las cantidades absolutas excretadas en orina, se observó que en términos relativos (en referencia la concentración de creatinina), hubo una mayor excreción relativa de β -ALA en orina durante el periodo completo de 8 h de la β -ALA en el producto POL en comparación con la β -ALA del producto COM (18970 ± 12477 frente a 9605 ± 7285 $\mu\text{mol/gr crea}$, Tabla 42 y Figura 62).

Tabla 42. Recuperación en orina de β -ALA para las formulaciones de polvo (POL) y comprimidos (COM).

Tiempo (horas)	Concentración relativa de β -ALA ($\mu\text{mol/gr crea}$)		
	Polvo	Comprimidos	Valor <i>p</i>
T1= 0-4 horas	13033 ± 6736	7742 ± 4409	0,0187
T2= 4-8 horas	5937 ± 6550	1863 ± 3406	0,0734
TOTAL 0-8 horas	18970 ± 12477	9605 ± 7285	0,0216

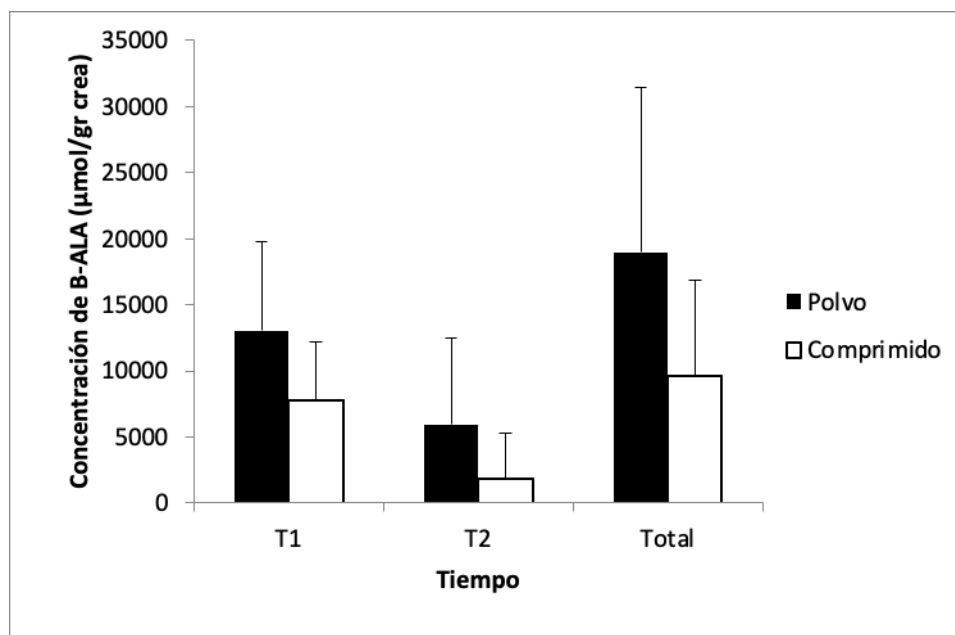


Figura 62. β -ALA en orina en los intervalos de 0-4h, 4-8h y 0-8h después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL y COM.

5.5 ANÁLISIS FARMACODINÁMICO.

No se registraron efectos secundarios significativos adicionales, excepto los niveles esperados de parestesia, objeto de estudio.

5.5.1 Descripción de la intensidad

Debido a que la parestesia es el efecto adverso limitante en la dosificación de β -ALA, la evaluamos con las escalas VAS e ISS. El transcurso de la intensidad en el tiempo después de la administración de cada formulación se muestra en la Figura 63 y los parámetros farmacodinámicos se encuentran listados en la Tabla 43. Con la escala VAS, E_{MAX} fue 4.95 ± 2.32 AU (unidades arbitrarias) y 2.94 ± 2.90 AU en el producto POL versus el producto COM, respectivamente ($p = 0.0864$). El AUEC fue 1.9 veces mayor con el producto POL (no significativo). La escala ISS identificó diferencias estadísticas entre ambas formulaciones: E_{MAX} y AUEC

fueron 1.7 y 1.9 veces mejor en el producto POL, respectivamente, y mostraron una menor variabilidad.

Tabla 43. Modelo del análisis independiente del efecto de parestesia después de la administración de una dosis de 8 gramos de β -ALA en la formulación POL o en comprimido (COM).

Test	Parámetros	Polvo	Comprimidos	P
Puntuación visual analógica (VAS)	TE _{MAX} (min)	65.5 ± 22.5 (34.4%)	49.1 ± 33.6 (68.4%)	0.195
	E _{MAX} (AU)	4.95 ± 2.32 (46.7%)	2.94 ± 2.90 (98.8%)	0.086
	AUEC _{0→last} (AU)	389.1 ± 232.6 (59.8%)	216.4 ± 247.4 (114.5%)	0.107
Puntuación de intensidad de la sensación (ISS)	TE _{MAX} (min)	57.3 ± 21.0 (36.7%)	38.2 ± 23.6 (61.8%)	0.059
	E _{MAX} (AU)	4.91 ± 1.04 (21.3%)	2.91 ± 1.97 (67.8%)	0.009
	AUEC _{0→last} (AU)	448.8 ± 163.8 (36.4%)	240.1 ± 217.7 (90.7%)	0.019

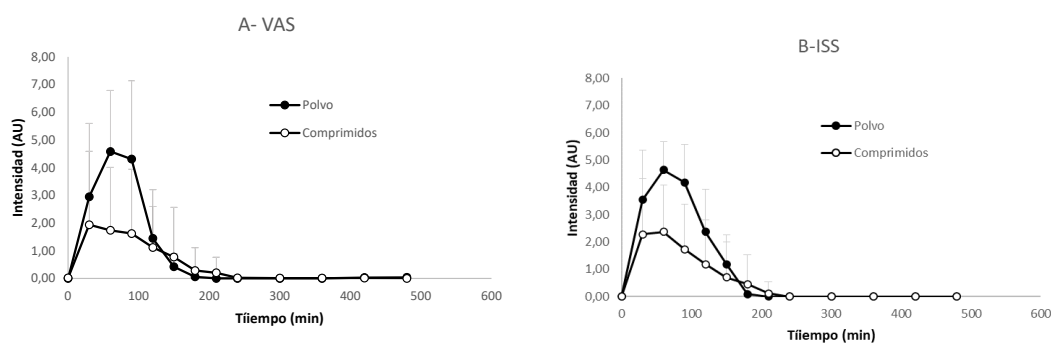


Figura 63. Perfil intensidad – tiempo del efecto medio obtenidos con las escalas de puntuación analógica visual (A) y de puntuación de intensidad de sensación (B) para ambas formulaciones. AU, unidades arbitrarias. Media y SD.

Con el fin de obtener información mecánica de la relación entre la dosis de β -ALA y la parestesia, se realizaron los correspondientes gráficos de histéresis (Figura 64). Estos gráficos relacionan la concentración en plasma de β -ALA con el efecto provocado y permiten identificar posibles efectos de latencia y tolerancia.

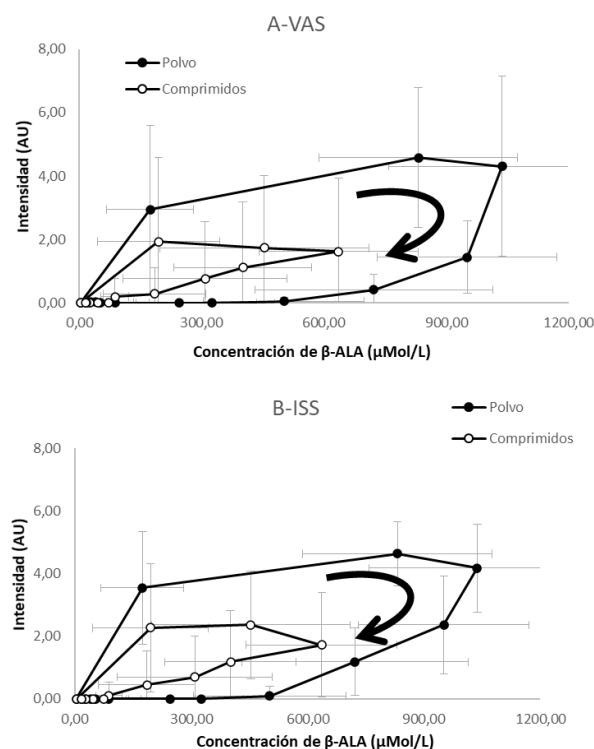


Figura 64. Gráficos de histéresis obtenidos con las escalas de puntuación analógica visual (A) y de puntuación de intensidad de sensación (B) para ambas formulaciones. AU, unidades arbitrarias. Media y SD.

5.5.2 Descripción de los efectos secundarios

La media de las primeras sensaciones en los sujetos que ingirieron producto POL se tuvo a los 24.1 min desde la ingesta del producto, mientras que en el caso del producto COM, se dieron a los 24.8 min. Un sujeto las percibió a 5 y 7 min, mucho más temprano que los demás participantes y otro no percibió ningún efecto en la segunda visita. La media global fue 24,4 min. Datos en la tabla 44.

Tabla 44. Tiempos individuales de percepción de las primeras sensaciones de parestesia tomando tiempo inicial el momento de la toma de producto).

1ª Visita		2ª Visita	
Formato	Tiempo (min)	Formato	Tiempo (min)
Comprimidos	20	Polvo	17
Polvo	30	Comprimidos	36
Polvo	26	Comprimidos	22
Polvo	36	Comprimidos	Ausencia
Comprimidos	7	Polvo	5
Polvo	24	Comprimidos	26
Comprimidos	19	Polvo	22
Comprimidos	53	Polvo	43
Polvo	30	Comprimidos	24
Polvo	15	Comprimidos	25
Comprimidos	16	Polvo	17
Media			
Comprimidos	24,8		
Media Polvo	24,1		
Media Total	24,4		

También se realizó el perfil temporal promedio de cada una de las distintas percepciones. Se calcularon los valores medios y se analizaron las diferencias entre las distintas formulaciones (Tabla 45,46 y gráfica 65).

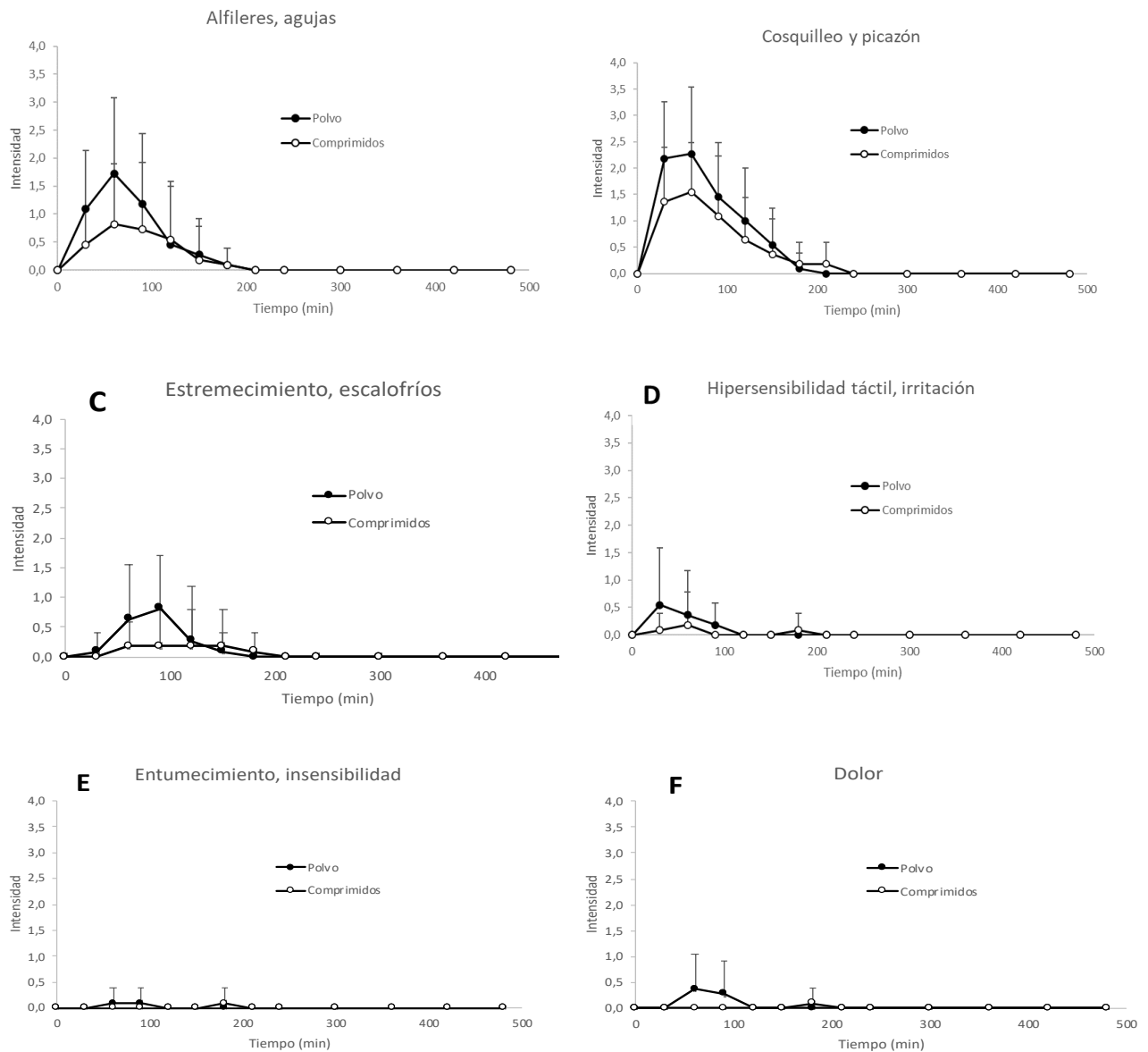


Figura 65. Perfil temporal de la intensidad de los síntomas notificados después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL o en COM de liberación sostenida, utilizando el test de síntomas QLSI. Media de intensidad QLSImax, escala 0-4 (0-8h).

En la evaluación de la descripción de las sensaciones mediante el apartado QLSI del test de parestesia, "cosquilleo" y picazón" fueron las predominantes. Hubo menor sensación de "cosquilleo" y picazón" en comprimidos que en polvo durante el mismo periodo de tiempo (8 horas). Las máximas intensidades de las sensaciones se dieron en tiempo 60 min y tiempo 60-90 minutos desde el momento de la ingesta inicial, en polvo y comprimidos respectivamente.

Se realizó el análisis no compartimental de los perfiles individuales de cada sensación tras la administración de POL o COM según su secuencia aleatoria. Las tablas 47 y 48 muestran los valores individuales de los principales parámetros farmacocinéticos y la tabla 49 muestran los valores promedio de parámetros farmacocinéticos principales para ambas formulaciones indicando los que mostraron diferencias significativas entre ambas formulaciones.

Tabla 48. Parámetros farmacodinámicos individuales calculados mediante técnicas no compartimentales de sensaciones percibidas de formulación COM.

Parámetros farmacodinámicos (COM)																		
	Alfileres, agujas			Cosquilleo, picazón			Estremecimiento, escalofríos			Hipersensibilidad táctil, irritación			Entumecimiento, insensibilidad			Dolor		
Sujeto	TE _{MAX}	EM _{MAX}	AUECall	TE _{max}	Em _{max}	AUECall	TE _{max}	Em _{max}	AUECall	TE _{max}	Em _{max}	AUECall	TE _{max}	Em _{max}	AUECall	TE _{max}	Em _{max}	AUECall
1	0	0	0	30	3	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	90	3	360	60	3	390	180	1	30	180	1	30	180	1	30	180	1	30
4	0	0	0	60	2	90	60	1	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	30	0	0	30	1	60	60	1	30	30	0	0	30	0	0	30	0	0
7	0	0	0	30	1	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	60	3	210	60	3	240	0	0	0	60	2	60	0	0	0	0	0	0
9	90	3	210	90	3	315	90	2	180	0	0	0	0	0	0	60	1	60
10	0	0	0	30	1	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	30	1	90	30	1	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	30	1	60	30	3	240	0	0	0	30	1	30	0	0	0	0	0	0

Tabla 49. Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de sensaciones percibidas en la formulación de polvo (POL) y de comprimidos (COM). Datos se presentan como media \pm DS. ns: no significativo, * $p < 0.05$

	Alfileres, agujas			Cosquilleo, picazón			Estremecimiento, escalofríos		
Parámetros (unidades)	Polvo	Comprimidos	p	Polvo	Comprimidos	p	Polvo	Comprimidos	p
TE _{MAX} (min)	40,91 \pm 30,81	30,00 \pm 35,50	Ns	43,64 \pm 15,67	40,91 \pm 24,27	Ns	40,91 \pm 43,00	35,46 \pm 58,20	Ns
E _{MAX} (AU)	1,82 \pm 1,40	1,00 \pm 1,34	Ns	2,91 \pm 0,54	1,91 \pm 1,14	*	1,09 \pm 1,14	0,46 \pm 0,69	Ns
AUECall (min*UA)	144,55 \pm 134,04	84,55 \pm 122,83	Ns	226,36 \pm 85,24	159,55 \pm 122,65	Ns	57,27 \pm 62,14	24,55 \pm 53,36	*
	Hipersensibilidad táctil, irritación			Entumecimiento, insensibilidad			Dolor		
Parámetros (unidades)	Polvo	Comprimidos	p	Polvo	Comprimidos	p	Polvo	Comprimidos	p
TE _{MAX} (min)	8,18 \pm 14,01	27,27 \pm 54,42	Ns	5,46 \pm 18,09	19,09 \pm 54,12	Ns	19,09 \pm 33,60	24,55 \pm 55,02	Ns
E _{MAX} (AU)	0,55 \pm 1,04	0,36 \pm 0,67	Ns	0,09 \pm 0,30	0,09 \pm 0,30	Ns	0,46 \pm 0,82	0,18 \pm 0,41	Ns
AUECall (min*UA)	32,73 \pm 66,35	10,91 \pm 20,23	Ns	5,46 \pm 18,09	2,73 \pm 9,05	Ns	19,09 \pm 33,60	8,18 \pm 19,40	Ns

5.5.3 Topografía de los síntomas

En las tablas 50 y 51 se encuentran los datos de la pregunta del test de parestesia ISS, en que se contabilizaron el número de zonas afectadas después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL y COM de liberación sostenida. Datos individuales por sujetos en función del producto consumido POL o COM, donde se da parestesia hasta un tiempo máximo de 240 min.

En la figura 66 se muestra la descripción del número de zonas del cuerpo afectadas tras de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL o COM, utilizando el test ISS de partes del cuerpo. Comparativa por sujetos, en una escala de valor entre 0-17, que equivaldría al 100 % del cuerpo, en un tiempo de 0-8 horas.

Tabla 50. Número de zonas afectadas después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL de liberación sostenida, utilizando el test de partes del cuerpo ANEXO 5. Escala 0-17 (0-8 h).

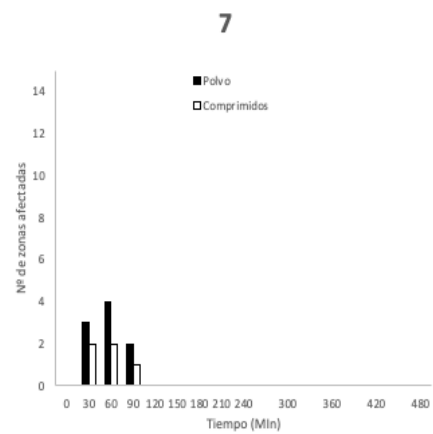
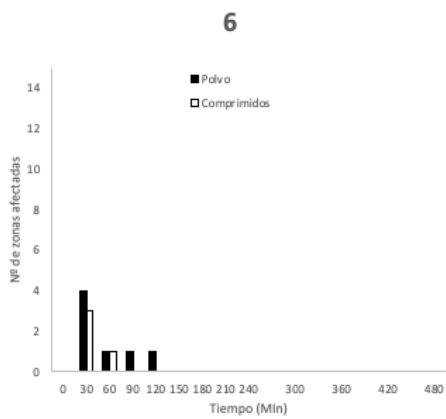
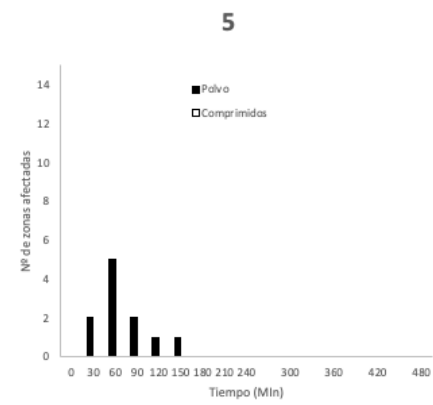
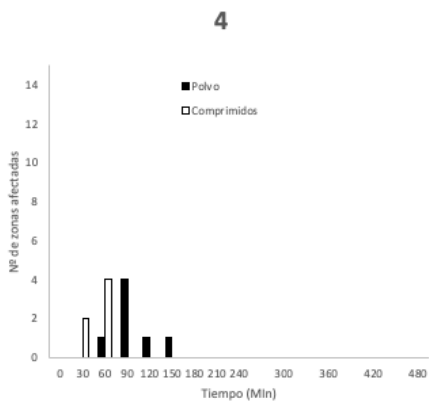
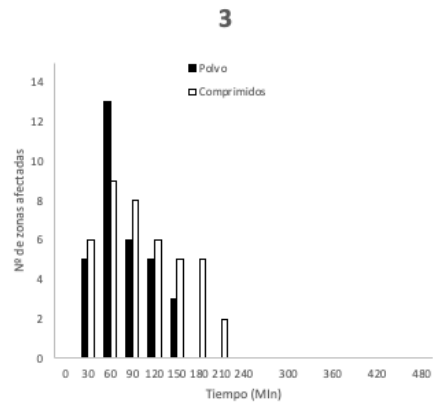
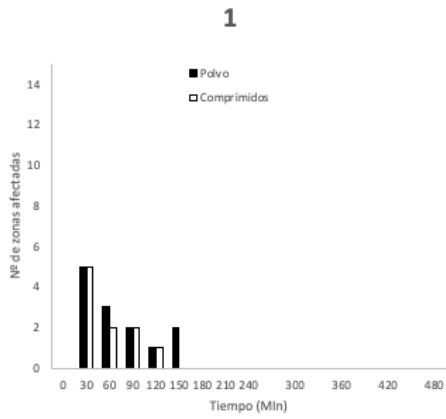
Número De zonas afectadas (polvo)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	5	-	5	0	2	4	3	5	4	6	4	9
60	3	-	13	1	5	1	4	7	9	5	4	11
90	2	-	6	4	2	1	2	5	10	3	5	2
120	1	-	5	1	1	1	0	3	9	2	2	0
150	2	-	3	1	1	0	0	0	6	2	1	1
180	0	-	0	0	0	0	0	0	6	0	1	0
210	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
360	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
420	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*El sujeto no acudió a la segunda visita

Tabla 51. Número de zonas afectadas después de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato COM de liberación sostenida, utilizando el test de partes del cuerpo ANEXO 5. Escala 0-17 (0-8 h).

Número De zonas afectadas (comprimidos)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	5	-	6	2	0	3	2	4	0	0	2	8
60	2	-	9	4	0	1	2	5	1	3	1	9
90	2	-	8	0	0	0	1	2	8	2	1	4
120	1	-	6	0	0	0	0	2	5	2	0	2
150	0	-	5	0	0	0	0	2	7	0	0	0
180	0	-	5	0	0	0	0	0	6	0	0	0
210	0	-	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
240	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
360	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
420	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*El sujeto no acudió a la segunda visita



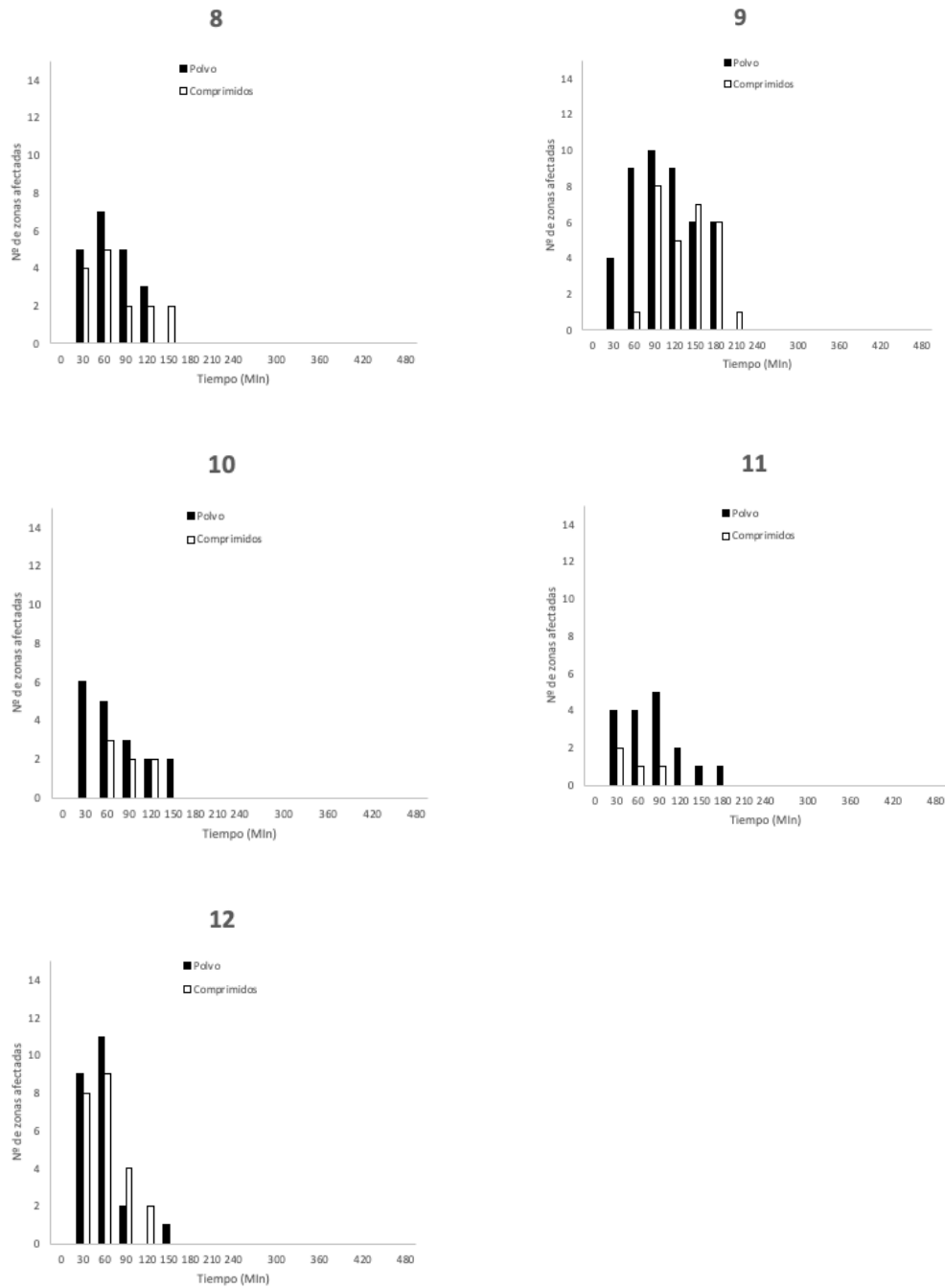


Figura 66. Descripción del número de zonas del cuerpo afectadas tras de la ingestión de 8 g de β -ALA en formato POL o COM, utilizando el test ISS de partes del cuerpo. Comparativa por sujetos, escala 0-17 (0-8 h).

VI - DISCUSIÓN

VI – DISCUSIÓN

Se desarrolló un nuevo producto piloto de β -ALA con el objetivo de modular su absorción y proporcionar una mayor biodisponibilidad. Teniendo en cuenta que la única limitación que tiene la β -ALA es el efecto de la parestesia, se optó directamente por una fórmula de liberación sostenida para así evitar este efecto indeseado debido a un pico de concentración por su rápida absorción. Además de la liberación sostenida, se tuvo en cuenta que, ya que se trata de un producto directamente enfocado a mejorar el rendimiento de deportistas y cuyas cantidades a tomar son bastante elevadas, el formato deseable fue en polvo, “blend” recubierto. Esta formulación preliminar permitiría tanto personalizar la dosis como alcanzar una alta dosis sin la incómoda toma de demasiados comprimidos por dosis.

Resulta importante destacar la dificultad existente para conseguir dicha liberación sostenida en este novedoso formato en polvo.

6.1 MECANISMO DE LIBERACIÓN SOSTENIDA

6.1.1 Selección de β -ALA pura y recubrimiento

Para realizar el recubrimiento se procedió a la búsqueda de β -ALA pura, ingrediente principal de nuestra formulación, de forma que tuviéramos la base de trabajo idónea para proceder al recubrimiento.

Durante el desarrollo del producto, se observó que el tamaño de partida era fundamental para desarrollar el estudio de biodisponibilidad. Se analizaron varios tamaños de β -ALA hasta obtener uno que cumpliera con especificaciones necesarias para el producto diseñado incluidas en el ANEXO 3, así como idónea para la realización del proceso de recubrimiento y cumplimiento del perfil de liberación y con propiedades organolépticas aceptables. Con las distintas β -ALA puras, se ejecutaron todas las tareas necesarias para obtener el recubrimiento,

lograr el desarrollo del mecanismo adecuado y conseguir así la liberación sostenida de la β -ALA conforme al perfil de liberación diseñado. Este fue, por lo tanto, el punto crítico del desarrollo de preformulación del producto. Se desarrollaron las pruebas de recubrimiento con distintos tamaños de β -ALA pura de base (Figuras 48, 49 y 50): 40 mesh (400 μm), 100 mesh (149 μm) y 200 mesh (74 μm), siguiendo el mismo procedimiento con las mismas condiciones para todas ellas. Sus fichas técnicas se encuentran en el ANEXO 8.

En el primer paso de mezclado y disolución fue importante mantener la agitación de la suspensión durante todo el proceso de recubrimiento, para obtener así un recubrimiento homogéneo en todas las partículas del polvo. Durante el desarrollo del recubrimiento en la máquina y tras varias pruebas (Figuras 17, 18 y 19), se obtuvieron distintas conclusiones en cuanto a las condiciones para el proceso: Al disminuir las revoluciones por minuto de la velocidad de esprayado, las gotas salían más gruesas, asimismo al disminuir la presión del aire, aumentó el tamaño de gota de esprayado. Además, hay que tener en cuenta la valoración de pérdidas en el proceso por adhesión al tambor y pérdidas por aire ya que se trata de un polvo fino que escapa del tambor. Las condiciones óptimas para la obtención del recubrimiento deseado fueron ajustándose a lo largo del proceso en función del tiempo.

6.1.2 Liberación in vitro

Una vez obtenida la formulación piloto de β -ALA recubierta (Figura 51), se estudió el mecanismo de liberación sostenida a diferentes tiempos, siguiendo el método oficial de la Farmacopea Europea 8^a Edición, 2.9.3. Test de disolución para formas sólidas de dosificación, incluido en el ANEXO 4. Para el cálculo y seguimiento del perfil de liberación sometimos cada una de las muestras obtenidas en el ensayo de recubrimiento al test de disolución, en tiempos de 1, 2, 4 y 6 horas, procediendo al análisis del principio activo (β -ALA) presente en la matriz para cada una de estas formulaciones.

Con el tamaño de 40 mesh, 400 μm , se obtuvo liberación hasta el tiempo objetivo de 6 h pero los porcentajes de liberación durante el transcurso del tiempo

no fueron constantes, indicativo de que no se disponía de una cinética de liberación de orden cero (Figura 52). Además, el tamaño se observó que era demasiado grande y dificultoso para su ingesta en suspensión con agua, de la dosis deseada de 8 g para este estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos con β -ALA pura de 100 mesh (149 μm) y de 200 mesh (74 μm) de tamaño mostraron liberación hasta el tiempo objetivo de 6 horas con porcentajes de liberación constantes, consiguiendo la cinética deseada. Sin embargo, a nivel sensorial se comprobó que la granulometría obtenida en la formulación de 100 mesh resultó inadecuada para la ingesta planificada, aunque con mejores resultados organolépticos (Figura 53). En cambio, la granulometría obtenida con la β -ALA pura 200 mesh resultó adecuada y por tanto, se eligió un este tamaño de partícula de partida para la elaboración de la formulación de la β -ALA. Esta formulación resultó idónea para su presentación en polvo y posterior recomendación de uso mediante reconstitución en un vaso de agua e ingesta directa.

Esta formulación mostró liberación alcanzada hasta el tiempo objetivo de 6 horas con un porcentaje de liberación constante (Figura 54) y puede ser descrita según la siguiente función:

$$Y = (16.742 \pm 1.3679) X + (0.4373 \pm 5.1639)$$

($r^2 = 0,9967$)

En el mercado ya existen formulaciones formulado de β -ALA de liberación sostenida, como por ejemplo la utilizada en nuestro estudio como producto COM de referencia (Figura 21), que anteriormente ya se comparó con el formato puro en solución, y se vio que dicha liberación controlada ralentiza la tasa de aparición y reduce el valor del pico de β -ALA en la sangre, evitando la inducción de parestesia (160). En consecuencia, los estudios utilizan ahora formatos de liberación sostenida de β -ALA, que permiten la suplementación diaria y el cumplimiento de normas más prácticas al reducir el número de dosis diarias para una prescripción determinada (48). Por lo tanto, siguiendo esta línea, iniciamos la selección con tamaños de partícula que fueron desde los 40 mesh hasta la seleccionada de 200 mesh que utilizamos para liberación sostenida.

6.2 FARMACOCINÉTICA

Una vez seleccionada la formulación, se procedió a examinar si la modificación de la formulación mejoraría las propiedades farmacocinéticas de la β -ALA, especialmente la biodisponibilidad mediante un estudio clínico en voluntarios sanos. El recubrimiento podría no ser idóneo para la utilización en humanos porque podría no permitir la liberación del compuesto activo (β -ALA), lo que supondría que nunca podría absorberse y alcanzar la biofase para ejercer su efecto ergogénico. Al tratarse de un desarrollo tecnológico innovador, no existe otra forma de poder testear estas variables en la formulación piloto (POL), o de extrapolar resultados de fabricaciones similares en otras industrias, pues no existen formulaciones en polvo de β -ALA.

En nuestro estudio inicialmente se incluyeron doce voluntarios sanos (seis hombres y seis mujeres) de nacionalidad europea o sudamericana, todos ellos de raza blanca. De las dos visitas previstas para el estudio en el que se cruzaban los productos, un sujeto masculino no acudió a la segunda visita, por lo que no pudimos tenerlo en cuenta para el estudio al no poder realizar la comparativa con este sujeto, por lo tanto, el estudio se llevó a cabo finalmente con 11 sujetos ya que con el resto de participantes no hubo incidencias significativas. La muestra poblacional era bastante homogénea en cuanto a características demográficas individuales y compensando ambos sexos para el estudio (Tabla 9). Tampoco hubo ninguna incidencia destacable durante la ejecución del estudio y la toma de muestras.

6.2.1 Análisis farmacocinético de β -Alanina. Aspectos generales.

El principal hallazgo de este estudio es el aumento de la biodisponibilidad de β -ALA proporcionado por la formulación desarrollada en formato POL de liberación sostenida *versus* los COM. El análisis no compartimental mostró un incremento de 2,1 veces $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ con la nueva formulación así como un C_{MAX} 1,6 veces mayor (Figura 55), ambos estadísticamente significativos (Figura 55 y Tabla 15). Asimismo, también se encontraron diferencias significativas en el V/F y CI/F entre ambas formulaciones siendo menor en la formulación POL que COM,

probablemente debido al aumento de F . Los demás parámetros relacionados con la biodisponibilidad, K_a y T_{MAX} , tampoco mostraron diferencias entre las formulaciones, aunque la velocidad de absorción fue 1.5 veces más rápida en la formulación COM, aunque no determinó una mayor exposición plasmática de β -ALA. Es importante destacar que el resto de parámetros relacionados con la disposición de β -ALA no presentan diferencias significativas. Así, la constante de eliminación k_{el} y el MRT fueron similares ($p=0,2850$ y 0.1373 respectivamente) sugiriendo que las diferencias de formulación no afectan al proceso de eliminación (Tabla 15).

Estos resultados son coincidentes con la bibliografía publicada, coincidiendo el pico de las concentraciones máximas de β -ALA en el plasma entre 30 y 40 minutos después de su ingesta (Figura 55), confirmándose así su rápida absorción en plasma (32). En cuanto a su semivida biológica, es de 25 minutos, aunque se ha visto que permanece con concentraciones eficaces en la circulación durante aproximadamente 3 horas desde la ingesta (21). Sin embargo, con las formulaciones en POL y COM, ambas con liberación modificada, se obtuvo un $t_{1/2}$ mayor (63,5 y 68,9 min respectivamente en POL y COM) lo que podría indicar un efecto limitativo de la velocidad absorción sobre la de eliminación (Tabla 15).

Cuando se analizaron los datos según los modelos compartimentales, se incluyeron varias opciones: mono o bicompartimental, ausencia o presencia de tiempo de latencia y se exploraron diversas opciones de ponderación. El análisis de los resultados visuales y de los coeficientes de variación de los parámetros calculados indicó que la mejor ponderación era el inverso de la concentración observada ($1/C$) (Figura 58). Así, el modelo monocompartimental obtuvo mejores valores de AIC frente al bicompartimental y la adición del tiempo de latencia a ambos modelos resultó en mejores valores de AIC indicando en ambos casos la presencia de un tiempo de latencia en la absorción. Sin embargo, los valores de AIC fueron muy similares entre mono y bicompartimental (Tabla 16) por lo que siguiendo el principio de parsimonia y el mayor coeficiente de variación de los parámetros tras el ajustado bicompartimental, se eligió el modelo monocompartimental como el mejor para describir los datos.

$$C_p = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V(k_a - k_e)} (e^{-k_e(t-tlag)} - e^{-k_a(t-tlag)})$$

El análisis compartimental mostró la presencia del tiempo de latencia, que fue ligeramente mayor en POL pero sin ser significativo. Además, este análisis corroboró los resultados obtenidos previamente con el análisis no compartimental mostrando un incremento significativo de F de 2.2 veces y 1.6 veces el C_{MAX} (Tabla 17), una disminución en paralelo de Cl/F y V/F siendo 0,46 y 0,45 veces más pequeños, de acuerdo con el aumento de 2,2 en biodisponibilidad y K_a fue 1.49 veces más rápida con la formulación COM mostrando la disminución de la velocidad de liberación obtenida con la formulación POL frente a COM. Similarmente, la K_{el} y el $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ no mostraron diferencias avalando la idea propuesta anteriormente de que la formulación POL no afecta a la eliminación de β -ALA en referencia a COM.

6.2.2 Biodisponibilidad de β -Alanina.

Una vez comparada las farmacocinéticas de β -ALA en cada una de las dos formulaciones, cabe preguntarse sobre las causas que provocan un 2.2 aumento de biodisponibilidad relativa respecto a la formulación de referencia, COM.

El análisis de los parámetros farmacocinéticos de disposición permite proponer que no es probable que el aumento de F sea consecuencia de una disminución del aclaramiento tras la administración de la formulación POL. En primer lugar, tanto la k_{el} y el MRT son similares en ambas formulaciones, indicando que no hay efecto sobre el proceso de disposición (Tabla 15). En segundo lugar, Cl/F y V/F disminuyen igualmente en la misma proporción, lo que sugeriría que F es el parámetro modificado y no V o Cl, los cuales permanecerían sin cambios, independientemente de la formulación.

Las formulaciones de β -ALA todavía alcanzan concentraciones plasmáticas efectivas que están por encima del transportador de β -ALA K_m de 40 μM , demostrando la síntesis de CARN muscular altamente eficaz con un suplemento de liberación sostenida (34). Por tanto, la modificación de la biodisponibilidad

debemos buscarla en una modificación del proceso de absorción de la β -ALA. Los aminoácidos no pueden difundirse pasivamente a través de las membranas, requieren transportadores de aminoácidos (AAT), principalmente transportadores ligados a solutos o transportadores SLC (162). De hecho, estos AAT pueden modular su captación a través de la membrana intestinal, su reabsorción renal y asegurar su captación intracelular incluso contra un gradiente de concentración de 1000 veces (162). Por otro lado, experimentos llevados a cabo *in situ* en el intestino delgado de rata han mostrado captación dependiente de pH y Na^+ (163) y cinética saturable y estudios en vesículas de membrana de borde en cepillo (conejo) han sugerido múltiples Na^+ y al menos un Cl^- asociado con la captación de β -ALA (163). Además, la caracterización del transporte de aminoácidos en células caco-2 humanas sugirió también la presencia de un transportador de aminoácidos dependiente solo del pH en la membrana apical de los enterocitos en el íleon (164) y las técnicas posteriores de clonación permitieron la identificación molecular de varios AAT, incluido el transportador SLC6A14 (165). Vale la pena considerar que desde el punto de vista funcional de la absorción de β -ALA presente en la dieta, la cinética de absorción saturable mediada por SLC6A (165) se beneficia de su localización en el íleon para prevenir aumentos bruscos de β -ALA ingerida en la dieta que podrían causar parestesia.

En este contexto, la cinética de absorción saturable y la localización distal pueden favorecer la absorción más eficiente de una formulación de liberación sostenida frente a velocidades de liberación más rápidas como los COM (que presentan mayor K_a) que podrían resultar en una mayor pérdida de dosis debido a una posible cinética saturable de transporte.

Por otro lado, la modificación de la biodisponibilidad también podría deberse a una disminución del efecto de primer paso hepático. Así, se ha identificado un transportador hepático para aminoácidos neutros y catiónicos (ATA3) y es inhibido por varios aminoácidos, incluyendo la β -ALA y la L-His con una potencia 2 veces mayor que la β -ALA (166). Además, la β -ALA presenta una potencia de inhibición débil en la captación celular mediada por SNAT3 (167). Es posible, por tanto, que después de la coadministración de L-His y β -ALA, la L-His pueda ser captada preferentemente, lo que desempeñaría un papel esencial para

disminuir la captación hepática de primer paso de β -ALA. En consecuencia, una mayor cantidad de β -ALA llegaría a la circulación sistémica aumentando su biodisponibilidad relativa frente a la formulación en comprimidos que carece de L-His. Aunque el papel de las interacciones fármaco-fármaco no se comprende completamente, la coadministración de un cofármaco puede ser una estrategia para aumentar la biodisponibilidad del fármaco de interés, así como su captación tisular (168–172) con beneficios terapéuticos (173,174).

Está claro que la confirmación de esta hipótesis conllevaría una serie de estudios clínicos e *in vitro* para ver cuál sería el papel de la L-His comparando COM con su coadministración con COM (L-His y COM). Podemos concluir que estudios *in vitro* usando hepatocitos y membrana absorbente intestinal podrían esclarecer las captaciones relativas entre β -ALA y L-His.

Por otro lado, el aumento absoluto en la CARN, producto de la síntesis a partir de la β -ALA y L-His, a nivel muscular solo depende de la β -ALA total consumida (34) y la fuerte y establecida asociación observada entre el aumento de la CARN muscular y el rendimiento de ejercicio de alta intensidad (86,104,175) muestra la relevancia del aumento de la biodisponibilidad de β -ALA. Los efectos ergogénicos asociados con la suplementación con β -ALA son el resultado de la β -ALA en la combinación con la His dentro del músculo esquelético para formar CARN, como ya hemos visto. El primer estudio humano para aumentar con éxito la CARN muscular mediante la administración de suplementos de β -ALA se produjo en 2006 (21). Desde 2006, diferentes estudios han demostrado claramente que la suplementación prolongada de β -ALA en humanos da como resultado un aumento del 40-65% en el contenido de CARN muscular (21,33,34,141,151–154). Además, tan poco como 1.6 g de β -ALA al día pueden aumentar significativamente las reservas de CARN muscular en las dos semanas posteriores a la administración del suplemento y pueden provocar aumentos pequeños, pero continuos, en la CARN muscular ya aumentada (34). Por tanto, el aumento de la dosis se plantea como un método de mejora del rendimiento muscular, pero a su vez, también se requiere un mayor estudio de su posología y protocolos de administración para evitar parestesia y maximizar la formación de CARN. En nuestro estudio, la dosis de ingesta ha sido la mayor dosis reportada hasta el

momento siendo de 8 gramos en una única administración, en comparativa con un estudio reciente que comparó dos protocolos de dosificación (6 g frente a 12 g día en tres dosis diarias, lo que equivaldría a 2 y 4 gramos respectivamente por dosis de β -ALA formulación de liberación sostenida (56). Estos autores concluyeron que tanto tomando 12g como tomando 6g al día, aumentaron la CARN muscular en comparación con el placebo. Los resultados de esta investigación indican que un protocolo de suplementación de β -ALA de 12 g al día, utilizando una formulación de liberación sostenida, puede acelerar el aumento de contenido de CARN en el músculo esquelético mientras se atenúa la parestesia.

De hecho, en un análisis reciente (4) sobre β -ALA y el rendimiento del ejercicio, Saunders et al. llegaron a la conclusión de que β -ALA es beneficiosa en los tipos de ejercicio que duran entre 30 segundos y 10 minutos. mientras que el efecto fue menos pronunciado ($P= 0.046$) en ejercicios de mayor duración (>10 min) y no significativo para el ejercicio de corta duración menor a 30 segundos. Otro estudio (176) corroboró los efectos directos de la ingestión de β -ALA en el rendimiento de resistencia , confirmando mejoras significativas ($P <0.05$) en el pico de VO_2 (cantidad máxima de oxígeno que el organismo puede absorber, transportar y consumir en un tiempo determinado), tiempo hasta la fatiga y trabajo total realizado durante el rendimiento de resistencia en hombres activos que suplementan con β -ALA (6.0 g/día durante 21 días seguidos de 3.0 g día otros 21 días) y la realización de entrenamiento de intervalo de alta intensidad. Podríamos confirmar comparando la dosis de este estudio y la nuestra, que el producto POL tendría beneficios en ejercicios de resistencia al mejorar la disponibilidad de CARN.

6.2.3 Análisis farmacocinético de L-Histidina

En el caso de la absorción de la L-His, de las gráficas solo se puede calcular el AUC, C_{MAX} y T_{MAX} con bastante imprecisión pues las concentraciones plasmáticas son menores y por otro lado el diseño experimental (centrado en la β -ALA) carece de puntos de muestra suficientes. De hecho, el principal objetivo de su análisis era confirmar su absorción y poder avalar la explicación del efecto de la L-His en la captación hepática y el subsecuente impacto en la biodisponibilidad de β -ALA. No tiene un valor comparativo ya que los comprimidos no llevan este aminoácido.

En los resultados (Figura 59) se aprecia un ligero aumento de los niveles basales en la mayoría de los sujetos con el consumo del producto en POL. Sin embargo, también hay casos en los que en algunos participantes parece que no hay aumento. De hecho, se consideró que el nivel de L-His pudiera relacionarse con el nivel de β -ALA bien mostrando una menor absorción de ambos aminoácidos, o bien que una mayor cantidad de L-His absorbida resultara en una mayor AUC de β -ALA. Este análisis no mostró ninguna relación, lo cual podría deberse a que la cantidad de L-His es demasiado baja junto con una gran variabilidad interindividual (177).

Sitton et al (60) administraron 6,4 g (100 mg/kg) de L-His a trece adultos y calcularon una concentración plasmática máxima 8,8 veces por encima del valor basal, un tiempo hasta la concentración plasmática máxima de $0,72 \pm 0,04$ horas y una semivida biológica de $1,69 \pm 0,19$ horas. También se ha demostrado que dosis orales tan bajas como 3.7 g pueden producir aumentos en L-His en plasma 1.35 veces por encima del valor inicial al menos 4 horas después de la dosificación. (62,63,85). Con estos datos podríamos confirmar que ese ligero aumento de la L-His se debe a la dosis ingerida de 300 mg, sin ser ésta una cantidad notable para observar grandes cambios en las gráficas concentración-tiempo ya que se trata de una cantidad ingerida muy baja (Figura 60).

6.2.4 Concentraciones plasmáticas del resto de aminoácidos

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en el resto de aminoácidos con la toma de los productos en formato POL y COM en cuanto a su curva concentración-tiempo, como se puede apreciar en tablas 23-41 y Figura 61 indicativo de que la administración de una dosis alta de β -ALA no causa interferencia en la absorción de los demás aminoácidos.

6.3 ANÁLISIS FARMACODINÁMICO.

Como la parestesia es el efecto adverso limitante en la administración de β -ALA, se obtuvo información de su aparición a lo largo del estudio. En conjunto, las primeras sensaciones de parestesia se tuvieron a tiempos semejantes, 24.1 min y 24.8 min para las formulaciones POL y COM respectivamente. En unos primeros estudios, Harris et al. En el 2006, (21) observaron que la administración aguda de una dosis de 3.2 g de β -ALA produjo sensaciones de parestesia transitorias en la piel con síntomas que comenzaron a partir de los 20 minutos y duraron hasta una hora. Sin embargo, se observó una gran variabilidad ya que su percepción e intensidad puede ser una sensación con cierto grado de subjetividad: un sujeto que las percibió alrededor de los 5 min y otro no percibió ningún efecto. Excepto estos niveles esperados de parestesia, no se registraron efectos secundarios significativos adicionales en ninguno de los participantes.

6.3.1 Perfil farmacodinámico e histéresis.

El curso temporal de la aparición de parestesia pudo medirse satisfactoriamente con el empleo de la escala VAS y de la escala ISS (Figura 63) aunque su determinación no fue totalmente equivalente. Así, mientras la ISS encontró diferencias significativas en los tres parámetros evaluados (TE_{MAX} , E_{MAX} y AUEC) la VAS únicamente las encontró en E_{MAX} (Tabla 43).

El primer aspecto, por tanto, que debe destacarse es que tanto E_{MAX} como AUEC fueron más altos con la formulación POL de liberación sostenida que con COM. Sin embargo, este aumento no se produjo de manera equivalente en cada

escala (Tabla 43): E_{MAX} fue 1.7 veces mayor en ambas escalas y AUEC aumentó 1.8 y 1.9 veces usando el VAS e ISS respectivamente, pero solo alcanzaron diferencias significativas con la escala ISS. Aunque la biodisponibilidad aumentó 2,2 veces, no se obtuvo un aumento del efecto de parestesia equivalente con la formulación de prueba, sugiriendo que la captación tisular para producir la parestesia no está directamente relacionada con las concentraciones plasmáticas. Por otra parte, también debe considerarse que las diferencias entre escalas pueden manifestar diferencias intrínsecas en la percepción subjetiva de la intensidad: la VAS es continua mientras que la ISS es categórica, lo que ejerce cierta influencia en el sujeto para decidir si se ha alcanzado un umbral para seleccionar un nivel específico en la escala (178) (Figuras 23 y 24).

Corroborando lo anterior, la intensidad de parestesia, E_{MAX} , se observó antes que el T_{MAX} plasmático de β -ALA tanto en la formulación de referencia como en la de prueba usando ambas escalas VAS ($p = 0.011 = 0.006$ para POL y COM respectivamente) y la ISS ($p < 0,001$ para ambos productos). De esta forma, que T_{EMAX} sea anterior al T_{MAX} muestra que el E_{MAX} se logra antes que el C_{MAX} plasmático, lo que implicaría posterior saturación de receptores o tolerancia, que sería coherente con lo observado previamente de la falta de proporcionalidad respecto al aumento de biodisponibilidad. Ambos hallazgos pueden proporcionar información mecanística sobre la aparición e intensidad de la parestesia abriendo dos aspectos mecanísticos: Por un lado, la posibilidad de establecer una correlación entre parámetros farmacocinéticos y parámetros farmacodinámicos y por tanto la capacidad de predicción de la parestesia; y por otra parte el análisis de la relación temporal entre concentración e intensidad (histéresis).

Se investigó si los parámetros farmacocinéticos C_{MAX} y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ podrían predecir la intensidad de parestesia determinada mediante E_{MAX} y AUEC como parámetros farmacodinámicos. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación con ninguno de estos dos parámetros farmacocinéticos en ninguna formulación. Por tanto, no se identificó capacidad de predicción, de acuerdo con la cinética saturable de la captación de β -ALA en los tejidos mediada por los AAT (162).

En segundo lugar, la correlación entre la concentración plasmática y los valores de intensidad de parestesia tanto individuales como los valores promedio de concentración e intensidad de parestesia dio lugar a la aparición de histéresis. Estos gráficos de histéresis pueden presentar un bucle en sentido contrario o a favor de las agujas del reloj. Un bucle en sentido contrario a las agujas del reloj muestra un efecto creciente del efecto incluso con concentraciones plasmáticas de fármaco decrecientes puede indicar una distribución no instantánea del fármaco con un retraso de la respuesta hasta que el fármaco alcanza la biofase, la formación de metabolitos activos o la sensibilización de los receptores. Sin embargo, un bucle en el sentido de las agujas del reloj indica que el efecto más alto ocurre al principio y luego disminuye debido a la tolerancia, taquifilaxia o metabolitos activos que tengan una acción antagonistas o desfase en el equilibrio entre la biofase y las concentraciones en sangre periférica venosa (162).

Los resultados muestran un bucle de histéresis en el sentido de las agujas del reloj (Figura 64) coherente en ambas escalas y para las dos formulaciones que hasta ahora no se ha descrito en la literatura. La presencia de este bucle en el sentido de las agujas del reloj puede explicarse desde un punto de vista farmacocinético y farmacodinámico. Así, desde un perspectiva farmacocinética, un retraso en la concentración plasmática de β -ALA medida en la sangre venosa (antebrazo) frente a la biofase a su equilibrio en la biofase estaría respaldada por el T_{EMAX} que tiene lugar antes que el T_{MAX} hallado en ambas formulaciones (179). Desde un análisis mecanístico y farmacodinámico, un cambio en la sensibilidad de los receptores puede dar lugar a tolerancia (180) o taquifilaxia, si ésta se produce de forma casi inmediata como en nuestro estudio (figura 64). El perfil muestra que la E_{MAX} se alcanza en la primera concentración medida, se estabiliza hasta el C_{MAX} plasmático y vuelve al punto de partida con la formulación del comprimido. Sin embargo, con la formulación de liberación sostenida (POL), se tarda más en alcanzar el E_{MAX} , seguido de la disminución sin la pseudo-meseta que aparece en el caso de los COM (Figura 64). De hecho, se observa que con las mismas concentraciones plasmáticas, el efecto es mayor con la mezcla de polvo de liberación sostenida (POL), lo que sugiere que la saturación de los receptores es poco probable. Más bien podría evidenciar que la L-His puede facilitar su captación en un posible compartimento de efecto (181). Esto también puede

anticipar el potencial de la L-His para facilitar la captación de β -ALA por los tejidos diana.

6.3.2 Descripción cualitativa de la parestesia

Hasta ahora, pocos estudios se han desarrollado con dosis superiores a 6,4 g al día, generalmente debido al mayor riesgo de aparición de síntomas de parestesia. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizaron antes de la disponibilidad de una formulación de liberación sostenida de β -ALA, que permitiera dosis mayores sin el riesgo de parestesia (161). En la tabla 44, se comprobó que la percepción de la primera sensación obtenidas de parestesia no fue significativa al comparar POL y COM (24.8 min y 24.1 min respectivamente), habiendo dado una suplementación mucho mayor con una dosis de 8 gramos de liberación sostenida.

En una primera evaluación de la descripción de las sensaciones mediante el apartado QLSI del test de parestesia, se observó que la sensación de "cosquilleo" y picazón" fue la predominante. La tasa de incidencia se muestra en la Figura 65. Y dentro de esta sensación, hubo 29% menos de sensaciones de "cosquilleo" y picazón" en comprimidos que en polvo durante el mismo periodo de tiempo (8 horas). Entre las sensaciones descritas como "otros" se dieron las nauseas y en algún caso aislado debilidad, calor o mareo, sin sen estas demasiado marcadas, por lo que podrían clasificarse como datos no significativos (Tablas 45 y 46).

Analizando los parámetros farmacocinéticos, no hubo diferencias significativas entre POL y COM excepto en E_{MAX} con la sensación de cosquilleo y picazón, y AUEC con la sensación de estremecimiento y escalofríos (Tabla 49), en la que polvo fue un poco superior a comprimido. Este resultado sigue siendo lógico debido a que su biodisponibilidad era más del doble, sin embargo, no confiere una mayor percepción cualitativa generalizada de la parestesia.

6.3.3 Topografía de los síntomas

No hay muchos estudios en los que se centren en las zonas del cuerpo afectadas por parestesia, pero si sabemos que las dosis orales de β -ALA superiores a 800 mg suelen producir estos síntomas sensoriales desagradables (32).

En relación a esta sensibilidad del cuerpo en función de los tiempos de ingesta, en nuestro estudio la máxima sensibilidad en el caso del polvo, se dio entre 30-90 minutos desde el momento de la ingesta inicial, y en el caso de los comprimidos entre los tiempos 30-60 minutos. Mientras que a partir de $t=210$ min no se sintió parestesia en ninguno de los casos del polvo, con los comprimidos dejó de haber sensibilidad a $t=240$ minutos en todos los casos (Tabla 50 y 51). Con estos resultados confirmamos los obtenidos en estudios anteriores, en los que las sensaciones transitorias de hormigueo tenían una duración de entre 60 y 90 minutos, relacionadas con mecanismos cinéticos de la β -ALA en plasma (34).

Según un estudio de Décombaz (48), en el que se ingirieron 1,6 g de β -ALA pura con dos dosis de 800 mg cada una, se contabilizaron el número de áreas involucradas en cada subpuntuación del sitio del cuerpo, y el área corporal principal asociada con los síntomas de parestesia de la suplementación con β -ALA pura fue el cuerpo medio, es decir, tronco y brazos. Las áreas del cuerpo asociadas con más síntomas de parestesia por la suplementación con B-ALA en nuestro estudio, tanto con formato POL como COM, fueron las extremidades superiores e inferiores, con máxima sensibilidad en manos y piernas por la parte delantera, siendo las de menor sensibilidad, la cabeza y los hombros. Basándonos en el estudio visto anteriormente (48) sabemos que ya hubo una correlación positiva entre el número de áreas de la parte media del cuerpo que se vieron afectadas y el pico de plasma β -ALA (C_{MAX}), lo que sugiere que cuanto mayor sea la C_{MAX} , más probable es que varias áreas del cuerpo puedan verse afectadas por los síntomas, como ocurre en nuestro caso, que además de las extremidades

superiores, también podría explicarse la parestesia en las extremidades inferiores, debido a la alta dosis ingerida.

Estudiando cada sujeto por separado, se concluye que un 72% de los sujetos tuvieron más zonas afectadas en la toma del producto en polvo. En la figura 66 se muestra la incidencia de estas percepciones en cada tiempo así como el número de zonas afectadas para cada formulación.

VII - CONCLUSIONES

VII -CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo una amplia búsqueda de β -ALA pura de base, obteniéndose una materia prima que cumpliera con especificaciones de tamaño y homogeneidad.
- Obtuvimos un perfil de liberación hasta el tiempo objetivo y los % de liberación durante el transcurso del tiempo son constantes consiguiendo el propósito perseguido. Los ingredientes activos soportaban el proceso de recubrimiento (no fueron desnaturalizados o modificados). Por lo tanto, fueron perfectamente válidos y funcionales para nuestra finalidad del recubrimiento.
- El estudio farmacocinético mostró la idoneidad de una nueva formulación de mezcla de polvo de liberación sostenida para administrar β -ALA sistémicamente por vía oral con un aumento de biodisponibilidad de 2,1 veces en comparación con una formulación de comprimidos de liberación lenta. Además, la dosis oral de 8 g de β -alanina no produjo efectos secundarios significativos, excepto la parestesia esperada.
- El análisis farmacocinético-farmacodinámico muestra un bucle de histéresis en sentido horario con taquifilaxia marcada. Además, no se encontró ninguna predicción de parestesia entre C_{MAX} , $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ y E_{MAX} , AUEC probablemente debido a diversas cinéticas de captación y mecanismos de efecto involucrados.
- Esta nueva formulación de liberación sostenida invita a explorar el cambio de estrategias de suplementación de β -ALA crónica a corto o mediano plazo para mejorar la absorción de CARN con un cálculo de dosis de precisión considerando variables antropométricas y preservando sus características de liberación sostenida.

VIII – LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

VIII -LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio, muestra que los estudios preliminares de la formulación POL logran una cinética de liberación más eficiente en una innovadora mezcla de polvo de liberación sostenida que aumenta al doble la biodisponibilidad de la β -ALA después de una dosis oral de 8 g. Hasta donde sabemos, esta dosis es la dosis aguda única más alta informada en la literatura en una sola administración, mayor que la dosis diaria común de 6.4 g y parece más atractiva que una gran cantidad de comprimidos por toma (10 en este estudio) o cantidades muy frecuentes de polvo puro repartidas a lo largo del día.

Nuestros resultados exigen investigar los programas de dosificación diarios hacia nuevos protocolos de suplementación y la evaluación de la tasa de síntesis de CARN con un tiempo de suplementación más corto. Aunque el efecto de la formulación sobre la absorción de CARN sigue sin estar claro, (182,183) el efecto techo parece estar aún lejos de alcanzarse, siendo la dosis acumulada el factor esencial (6,30). Según un modelo matemático bayesiano, (164) la cantidad de CARN muscular que puede incrementarse por la suplementación con β -ALA no se ha alcanzado con los protocolos de suplementación habituales (6,4 g / día, 4 semanas), sino que se necesitarían alrededor de 33 semanas (8 meses). De hecho, el estudio más largo intentó 24 semanas sin evidencia de un efecto techo. La investigación adicional para confirmar la capacidad de mejora de las reservas de CARN mediante la suplementación con β -ALA justifica el desarrollo de formulaciones novedosas como la mezcla de polvo de liberación sostenida utilizada en este estudio. Lograr ingestas diarias más altas puede ayudar a aclarar este límite y permitir estrategias de suplementación más cortas.

Asimismo, la formulación del efecto de la histidina sobre la absorción y biodisponibilidad de la balenina requiere un mayor rango de dosis para su completa validación. Coadministración de L-His con COM podría dilucidar el efecto de la interacción del posible efecto de la formulación en la liberación.

Por último, un sistema de liberación similar a un polvo de liberación sostenida de β -ALA evitaría las limitaciones de los comprimidos de múltiples capas y permitiría una dosificación precisa considerando variables antropométricas u otros factores (por ejemplo, peso corporal, masa muscular magra, etc.) en lugar de dosis fijas (184). Esto conduciría a una mejor evaluación de las respuestas individuales para identificar nuevas estrategias de suplementación de β -ALA capaces de alcanzar la dosis mínima acumulada para obtener beneficios de una etapa anterior y generar un cambio de paradigma en el uso de β -ALA crónico a corto o mediano plazo en tiempos de suplementación en nutrición deportiva.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aecosan - Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/complementos_alimenticios.htm
2. Nutrition C for FS and A. Consumers - Suplementos Alimenticios - Lo que usted necesita saber. [cited 2019 Jan 25]; Available from: <https://www.fda.gov/food/resourcesforyou/consumers/ucm210723.htm>
3. Salgado JVV, Lollo PCB, Amaya-Farfan J, Chacon-Mikahil MP. Dietary supplement usage and motivation in Brazilian road runners. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014;11(1):41.
4. Saunders B, De Salles Painelli V, De Oliveira LF, Da Eira Silva V, Da Silva RP, Riani L, et al. Twenty-four Weeks of β -Alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2017;49(5):896–906.
5. Goron A, Moinard C. Amino acids and sport: a true love story? *Amino Acids.* 2018;50(8):969–80.
6. Hoffman JR, Varanoske A, Stout JR. Effects of β -Alanine Supplementation on Carnosine Elevation and Physiological Performance. 1st ed. Vol. 84, *Advances in food and nutrition research.* Elsevier Inc.; 2018; p. 183–206.
7. Nassis GP, Sporer B, Stathis CG. β -Alanine efficacy for sports performance improvement: From science to practice. *Br J Sports Med.* 2017;51(8):626–7.
8. Begum G, Cunliffe A, Leveritt M. Physiological Role of Carnosine in Contracting Muscle. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2005;15(5):493–514.
9. Gregory NS, Whitley PE, Sluka KA. Effect of Intramuscular Protons, Lactate, and ATP on Muscle Hyperalgesia in Rats. Tang S-J, editor. *PLoS One.* 2015;10(9):e0138576.
10. Pollak KA, Swenson JD, Vanhaisma TA, Hughen RW, Jo D, Light KC, et al. Exogenously applied muscle metabolites synergistically evoke sensations of muscle fatigue and pain in human subjects. *Exp Physiol.* 2014;99(2):368–80.
11. Hochachka PW, Mommsen TP. Protons and anaerobiosis. Vol. 219, *Science.* American Association for the Advancement of Science; 1983. p. 1391–7.

12. Somero GN. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am J Physiol.* 1986;251(2 Pt 2):R197-213.
13. Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiol Rev.* 2008;88(1):287–332.
14. Cowley JC, Gates DH. Influence of remote pain on movement control and muscle endurance during repetitive movements. *Exp Brain Res.* 2018;236(8):2309–19.
15. Mainwood GW, Renaud JM. The effect of acid-base balance on fatigue of skeletal muscle. Vol. 63, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* NRC Research Press Ottawa, Canada ; 1985. p. 403–16.
16. Brisola GMP, Zagatto AM. Ergogenic Effects of β -Alanine Supplementation on Different Sports Modalities: Strong Evidence or Only Incipient Findings?. *J strength Cond Res.* 2018;33(1):1
17. Matthews JJ, Artioli GG, Turner MD, Sale C. The Physiological Roles of Carnosine and β -Alanine in Exercising Human Skeletal Muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2019;51(10):2098-2108
18. Hendlar SS, Rorvik DM, Thomson Reuters. PDR for nutritional supplements. Thomson Reuters; 2008. 788 p.
19. 3-aminopropanoic acid 200 - Beta alanina - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2020 Dec 16]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Beta_alanina#/media/Archivo:3-aminopropanoic_acid_200.svg
20. beta-Alanine | C₃H₇NO₂ - PubChem [Internet]. [cited 2020 Dec 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Alanine>
21. Harris RC, Tallon MJ, Dunnett M, Boobis L, Coakley J, Kim HJ, et al. The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids.* 2006;30:279–89. 9
22. Hoffman JR, Landau G, Stout JR, Dabora M, Moran DS, Sharvit N, et al. β -alanine supplementation improves tactical performance but not cognitive function in combat soldiers. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014;11(1):15.
23. Blancquaert L, Everaert I, Derave W. Beta-alanine supplementation, muscle carnosine and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(1):63–70.
24. Fritzson P. The catabolism of C¹⁴-labeled uracil, dihydrouracil, and beta-ureidopropionic acid in rat liver slices. *J Biol Chem.* 1957;226(1):223-8.

25. Harris RC, Wise JA, Price KA, Kim HJ, Kim CK, Sale C. Determinants of muscle carnosine content. *Amino Acids*. 2012;43(1):5–12.
26. Everaert I, Mooyaart A, Baguet A, Zutinic A, Baelde H, Achten E, et al. Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNDP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*. 2011;40(4):1221–9.
27. Harris R, Jones G, Hill C, Kendrick I, Boobis L. The carnosine content of *V Lateralis* in vegetarians and omnivores. *FASEB J* . 2007;21(769):20
28. Jones G, Smith M, Harris R. Imidazole dipeptide content of dietary sources commonly consumed within the British diet. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011; 70
29. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1803–45.
30. Stellingwerff T, Decombaz J, Harris RC, Boesch C. Optimizing human in vivo dosing and delivery of β -alanine supplements for muscle carnosine synthesis. *Amino Acids*. 2012;43(1):57–65.
31. Thwaites DT, Anderson CMH. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine - Thwaites - 2007 - *Experimental Physiology* - Wiley Online Library. *Exp Physiol*. 2018;92(4):603–19.
32. Harris RC, Tallon MJ, Dunnett M, Boobis L, Coakley J, Kim HJ, et al. The absorption of orally supplied β -alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*. 2006;30:279–89.
33. Hill CA, Harris RC, Kim HJ, Harris BD, Sale C, Boobis LH, et al. Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*. 2007;32(2):225–33.
34. Stellingwerff T, Anwander H, Egger A, Buehler T, Kreis R, Decombaz J, et al. Effect of two β -alanine dosing protocols on muscle carnosine synthesis and washout. *Amino Acids*. 2012;42(6):2461–72.
35. Harris RC, Jones GA, Kim HJ, Kim CK, Price KA, Wise JA. Changes in muscle carnosine of subjects with 4 weeks supplementation with a controlled release formulation of beta-alanine (Carnosyn™), and for 6 weeks post. *FASEB J*. 2009;23:599.4.
36. Hobson RM, Saunders B, Ball G, Harris RC, Sale C. Effects of β -alanine supplementation on exercise performance: a meta-analysis. *Amino Acids*. 2012;43(1):25–37.

37. Saunders B, Elliott-Sale K, Artioli GG, Swinton PA, Dolan E, Roschel H, et al. β -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2017;51(8):658–69.
38. Trexler ET, Smith-Ryan AE, Stout JR, Hoffman JR, Wilborn CD, Sale C, et al. International society of sports nutrition position stand: Beta-Alanine. *J Int Soc Sports Nutr.* 2015;12(1):1–14.
39. Castell LM, Burke LM, Stear SJ, McNaughton LR, Harris RC, Sundgot-Borgen J. *BJSM reviews: A-Z of nutritional supplements: Dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance Part 5. Vol. 44, British Journal of Sports Medicine. British Association of Sport and Exercise Medicine; 2010. p. 77–8.*
40. Bellinger PM. The effect of β -alanine supplementation on cycling time trials of different length. *European Journal of Sport Science.* 2015; 16(7):1-8
41. Bellinger PM, Minahan CL, Bellinger P. Metabolic consequences of β -alanine supplementation during exhaustive supramaximal cycling and 4000-m time trial performance. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism.* 2016; 41(8)
42. Harris RC, Solis MY, Benatti FB, Gualano B, Lancha AH Jr, Artioli GG. The ergogenic effect of beta-alanine combined with sodium bicarbonate on high-intensity swimming performance. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2013;38(5):525-32.
43. Donovan T, Ballam T, Morton JP, Close GL. β -alanine improves punch force and frequency in amateur boxers during a simulated contest. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2012;22(5):331–7.
44. De Andrade Kratz C, De Salles Painelli V, Márcio De Andrade Nemezio K, Pires Da Silva R, Franchini E, Moura Zagatto A, et al. Beta-alanine supplementation enhances judo-related performance in highly-trained athletes. *J Sci Med Sport.* 2017;20:403–8.
45. Claus GM, Redkva PE, Brisola GMP, Malta ES, de Araujo Bonetti de Poli R, Miyagi WE, et al. Beta-Alanine Supplementation Improves Throwing Velocities in Repeated Sprint Ability and 200-m Swimming Performance in Young Water Polo Players. *Pediatr Exerc Sci.* 2017;29(2):203–12.
46. Brisola GMP, de Souza Malta E, Santiago PRP, Vieira LHP, Zagatto AM. Four Weeks of β -alanine Supplementation Improves High-Intensity Game Activities in Water Polo. *Int J Sports Physiol Perform.* 2018;1–23.
47. Brisola GMP, Artioli GG, Papoti M, Zagatto AM. Effects of Four Weeks of β -Alanine Supplementation on Repeated Sprint Ability in Water Polo

- Players. Ardigò LP, editor. PLoS One. 2016;11(12):e0167968.
48. Décombaz J, Beaumont M, Vuichoud J, Bouisset F, Stellingwerff T. Effect of slow-release β -alanine tablets on absorption kinetics and paresthesia. *Amino Acids*. 2012;43(1):67–76. 0
 49. Maughan RJ, Burke LM, Dvorak J, Larson-Meyer DE, Peeling P, Phillips SM, et al. IOC consensus statement: Dietary supplements and the high-performance athlete. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2018;28(2):104–25.
 50. Palacios Gil de Antuñano N, Manonelles Marqueta P, Blasco Redondo R, Contreras Fernández C, Franco Bonafonte L, Gaztañaga Aurrekoetxea T, et al. Suplementos nutricionales para el deportista. Ayudas ergogénicas en el deporte - 2019. Documento de consenso de la Sociedad Española de Medicina del Deporte. *Arch med Deport*. 2019;7–83.
 51. Kerksick CM, Wilborn CD, Roberts MD, Smith-Ryan A, Kleiner SM, Jäger R, et al. ISSN exercise & sports nutrition review update: Research & recommendations. Vol. 15, *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. BioMed Central Ltd.; 2018. p. 1–57.
 52. Liu Q, Sikand P, Ma C, Tang Z, Han L, Li Z, et al. Mechanisms of Itch Evoked by β -Alanine. *J Neurosci*. 2012;32(42):14532–7.
 53. del Favero S, Roschel H, Solis MY, Hayashi AP, Artioli GG, Otaduy MC, et al. Beta-alanine (Carnosyn™) supplementation in elderly subjects (60–80 years): effects on muscle carnosine content and physical capacity. *Amino Acids*. 2012;43(1):49–56.
 54. McCormack WP, Stout JR, Emerson NS, Scanlon TC, Warren AM, Wells AJ, et al. Oral nutritional supplement fortified with beta-alanine improves physical working capacity in older adults: A randomized, placebo-controlled study. *Exp Gerontol*. 2013;48(9):933–9.
 55. Dolan E, Swinton PA, Painelli VDS, Hemingway BS, Mazzolani B, Smaira FI, et al. A Systematic Risk Assessment and Meta-Analysis on the Use of Oral β -Alanine Supplementation. Vol. 10, *Advances in Nutrition*. Oxford University Press; 2019. p. 452–63.
 56. Church DD, Hoffman JR, Varanoske AN, Wang R, Baker KM, Monica MB La, et al. Comparison of Two β -Alanine Dosing Protocols on Muscle Carnosine Elevations. *J Am Coll Nutr*. 2017;36(8):608–16.
 57. Boureau F, Luu M, Doubrère JF. Comparative study of the validity of four French McGill Pain Questionnaire (MPQ) versions. *Pain*. 1992;50(1):59–65.
 58. Wade AM, Tucker HN. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem*. 1998;9(6):308–15.

59. Lentner C (Cornelius), CIBA-GEIGY Limited. Geigy scientific tables. Ciba-Geigy; 1981.
60. Sitton NG, Dixon JS, Astbury C, Francis RJ, Bird HA, Wright V. Kinetic investigations into the possible cause of low serum histidine in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1984;47(1):48–52.
61. Hague R, Holton J. An intravenous histidine load test for the detection of heterozygotes for histidinaemia. *Clinica Chimica Acta.* 1971;33(2):462-464.
62. Block WD, Westhoff MH, Steele BF. Histidine metabolism in the human adult: histidine blood tolerance, and the effect of continued free L-histidine ingestion on the concentration of imidazole compounds in blood and urine. *J Nutr.* 1967;91(2):189-94.
63. Gerber D., Tanenbaum L, Ahrens M. Free serum histidine levels in patients with rheumatoid arthritis and control subjects following an oral load of free L-histidine. *Metabolism.* 1976, 25(6):655-657
64. Bergström J, Fürst P, Norée LO, Vinnars E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol.* 1974;36(6):693–7.
65. Histidine - Wikipedia [Internet]. [cited 2020 Dec 16]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Histidine>
66. Histidine | C₆H₉N₃O₂ - PubChem [Internet]. [cited 2020 Dec 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histidine>
67. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *PNAS.* 1988;85(9)3175-3179.
68. PubChem Search [Internet]. [cited 2019 Jan 25]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#query=histidine>
69. Nagy I, Floyd RA. Hydroxyl free radical reactions with amino acids and proteins studied by electron spin resonance spectroscopy and spin-trapping. *Biochim Biophys Acta.* 1984;790(3):238-50.
70. Erickson MC, Hultin HO. Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.* 1992;292(2):427-32.
71. Erickson MC, Hultin HO. A Unique Role of Histidine in Fe-Catalyzed Lipid Oxidation by Fish Sarcoplasmic Reticulum. In: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine.* Boston, MA: Springer US; 1988. p. 307–12.
72. Foote CS, Clennan EL. Properties and Reactions of Singlet Dioxygen. In: *Active Oxygen in Chemistry.* Dordrecht: Springer Netherlands; 1995. p.

- 105-40.
73. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12365-7.
 74. Eisenberg WC, Taylor K, Schiff LJ. Biological effects of singlet delta oxygen on respiratory tract epithelium. *Experientia*. 1984;40(5):514-5.
 75. Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res*. 1992;26(7):641-55.
 76. Douglas NJ, Davidson I, Sudlow MF, Flenley DC. Bronchodilatation and the site of airway resistance in severe chronic bronchitis. *Thorax*. 1979;34(1):51-6.
 77. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen evolution upon simple acidification of aqueous hypochlorite: application to studies on the deleterious health effects of chlorinated drinking water. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(26):12362-4.
 78. Wagner JR, Motchnik PA, Stocker R, Sies H, Ames BN. The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18502-6.
 79. Kanofsky JR, Sima P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem*. 1991;266(14):9039-42.
 80. Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Lett*. 1997;413(2):239-42.
 81. Matheson IBC, Lee J. Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen. *Photochem Photobiol*. 1979;29(5):879-81.
 82. Foote CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by .beta.-carotene. *J Am Chem Soc*. 1968;90(22):6233-5.
 83. Bakardjiev A, Bauer K. Transport of beta-alanine and biosynthesis of carnosine by skeletal muscle cells in primary culture. *Eur J Biochem*. 1994;225(2):617-23.
 84. Hamblin TJ, Holton JB. The effect of an intravenous histidine load on the plasma level of other amino acids. *Clin Chim Acta*. 1972;42(1):37-41.
 85. Holton JB. The effect of a histidine load on plasma levels and renal clearances of other amino acids. *Clin Chim Acta*. 1968;21(2):241-5.

- Derave W, Everaert I, Beeckman S, Baguet A. Muscle Carnosine Metabolism and β -Alanine Supplementation in Relation to Exercise and Training. *Sport Med.* 2010;40(3):247–63.
87. Reilly SK, Fabo EC. Dietary histidine increases mouse skin urocanic acid levels and enhances uvb-induced immune suppression of contact hypersensitivity. *Photochem Photobiol.* 1991;53(4):431–8.
88. Norval M, Gibbs NK, Gilmour J. The role of urocanic acid in UV-induced immunosuppression: recent advances (1992-1994). *Photochem Photobiol.* 1995;62(2):209-17.
89. Döhlen H, Nornes H, Sjaastad O, Sjaastad Ö V. Histaminuria after Parenteral L-histidine Administration in Man. *Acta Physiol Scand.* 1973;89(1):51–60.
90. Floyd JC Jr, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest.* 1966;45(9):1487-502.
91. Pinals RS, Harris ED, Burnett JB, Gerber DA. Treatment of rheumatoid arthritis with L-histidine: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *J Rheumatol.* 1977;4(4):414-9.
92. Woodworth ME, Baldrige RC. Metabolic effects of an experimental histidinemia. *Biochem Med.* 1970;4(5):425-34.
93. Steinhauer HB, Batsford S, Schollmeyer P, Kluthe R. Studies on thromboxane B2 and prostaglandin E2 production in the course of murine autoimmune disease: inhibition by oral histidine and zinc supplementation. *Clin Nephrol.* 1985;24(2):63-8.
94. Kerr GR, Wolf RC, Waisman HA. Hyperlipemia in Infant Monkeys Fed Excess L-Histidine. *Exp Biol Med.* 1965;119(2):561–2.
95. Gulewitsch W, Amiradžibi S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft.* 1900;33(2):1902–3.
96. Harris RC, Hultman E, Nordesjö L-O. Glycogen, Glycolytic Intermediates and High-Energy Phosphates Determined in Biopsy Samples of Musculus Quadriceps Femoris of Man at Rest. *Methods and Variance of Values. Scand J Clin Lab Invest.* 1974;33(2):109–20.
97. Carnosine - Wikipedia [Internet]. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carnosina>
98. Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM, Harris RC. Carnosine: From exercise performance to health. *Amino Acids.*

- 2013;44(6):1477–91.
99. Pedersen TH, Nielsen OB, Lamb GD, Stephenson DG. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science*. 2004;305(5687):1144-7.
 101. Swietach P, Youm JB, Saegusa N, Leem CH, Spitzer KW, Vaughan-Jones RD. Coupled Ca²⁺/H⁺ transport by cytoplasmic buffers regulates local Ca²⁺ and H⁺ ion signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):E2064-73.
 102. Batrukova MA, Rubtsov AM. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1324(1):142-50.
 103. Muller L, Jackson SN, Woods AS. Histidine, the less interactive cousin of arginine. *Eur J Mass Spectrom*. 2019;25(2):212–8.
 104. Sale C, Saunders B, Harris RC. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. *Amino Acids*. 2010;39(2):321-33.
 105. Vistoli G, Straniero V, Pedretti A, Fumagalli L, Bolchi C, Pallavicini M, Valoti E, Testa B. Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis. *Chirality*. 2012;24(7):566-76.
 106. Ashikawa I, Itoh K. Raman spectra of polypeptides containing L-histidine residues and tautomerism of imidazole side chain. *Biopolymers*. 1979;18(8):1859–76.
 107. Torreggiani A, Tamba M, Fini G. Binding of copper(II) to carnosine: Raman and IR spectroscopic study. *Biopolymers*. 2000;57(3):149–59.
 108. Torreggiani A, Bonora S, Fini G. Raman and IR spectroscopic investigation of zinc(II)-carnosine complexes. *Biopolymers*. 2000;57(6):352–64.
 109. DOBBIE H, KERMACK WO. Complex-formation between polypeptides and metals. 2. The reaction between cupric ions and some dipeptides. *Biochem J*. 1955;59(2):246–57.
 110. Baran EJ. Metal complexes of carnosine. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65(7):789–97.
 111. Torreggiani A, Trincherio A, Tamba M, Fini G. Vibrational characterisation and biological activity of carnosine and its metal complexes. *Ital J Biochem*. 2003;52(2):87-97.
 112. Schröder L, Schmitz CH, Bachert P. Carnosine as molecular probe for

- sensitive detection of Cu(II) ions using localized ^1H NMR spectroscopy. *J Inorg Biochem.* 2008;102(2):174-83.
113. Matsukura T, Tanaka H. Applicability of Zinc Complex of L-Carnosine for Medical Use. *Biochemistry (Mosc).* 2000;65(7):817-23.
 114. Hill TL, Blikslager AT. Effect of a zinc L-carnosine compound on acid-induced injury in canine gastric mucosa ex vivo. *Am J Vet Res.* 2012;73(5):659-63.
 115. Ko JK, Leung CC. Ginger extract and polaprezinc exert gastroprotective actions by anti-oxidant and growth factor modulating effects in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(12):1861-9.
 116. Ishihara R, Iishi H, Sakai N, Yano H, Uedo N, Narahara H, et al. Polaprezinc Attenuates Helicobacter pylori-Associated Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter.* 2002;7(6):384-9.
 117. Mineo P, Vitalini D, La Mendola D, Rizzarelli E, Scamporrino E, Vecchio G. Electrospray mass spectrometric studies of L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) complexes with copper(II) or zinc ions in aqueous solution. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16(7):722-9.
 118. Boldyrev AA, Dupin AM, Batrukova MA, Bavykina NI, Korshunova GA, Shvachkin YuP. A comparative study of synthetic carnosine analogs as antioxidants. *Comp Biochem Physiol B.* 1989;94(2):237-40.
 119. Boldyrev AA, Dupin AM, Bunin AYa, Babizhaev MA, Severin SE. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem Int.* 1987;15(6):1105-13.
 120. Boldyrev AA, Dupin AM, Pindel EV, Severin SE. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. *Comp Biochem Physiol B.* 1988;89(2):245-50.
 121. Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM, Boldyrev AA, Yaropolov AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1157(3):304-12.
 122. Torreggiani MTA. A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution. *Int J Radiat Biol.* 1998;74(3):333-40.
 123. Hartman PE, Hartman Z, Ault KT. Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and sustained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid. *Photochem Photobiol.* 1990;51(1):59-66.
 124. Zhou S, Dickinson LC, Yang L, Decker EA. Identification of hydrazine in

- commercial preparations of carnosine and its influence on carnosine's antioxidative properties. *Anal Biochem.* 1998;261(1):79-86.
125. Decker EA, Livisay SA, Zhou S. A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. *Biochemistry (Mosc).* 2000;65(7):766-70.
 126. Quinn PJ, Boldyrev A a, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med.* 1992;13(5):379-444.
 127. Bauchart C, Savary-Auzeloux I, Patureau Mirand P, Thomas E, Morzel M, Rémond D. Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *J Nutr.* 2007;137(3):589-93.
 128. Gardner ML, Illingworth KM, Kelleher J, Wood D. Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J Physiol.* 1991 Apr 11;439(1):411-22.
 129. Asatoor AM, Bando JK, Lant AF, Milne MD, Navab F. Intestinal absorption of carnosine and its constituent amino acids in man. *Gut.* 1970;11(3):250-4
 130. Park YJ, Volpe SL, Decker EA. Quantitation of Carnosine in Humans Plasma after Dietary Consumption of Beef. *J Agric Food Chem.* 2005;53(12):4736-9.
 131. Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, Cairns NJ, Carter C, Cowley DJ, Duverger D, Ganzhorn AJ, Guenet C, Heintzelmann B, Laucher V, Sauvage C, Smirnova T. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6521-31.
 132. Gaunitz F, Hipkiss AR. Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids.* 2012;43(1):135-42.
 133. Wang H, Fei Y-J, Ganapathy V, Leibach FH. Electrophysiological characteristics of the proton-coupled peptide transporter PEPT2 cloned from rat brain. *Am J Physiol Physiol.* 1998;275(4):C967-75.
 134. Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Van Schaftingen E. Molecular Identification of Carnosine Synthase as ATP-grasp Domain-containing Protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem.* 2010;285(13):9346-56.
 135. Horinishi H, Grillo M, Margolis FL. Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem.* 1978;31(4):909-19.
 136. Margolis FL, Grillo M, Hempstead J, Morgan JI. Monoclonal Antibodies to

- Mammalian Carnosine Synthetase. *J Neurochem.* 1987;48(2):593–600.
137. Tiedje KE, Stevens K, Barnes S, Weaver DF. β -Alanine as a small molecule neurotransmitter. *Neurochem Int.* 2010;57(3):177–88.
 138. Janssen B, Hohenadel D, Brinkkoetter P, Peters V, Rind N, Fischer C, et al. Carnosine as a Protective Factor in Diabetic Nephropathy: Association With a Leucine Repeat of the Carnosinase Gene CNDP1. *Diabetes.* 2005;54(8):2320–7.
 139. Boldyrev AA. Carnosine and oxidative stress in cells and tissues. New York, NY: Nova Publishers; 2007.
 140. Kalyankar G, Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related β -alanyl and α -aminobutyryl peptides. *J Biol Chem.* 1959;234(12):3210–8.
 141. Baguet A, Reyngoudt H, Pottier A, Everaert I, Callens S, Achten E, et al. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. *J Appl Physiol.* 2009;106(3):837–42.
 142. Peters V, Kebbewar M, Jansen EW, Jakobs C, Riedl E, Koeppl H, et al. Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity. *Amino Acids.* 2010;38(5):1607–15.
 143. Boldyrev a a. Problems and Perspectives in Studying the Biological Role of Carnosine. *Biochemistry (Mosc).* 2000;65(7):6.
 144. Harding J, Margolis FL. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. III. Effect on enzymes of carnosine metabolism. *Brain Res.* 1976;110(2):351–60.
 145. Pandya V, Ekka MK, Dutta RK, Kumaran S. Mass spectrometry assay for studying kinetic properties of dipeptidases: characterization of human and yeast dipeptidases. *Anal Biochem.* 2011 Nov 1;418(1):134–42.
 146. Baguet A, Reyngoudt H, Pottier A, Everaert I, Callens S, Achten E, et al. Carnosine loading and washout in human skeletal muscles. *J Appl Physiol.* 2009;106(3):837–42.
 147. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci.* 1997;15(3):353–63.
 148. Aydın AF, Küçükgergin C, Özdemirler-Erata G, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine treatment on prooxidant–antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology.* 2010;11(1):103–9.
 149. Kim MY, Kim EJ, Kim Y-N, Choi C, Lee B-H. Effects of α -lipoic acid and L-

- carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Nutr Res Pract*. 2011;5(5):421.
150. Hoffman JR, Stout JR, Harris RC, Moran DS. β -Alanine supplementation and military performance. *Amino Acids*. 2015;47(12):2463–74. 7
 151. Kendrick IP, Harris RC, Kim HJ, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, et al. The effects of 10 weeks of resistance training combined with β -alanine supplementation on whole body strength, force production, muscular endurance and body composition. *Amino Acids*. 2008;34(4):547–54.
 152. Kendrick IP, Kim HJ, Harris RC, Kim CK, Dang VH, Lam TQ, et al. The effect of 4 weeks β -alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. *Eur J Appl Physiol*. 2009;106(1):131–8.
 153. Baguet A, Bourgois J, Vanhee L, Achten E, Derave W. Important role of muscle carnosine in rowing performance. *J Appl Physiol*. 2010;109(4):1096–101.
 154. Derave W, Özdemir MS, Harris RC, Pottier A, Reyngoudt H, Koppo K, et al. β -Alanine supplementation augments muscle carnosine content and attenuates fatigue during repeated isokinetic contraction bouts in trained sprinters. *J Appl Physiol*. 2007;103(5):1736–43.
 155. Hoffman JR, Ratamess NA, Faigenbaum AD, Ross R, Kang J, Stout JR, et al. Short-duration beta-alanine supplementation increases training volume and reduces subjective feelings of fatigue in college football players. *Nutr Res*. 2008;28(1):31–5.
 156. Hoffman J, Ratamess N, Kang J, Mangine G, Faigenbaum A, Stout J. Effect of Creatine and β -Alanine Supplementation on Performance and Endocrine Responses in Strength/Power Athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2006;16(4):430–46.
 157. Hoffman J, Ratamess N, Ross R, Kang J, Magrelli J, Neese K, et al. β -Alanine and the Hormonal Response to Exercise. *Int J Sports Med*. 2008;29(12):952–8.
 158. Stout JR, Cramer JT, Mielke M, O’Kroy J, Torok DJ, Zoeller RF. Effects of Twenty-Eight Days of Beta-Alanine and Creatine Monohydrate Supplementation on the Physical Working Capacity at Neuromuscular Fatigue Threshold. *J Strength Cond Res*. 2006;20(4):928.
 159. Stout JR, Cramer JT, Zoeller RF, Torok D, Costa P, Hoffman JR, et al. Effects of β -alanine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue and ventilatory threshold in women. *Amino Acids*. 2007;32(3):381–6.

160. Harris RC, Jones G, Wise JA. The plasma concentration-time profile of beta-alanine using a controlled-release formulation (Carnosyn®). *FASEB J*. 2008;22(1_supplement):701.9-701.9.
161. Harris RC, Stellingwerff T. Effect of β -alanine supplementation on high-intensity exercise performance. *Limits Hum Endur*. 2013;76:61-71.
162. Coothankandaswamy V, Cao S, Xu Y, Prasad PD, Singh PK, Reynolds CP, et al. Amino acid transporter SLC6A14 is a novel and effective drug target for pancreatic cancer. *Br J Pharmacol*. 2016;173(23):3292-306.
163. Inigo C, Barber A, Lostao MP. Na⁺ and pH dependence of proline and beta-alanine absorption in rat small intestine. *Acta Physiol*. 2006;186(4):271-8.
164. Thwaites DT, McEwan GT, Brown CD, Hirst BH, Simmons NL. Na(+)-independent, H(+)-coupled transepithelial beta-alanine absorption by human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18438-41.
165. Anderson CMH, Ganapathy V, Thwaites DT. Human solute carrier SLC6A14 is the β -alanine carrier. *J Physiol*. 2008;586(17):4061-7.
166. Hatanaka T, Huang W, Ling R, Prasad PD, Sugawara M, Leibach FH, et al. Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and liver-specific subtype of amino acid transport system A. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2001;1510(1-2):10-7.
167. Gu S, Villegas CJ, Jiang JX. Differential regulation of amino acid transporter SNAT3 by insulin in hepatocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(28):26055-62. g/
168. Chee ELC, Lim AYL, Modamio P, Fernandez-Lastra C, Segarra I. Sunitinib tissue distribution changes after coadministration with ketoconazole in mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2016;41(3):309-19.
169. Tan SY, Kan E, Lim WY, Chay G, Law JHK, Soo GW, et al. Metronidazole leads to enhanced uptake of imatinib in brain, liver and kidney without affecting its plasma pharmacokinetics in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(7):918-25.
170. Soo GW, Law JHK, Kan E, Tan SY, Lim WY, Chay G, et al. Differential effects of ketoconazole and primaquine on the pharmacokinetics and tissue distribution of imatinib in mice. *Anticancer Drugs [Internet]*. 2010;21(7):1.
171. Tan SY, Wong MM, Tiew ALW, Choo YW, Lim SH, Ooi IH, et al. Sunitinib DDI with paracetamol, diclofenac, mefenamic acid and ibuprofen shows sex-divergent effects on the tissue uptake and distribution pattern of sunitinib in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(4):709-18.

172. Chew WK, Segarra I, Ambu S, Mak JW. Significant reduction of brain cysts caused by *Toxoplasma gondii* after treatment with spiramycin coadministered with metronidazole in a mouse model of chronic toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(4):1762–8.
173. Zhang Y, Wang J. Targeting uptake transporters for cancer imaging and treatment. Vol. 10, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences; 2020. p. 79–90.
174. Zhang L, Sui C, Yang W, Luo Q. Amino acid transporters: Emerging roles in drug delivery for tumor-targeting therapy. Vol. 15, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Shenyang Pharmaceutical University; 2020. p. 192–206.
175. Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha AH, Giannini Artioli G, et al. Role of β -alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Med Sci Sport Exerc*. 2010;42(6):1.
176. Smith AE, Walter AA, Graef JL, Kendall KL, Moon JR, Lockwood CM, et al. Effects of β -alanine supplementation and high-intensity interval training on endurance performance and body composition in men; a double-blind trial. *J Int Soc Sports Nutr*. 2009;6:5.
177. Kopple JD, Swendseid ME. Effect of histidine intake on plasma and urine histidine levels, nitrogen balance and N^{τ} -methylhistidine excretion in normal and chronically uremic men. *J Nutr*. 1981;111(6):931–42.
178. Wilson RC, Jones PW. A comparison of the visual analogue scale and modified Borg scale for the measurement of dyspnoea during exercise. *Clin Sci*. 1989 ;76(3):277–82.
179. Negus SS, Banks ML. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic (PKPD) Analysis with Drug Discrimination. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences* . Springer Verlag; 2018. p. 245–59.
180. Louizos C, Yáñez JA, Forrest ML, Davies NM. Understanding the hysteresis loop conundrum in pharmacokinetic / pharmacodynamic relationships. *J Pharm Pharm Sci*. 2014;17(1):34–91.
181. Ploeger BA, Van Der Graaf PH, Danhof M. Incorporating receptor theory in mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling. Vol. 24, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. Japanese Society for the Study of Xenobiotics; 2009. p. 3–15.
182. Varanoske AN, Hoffman JR, Church DD, Coker NA, Baker KM, Dodd SJ, et al. Comparison of sustained-release and rapid-release β -alanine formulations on changes in skeletal muscle carnosine and histidine content and isometric performance following a muscle-damaging protocol. *Amino*

- Acids. 2018;51(1):1–12.
183. Perim P, Marticorena FM, Ribeiro F, Barreto G, Gobbi N, Kerksick C, et al. Can the Skeletal Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation Be Optimized? *Front Nutr.* 2019;6:135.
184. Stautemas J, Everaert I, Lefevere FBD, Derave W. Pharmacokinetics of β -Alanine Using Different Dosing Strategies. *Front Nutr.* 2018;5:70.

X - ANEXOS

X – ANEXOS

ANEXO 1. Estudios de suplementación con β -alanina

REFERENCIA	DOSIS	PARTICIPANTES
Stout et al. [2007]	3.2 g/día 1 semana 6.4 g/día 3 semanas	β -ALA (n = 11) Placebo (n = 11)
Hoffman et al. [2008]	4.8 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 8) Placebo (n = 8) Diseño cruzado
del Favero et al. [2012]	3.2 g/día 12 semanas	β -ALA (n = 12) Placebo (n = 6)
Sale et al. [2012]	6.4 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 7) Placebo; (n = 6)
Saunders et al. [2012]	6.4 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 8) Placebo (n = 8) β -ALA (n = 10) Placebo (n = 10)
Saunders et al. [2012]	3.2 g/día 12 semanas	β -ALA (n = 9) Placebo (n = 8)
Smith et al. [2012]	3.2 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 15) Placebo (n = 15)
Hoffman et al. [2014]	6 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 10) Placebo (n = 10)
Gross et al. [2014]	3.2 g/día 38 días	β -ALA (n = 8) Placebo (n = 9)
Chung et al. [2014]	6.4 g/día 6 semanas	β -ALA (n = 14) Placebo (n = 13)
de Salles Painelli et al. [2014]	6.4 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 20) Placebo (n = 19)
Saunders et al. [2014]	6.4 g/día 4 semanas 3.2 g/día 1 semana	β -ALA (n = 8) Placebo (n = 8)

Smith-Ryan et al. [2014]	4.8 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 15) Placebo (n = 15)
Hannah et al. [2015]	6.4 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 11) Placebo (n = 12)
Solis et al. [2015]	6.4 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 15) Placebo (n = 15)
Bellinger and Minahan [2016]	6.4 g/día 4 semanas	β -ALA (n = 7) Placebo (n = 7)
Church et al. [2017]	6 g/día 4 semanas 12 g/día 2 semanas	β -ALA (n = 20) Placebo (n = 10)

ANEXO 2. Efectos secundarios según las dosis de β -ALA

REFERENCIA	DOSIS	FORMATO	EFFECTOS SECUNDARIOS
Harris et al. (2006)	10 mg/kg	β -ALA pura	Irritación de la piel y sensación de picazón (leve)
	20 mg/kg	β -ALA pura	Irritación de la piel y sensación de picazón
	40 mg/kg	β -ALA pura	Irritación de la piel y sensación de picazón
Hill et al. (2007)	800 mg	β -ALA pura	Parestesia leve y poco frecuente
Harris et al. (2008)	3200 mg	Liberación sostenida	Síntomas de parestesia
Jordan et al. (2010)	2000 mg	β -ALA pura	Hormigueo en dedos y manos
Sweeney et al. (2010)	~1300 mg	β -ALA pura	Sensación de picazón
Smith-Ryan et al (2012)	1600 mg	β -ALA pura	Parestesia
Stellingwerf et al. (2012)	1600 mg	Liberación sostenida	Calor, enrojecimiento, hormigueo y picazón, sin diferencias con el placebo.
Bellinger et al. (2012)	~16 mg/kg BM	β -ALA pura	Parestesia
Chung et al. (2012)	1600 mg	Liberación sostenida	Parestesia leve
Decombaz et al. (2012)	1600 mg	β -ALA pura	Hormigueo; cosquilleo, picazón; entumecimiento, insensibilidad; dolor hipersensibilidad táctil; enrojecimiento y temblor
	1600 mg	Liberación sostenida	Todos los síntomas anteriores, sin diferencia con el placebo.

de Salles et al. (2013)	1600 mg	Liberación sostenida	Parestesia leve
MacPhee et al. (2013)	3000 mg	β -ALA pura	Pinchazos y agujas, rubor (enrojecimiento y / o sensación de calor)
McCormack et al. (2013)	800 & 1200 mg	β -ALA pura	Parestesia
Mero et al. (2013)	1200 mg	β -ALA pura	Parestesia
Howe et al. (2013)	~16 mg/kg BM	β -ALA pura	Parestesia
Tobias et al. (2013)	6400 mg	Liberación sostenida	Parestesia
Hoffman et al. (2014)	2000 mg	Liberación sostenida	Parestesia
de Salles et al. (2014)	1600 mg	Liberación sostenida	Parestesia leve
Gross et al. (2014)	1600 mg	β -ALA pura	Parestesia
Glenn et al. (2015)	1600 mg	β -ALA pura	Parestesia
Glenn et al. (2015)	1600 mg	β -ALA pura	Parestesia
Bellinger and Minahan (2015)	1600 mg	Liberación sostenida	Parestesia – ardor, hormigueo, picazón y / o sensación de picazón
Bellinger and Minahan (2016)	30 mg/kg BM	β -ALA pura	Parestesia – alfileres y agujas

ANEXO 3. Certificados de análisis de ingredientes y producto final de BETAFOR3MAX®

MATERIA PRIMA: BETA-ALANINA

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Parámetros	Especificación
Apariencia	Polvo color blanco casi blanco
Sabor	Característico
Olor	Característico

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Parámetros	Especificación	
Humedad	< 1	%
Identidad	Cumple	
Densidad Aparente	0.85 – 0.91	g/ml
Granulometria	> 95	%, 20µm
Mercurio (Hg)	< 0.1	ppm
Arsénico (As)	< 3	ppm
Plomo (Pb)	< 3	ppm
Cadmio (Cd)	< 1	ppm

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parámetros	Especificación	
Aerobios Mesófilos Totales	<10.000	ufc/g o mL
Salmonela	Ausencia	10g o 10 mL
Staphylococcus aureus	Ausencia	g o mL
Mohos y Levaduras	<100	ufc/g o mL
Bacteria Gram-toler a Bilis	<100	ufc/g o mL
E.Coli	Ausencia	g o mL

MATERIA PRIMA: L-HISTIDINA**CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

Parámetros	Especificación
Apariencia	Polvo cristalino blanco

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

Parámetros	Especificación
Ensayo	98.5%-101.5%
Identificación	Cumple
Transmitancia	≥95.0%
Humedad	≤0.5 %
Metales Pesados	Max 10 ppm
Arsénico (As)	≤1 ppm
Plomo (Pb)	≤3 ppm
Cadmio (Cd)	≤1 ppm
Mercurio (Hg)	≤0.1 ppm
Residuo de ignición	≤0.1%
Rotación específica	+12.0°to +12.8°
pH	7.0~8.5
Otros aminoácidos	≤0.2% (individual) ≤0.5% (total)

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parámetros	Especificación
Aerobios Mesófilos Totales	<1000 ufc/g
Salmonela	Ausencia/25g
Mohos y Levaduras	<100 ufc/g
Coliformes	<10 ufc/g
E.Coli	Ausencia/g

MATERIA PRIMA: L-CARNOSINA**CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

Parámetros	Especificación
Apariencia	Polvo blanco

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

Parámetros	Especificación
Ensayo	99.0%-101.0%
Identificación	Cumple
Humedad	≤1.0 %
Metales Pesados	Max 10 ppm
Arsénico (As)	≤1 ppm
Plomo (Pb)	≤3 ppm
Cadmio (Cd)	≤1 ppm
Mercurio (Hg)	≤0.1 ppm
Residuo de ignición	≤0.1%
Rotación específica	+20°to +22°
Punto de fusión	250°C~265°C
pH	7.5~8.5
L-Histidina	≤1.0%
Beta-alanina	≤0.1%
Contenido en hidracina	No detectable

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parámetros	Especificación
Aerobios Mesófilos Totales	<1000 ufc/g
Salmonela	Ausencia/25g
Mohos y Levaduras	<100 ufc/g
Coliformes	<10 ufc/g
E.Coli	Ausencia/g

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO
LISTA DE INGREDIENTES

BETAFOR3MAX®

Beta alanina recubierta, L-Histidina y
 L-carnosina

COMPOSICIÓN POR 100 g **INGREDIENTES**

Beta alanina	8 g
L-Histidina	300 mg
L-carnosina	100 mg

PARÁMETROS ORGANOLÉPTICOS

Parámetros	Especificaciones	Resultados
Apariencia	Polvo color marrón claro con partículas blancas	Cumple
Sabor	Limón	Cumple

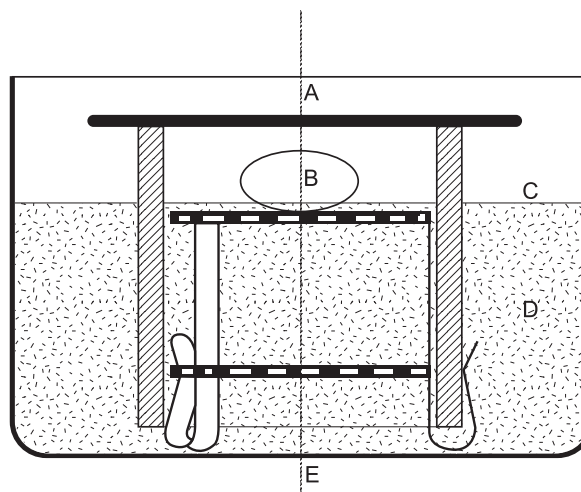
PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS

Parámetros	Especificaciones	Resultados
Humedad (%)	<15	Cumple

PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Ensayos realizados	Especificaciones	Resultados
Aerobios totales (ufc/g)	< 10000	<10
<i>Salmonella</i> spp. (ufc/10 g)	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/g)	Ausencia	Ausencia
Mohos y levaduras (ufc/g)	< 100	< 10
<i>Escherichia coli</i> (ufc/g)	Ausencia	Ausencia
Bacterias gram-negativas bili-tolerantes (ufc/g)	< 100	< 10

ANEXO 4. Farmacopea Europea. 2.9.3- Test de disolución para formas sólidas de dosificación.



- | | |
|-------------------|-----------------|
| A. glass plate | D. water |
| B. vaginal tablet | E. dish, beaker |
| C. water surface | |

Figure 2.9.2.-2.

01/2012:20903

2.9.3. DISSOLUTION TEST FOR SOLID DOSAGE FORMS

This test is provided to determine compliance with the dissolution requirements for solid dosage forms administered orally. In this chapter, a dosage unit is defined as 1 tablet or 1 capsule or the amount specified.

APPARATUS

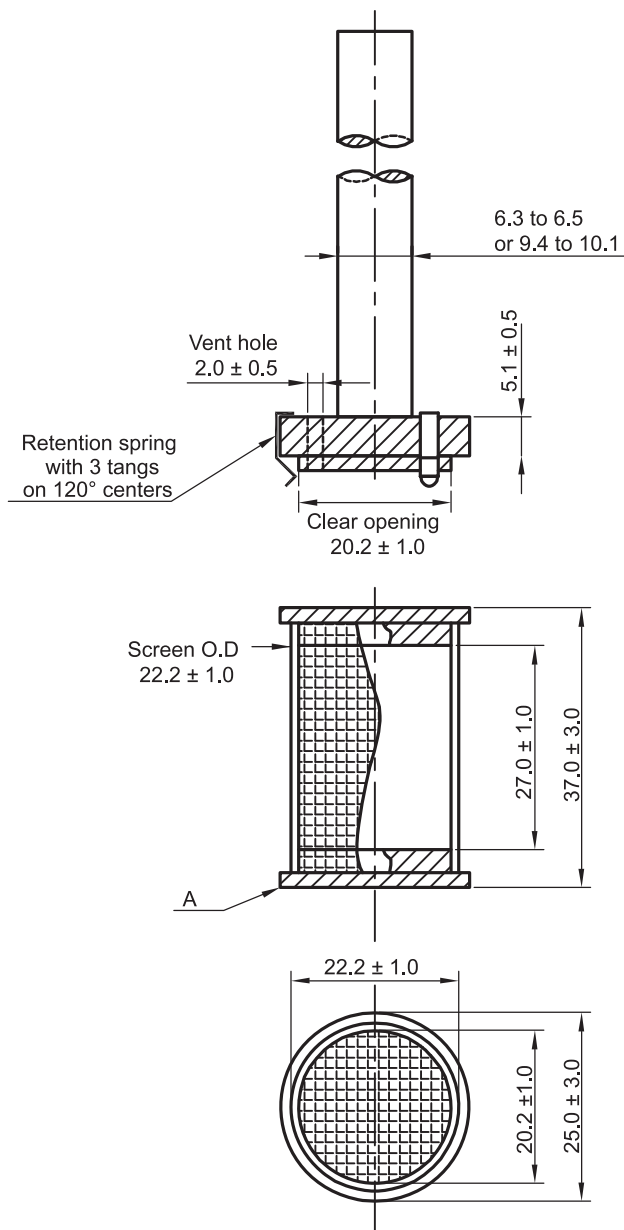
Apparatus 1 (Basket apparatus). The assembly consists of the following: a vessel, which may be covered, made of glass or other inert, transparent material⁽²⁾; a motor; a drive shaft; and a cylindrical basket (stirring element). The vessel is partially immersed in a suitable water-bath of any convenient size or heated by a suitable device such as a heating jacket. The water-bath or heating device permits maintaining the temperature inside the vessel at 37 ± 0.5 °C during the test and keeping the dissolution medium in constant, smooth motion. No part of the assembly, including the environment in which the assembly is placed, contributes significant motion, agitation, or vibration beyond that due to the smoothly rotating stirring element. Apparatus that permits observation of the preparation and stirring element during the test is preferable. The vessel is cylindrical, with a hemispherical bottom and a capacity of 1 L. Its height is 160-210 mm and its inside diameter is 98-106 mm. Its sides are flanged at the top. A fitted cover may be used to retard evaporation⁽³⁾. The shaft is positioned so that its axis is not more than 2 mm at any point from the vertical axis of the vessel and rotates smoothly and without significant wobble that could affect the results. A speed-regulating device is used that allows the shaft rotation speed to be selected and maintained at a specified rate, within ± 4 per cent.

Shaft and basket components of the stirring element are fabricated of stainless steel, type 316 or equivalent, to the specifications shown in Figure 2.9.3.-1.

(2) The materials must not sorb, react, or interfere with the preparation to be tested.

(3) If a cover is used, it provides sufficient openings to allow ready insertion of the thermometer and withdrawal of samples.

A basket having a gold coating of about $2.5\ \mu\text{m}$ (0.0001 inch) thick may be used. The dosage unit is placed in a dry basket at the beginning of each test. The distance between the inside bottom of the vessel and the bottom of the basket is maintained at $25 \pm 2\ \text{mm}$ during the test.



- 1) Screen with welded seam: 0.22-0.31 mm wire diameter with wire opening of 0.36-0.44 mm. After welding the screen may be slightly altered.
- 2) Maximum allowable runout at "A" is 1.0 mm when the part is rotated on center line axis with basket mounted.

Figure 2.9.3.-1. – Apparatus 1, Basket stirring element
Dimensions in millimetres

Apparatus 2 (Paddle apparatus). Use the assembly from Apparatus 1, except that a paddle formed from a blade and a shaft is used as the stirring element. The shaft is positioned so that its axis is not more than 2 mm from the vertical axis of the vessel, at any point, and rotates smoothly without significant wobble that could affect the results. The vertical center line of the blade passes through the axis of the shaft so that the bottom of the blade is flush with the bottom of the shaft. The paddle conforms to the specifications shown in Figure 2.9.3.-2. The distance of $25 \pm 2\ \text{mm}$ between the bottom of the blade and the inside bottom of the vessel is maintained during

the test. The metallic or suitably inert, rigid blade and shaft comprise a single entity. A suitable two-part detachable design may be used provided the assembly remains firmly engaged during the test. The paddle blade and shaft may be coated with a suitable coating so as to make them inert. The dosage unit is allowed to sink to the bottom of the vessel before rotation of the blade is started. A small, loose piece of non-reactive material, such as not more than a few turns of wire helix, may be attached to dosage units that would otherwise float. An alternative sinker device is shown in Figure 2.9.3.-3. Other validated sinker devices may be used.

Apparatus 3 (Reciprocating cylinder). The assembly consists of a set of cylindrical, flat-bottomed glass vessels; a set of glass reciprocating cylinders; inert fittings (stainless steel type 316 or other suitable material) and screens that are made of suitable nonsorbing and nonreactive material, and that are designed to fit the tops and bottoms of the reciprocating cylinders; a motor and drive assembly to reciprocate the cylinders vertically inside the vessels, and if desired, index the reciprocating cylinders horizontally to a different row of vessels. The vessels are partially immersed in a suitable water-bath of any convenient size that permits holding the temperature at $37 \pm 0.5\ ^\circ\text{C}$ during the test. No part of the assembly, including the environment in which the assembly is placed, contributes significant motion, agitation, or vibration beyond that due to the smooth, vertically reciprocating cylinder. A device is used that allows the reciprocation rate to be selected and maintained at the specified dip rate, within ± 5 per cent. An apparatus that permits observation of the preparations and reciprocating cylinders is preferable. The vessels are provided with an evaporation cap that remains in place for the duration of the test. The components conform to the dimensions shown in Figure 2.9.3.-4 unless otherwise specified.

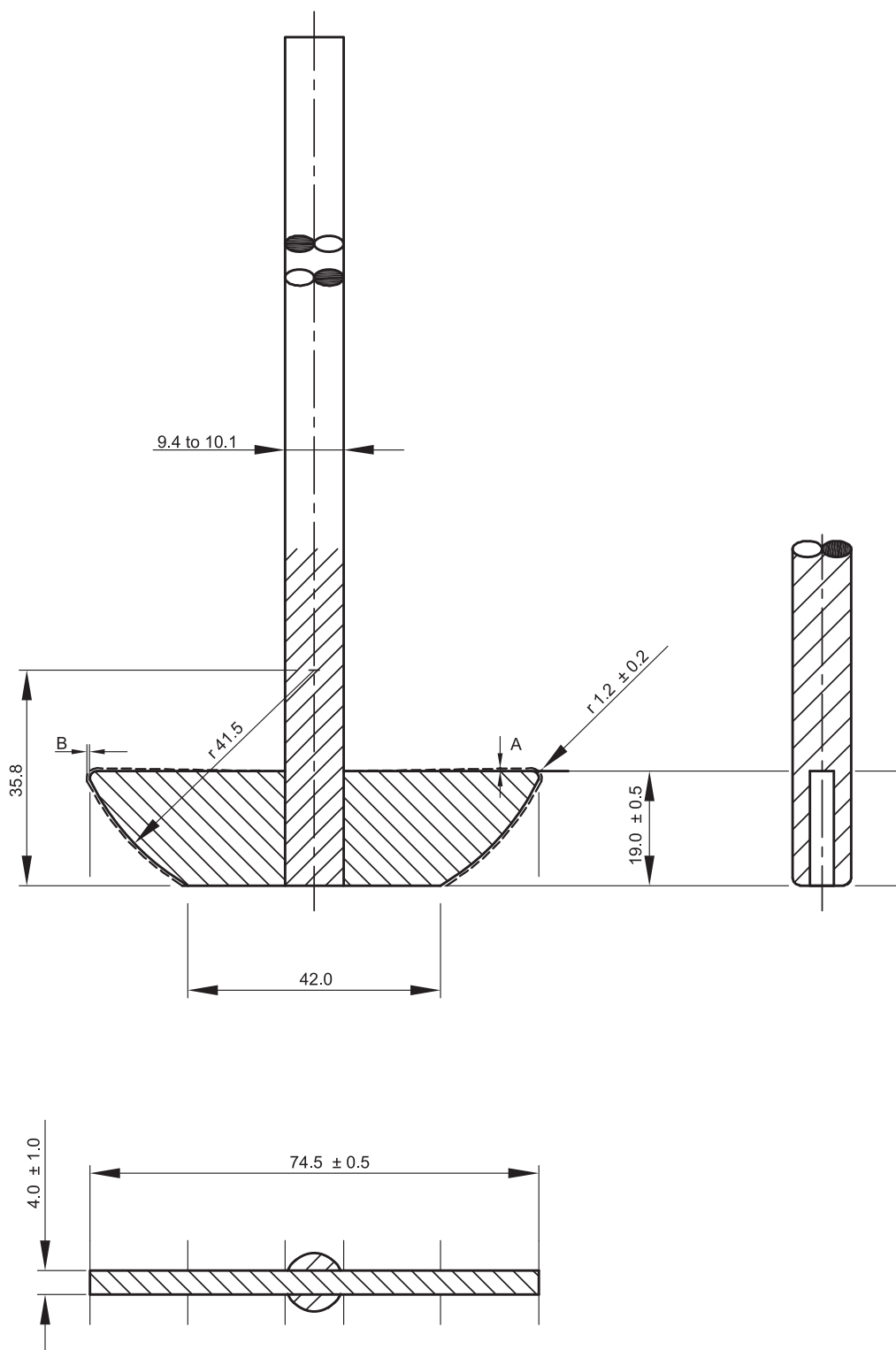
Apparatus 4 (Flow-through cell). The assembly consists of a reservoir and a pump for the dissolution medium; a flow-through cell; a water-bath that maintains the dissolution medium at $37 \pm 0.5\ ^\circ\text{C}$. Use the specified cell size.

The pump forces the dissolution medium upwards through the flow-through cell. The pump has a delivery range between 240 mL/h and 960 mL/h, with standard flow rates of 4 mL/min, 8 mL/min, and 16 mL/min. It must deliver a constant flow (± 5 per cent of the nominal flow rate); the flow profile is sinusoidal with a pulsation of 120 ± 10 pulses/min. A pump without pulsation may also be used. Dissolution test procedures using the flow-through cell must be characterised with respect to rate and any pulsation.

The flow-through cell (see Figures 2.9.3.-5 and 2.9.3.-6) of transparent and inert material is mounted vertically, with a filter system that prevents escape of undissolved particles from the top of the cell; standard cell diameters are 12 mm and 22.6 mm; the bottom cone is usually filled with small glass beads of about 1 mm diameter, with 1 bead of about 5 mm positioned at the apex to protect the fluid entry tube; a tablet holder (see Figures 2.9.3.-5 and 2.9.3.-6) is available for positioning of special dosage forms. The cell is immersed in a water-bath, and the temperature is maintained at $37 \pm 0.5\ ^\circ\text{C}$.

The apparatus uses a clamp mechanism and 2 O-rings for the fixation of the cell assembly. The pump is separated from the dissolution unit in order to shield the latter against any vibrations originating from the pump. The position of the pump must not be on a level higher than the reservoir flasks. Tube connections are as short as possible. Use suitably inert tubing, such as polytetrafluoroethylene, with a 1.6 mm inner diameter and inert flanged-end connections.

Apparatus suitability. The determination of suitability of the apparatus to perform dissolution testing must include conformance to the dimensions and tolerances of the apparatus as given above. In addition, critical test parameters that have to be monitored periodically during use include



A and B dimensions do not vary more than 0.5 mm when part is rotated on center line axis. Tolerances are ± 1.0 mm unless otherwise stated.

Figure 2.9.3.-2. – Apparatus 2, Paddle stirring element
Dimensions in millimetres

volume and temperature of the dissolution medium, rotation speed (Apparatus 1 and 2), dip rate (Apparatus 3), and flow rate of medium (Apparatus 4).

Determine the acceptable performance of the dissolution test assembly periodically.

PROCEDURE

APPARATUS 1 AND 2

Conventional-release solid dosage forms

Procedure. Place the stated volume of the dissolution medium (± 1 per cent) in the vessel of the specified apparatus.

Assemble the apparatus, equilibrate the dissolution medium to 37 ± 0.5 °C, and remove the thermometer. The test may also be carried out with the thermometer in place, provided it is shown that results equivalent to those obtained without the thermometer are obtained.

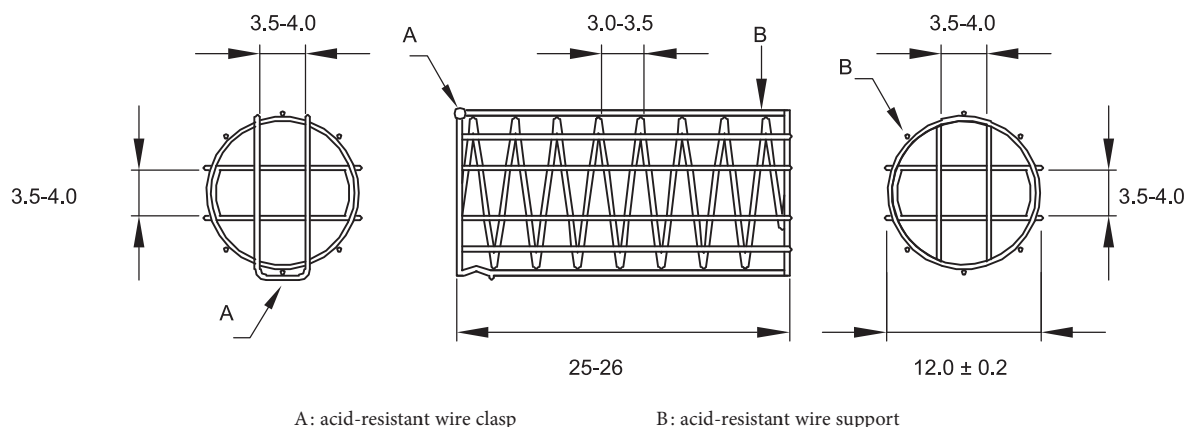


Figure 2.9.3.-3. – Alternative sinker
Dimensions in millimetres

Place 1 dosage unit in the apparatus, taking care to exclude air bubbles from the surface of the dosage unit. Operate the apparatus at the specified rate. Within the time interval specified, or at each of the times stated, withdraw a specimen from a zone midway between the surface of the dissolution medium and the top of the rotating basket or blade, not less than 1 cm from the vessel wall. Where multiple sampling times are specified, replace the aliquots withdrawn for analysis with equal volumes of fresh dissolution medium at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ or, where it can be shown that replacement of the medium is not necessary, correct for the volume change in the calculation. Keep the vessel covered for the duration of the test and verify the temperature of the medium at suitable times. Perform the analysis using a suitable assay method⁽⁴⁾. Repeat the test with additional dosage units.

If automated equipment is used for sampling or the apparatus is otherwise modified, verification that the modified apparatus will produce results equivalent to those obtained with the apparatus described in this chapter, is necessary.

Dissolution medium. A suitable dissolution medium is used. The volume specified refers to measurements made between $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. If the dissolution medium is a buffered solution, adjust the solution so that its pH is within 0.05 units of the specified pH. Dissolved gases can cause bubbles to form, which may change the results of the test. In such cases, dissolved gases must be removed prior to testing⁽⁵⁾.

Time. Where a single time specification is given, the test may be concluded in a shorter period if the requirement for minimum amount dissolved is met. Samples are to be withdrawn only at the stated times, within a tolerance of ± 2 per cent.

Prolonged-release solid dosage forms

Procedure. Proceed as described for conventional-release dosage forms.

Dissolution medium. Proceed as described for conventional-release dosage forms.

Time. The test-time points, generally 3, are expressed in hours.

Delayed-release solid dosage forms

Procedure. Use Method A or Method B.

Method A

- **Acid stage.** Place 750 mL of 0.1 M hydrochloric acid in the vessel, and assemble the apparatus. Allow the medium to equilibrate to a temperature of $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Place

1 dosage unit in the apparatus, cover the vessel and operate the apparatus at the specified rate. After 2 h of operation in 0.1 M hydrochloric acid, withdraw an aliquot of the fluid and proceed immediately as directed under Buffer stage. Perform an analysis of the aliquot using a suitable assay method.

- **Buffer stage.** Complete the operations of adding the buffer and adjusting the pH within 5 min. With the apparatus operating at the rate specified, add to the fluid in the vessel 250 mL of a 0.20 M solution of trisodium phosphate dodecahydrate R that has been equilibrated to $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adjust, if necessary, with 2 M hydrochloric acid R or 2 M sodium hydroxide R to a pH of 6.8 ± 0.05 . Continue to operate the apparatus for 45 min, or for the specified time. At the end of the time period, withdraw an aliquot of the fluid and perform the analysis using a suitable assay method.

Method B

- **Acid Stage.** Place 1000 mL of 0.1 M hydrochloric acid in the vessel and assemble the apparatus. Allow the medium to equilibrate to a temperature of $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Place 1 dosage unit in the apparatus, cover the vessel, and operate the apparatus at the specified rate. After 2 h of operation in 0.1 M hydrochloric acid, withdraw an aliquot of the fluid, and proceed immediately as directed under Buffer stage. Perform an analysis of the aliquot using a suitable assay method.
- **Buffer stage.** For this stage of the procedure use buffer that has previously been equilibrated to a temperature of $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Drain the acid from the vessel and add 1000 mL of pH 6.8 phosphate buffer, prepared by mixing 3 volumes of 0.1 M hydrochloric acid with 1 volume of a 0.20 M solution of trisodium phosphate dodecahydrate R and adjusting, if necessary, with 2 M hydrochloric acid R or 2 M sodium hydroxide R to a pH of 6.8 ± 0.05 . This may also be accomplished by removing from the apparatus the vessel containing the acid and replacing it with another vessel, containing the buffer and transferring the dosage unit to the vessel containing the buffer. Continue to operate the apparatus for 45 min, or for the specified time. At the end of the time period, withdraw an aliquot of the fluid and perform the analysis using a suitable assay method.

Time. All test times stated are to be observed within a tolerance of ± 2 per cent, unless otherwise specified.

(4) Test specimens are filtered immediately upon sampling unless filtration is demonstrated to be unnecessary. Use an inert filter that does not cause adsorption of the active substance or contain extractable substances that would interfere with the analysis.

(5) A method of deaeration is as follows: heat the medium, while stirring gently, to about $41\text{ }^{\circ}\text{C}$, immediately filter under vacuum using a filter having a porosity of $0.45\text{ }\mu\text{m}$ or less, with vigorous stirring, and continue stirring under vacuum for about 5 min. Other validated deaeration techniques for removal of dissolved gases may be used.

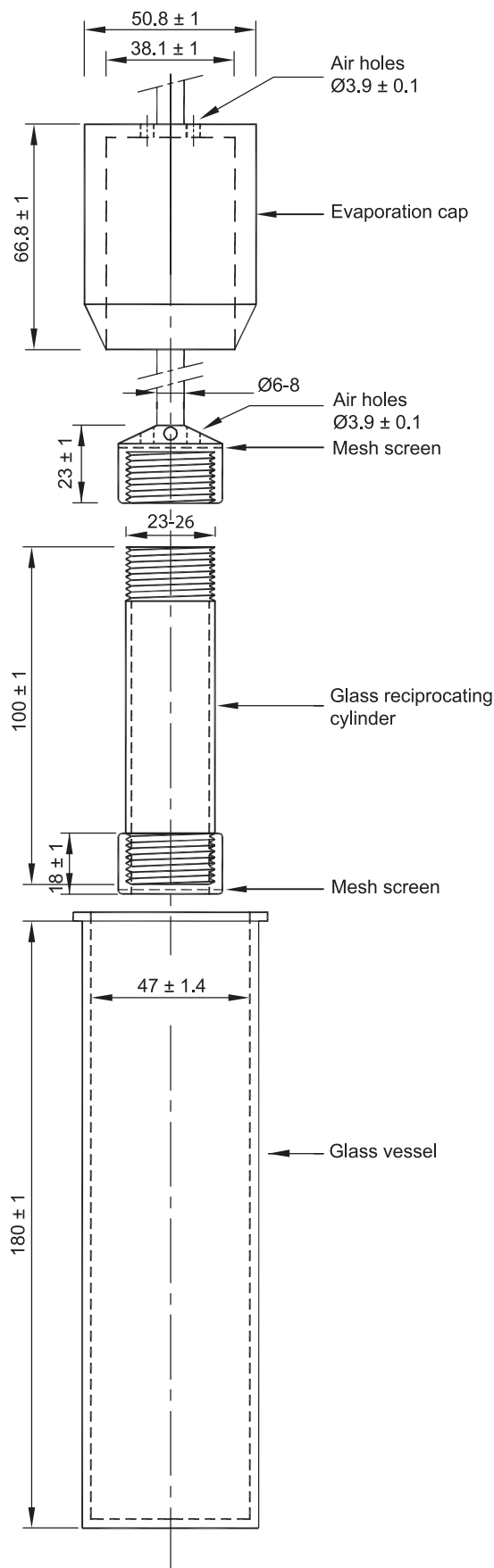


Figure 2.9.3.-4. – Apparatus 3, glass vessel and reciprocating cylinder

Dimensions in millimetres unless otherwise specified

APPARATUS 3

Conventional-release solid dosage forms

Procedure. Place the stated volume of the dissolution medium (± 1 per cent) in each vessel of the apparatus. Assemble the apparatus, equilibrate the dissolution medium to 37 ± 0.5 °C, and remove the thermometer. Place 1 dosage unit in each of the reciprocating cylinders, taking care to exclude air bubbles from the surface of each dosage unit, and immediately operate the apparatus as specified. During the upward and downward stroke, the reciprocating cylinder moves through a total distance of 9.9-10.1 cm. Within the time interval specified, or at each of the times stated, raise the reciprocating cylinders and withdraw a portion of the dissolution medium from a zone midway between the surface of the dissolution medium and the bottom of each vessel. Perform the analysis as directed. If necessary, repeat the test with additional dosage units.

Replace the aliquot withdrawn for analysis with equal volumes of fresh dissolution medium at 37 °C or, where it can be shown that replacement of the medium is not necessary, correct for the volume change in the calculation. Keep the vessel covered with the evaporation cap for the duration of the test and verify the temperature of the medium at suitable times.

Dissolution medium. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

Time. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

Prolonged-release dosage forms

Procedure. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 3.

Dissolution medium. Proceed as described for prolonged-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

Time. Proceed as described for prolonged-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

Delayed-release dosage forms

Procedure. Proceed as described for delayed-release dosage forms, Method B, under Apparatus 1 and 2, using one row of vessels for the acid stage media and the following row of vessels for the buffer stage media, and using the volume of medium specified (usually 300 mL).

Time. Proceed as directed for delayed-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

APPARATUS 4

Conventional-release dosage forms

Procedure. Place the glass beads into the cell specified. Place 1 dosage unit on top of the beads or, if specified, on a wire carrier. Assemble the filter head and fix the parts together by means of a suitable clamping device. Introduce by the pump the dissolution medium warmed to 37 ± 0.5 °C through the bottom of the cell to obtain the flow rate specified and measured with an accuracy of 5 per cent. Collect the eluate by fractions at each of the times stated. Perform the analysis as directed. Repeat the test with additional dosage units.

Dissolution medium. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

Time. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

Prolonged-release dosage forms

Procedure. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 4.

Dissolution medium. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 4.

Time. Proceed as described for conventional-release dosage forms under Apparatus 4.

Delayed-release dosage forms

Procedure. Proceed as described for delayed-release dosage forms under Apparatus 1 and 2, using the specified media.

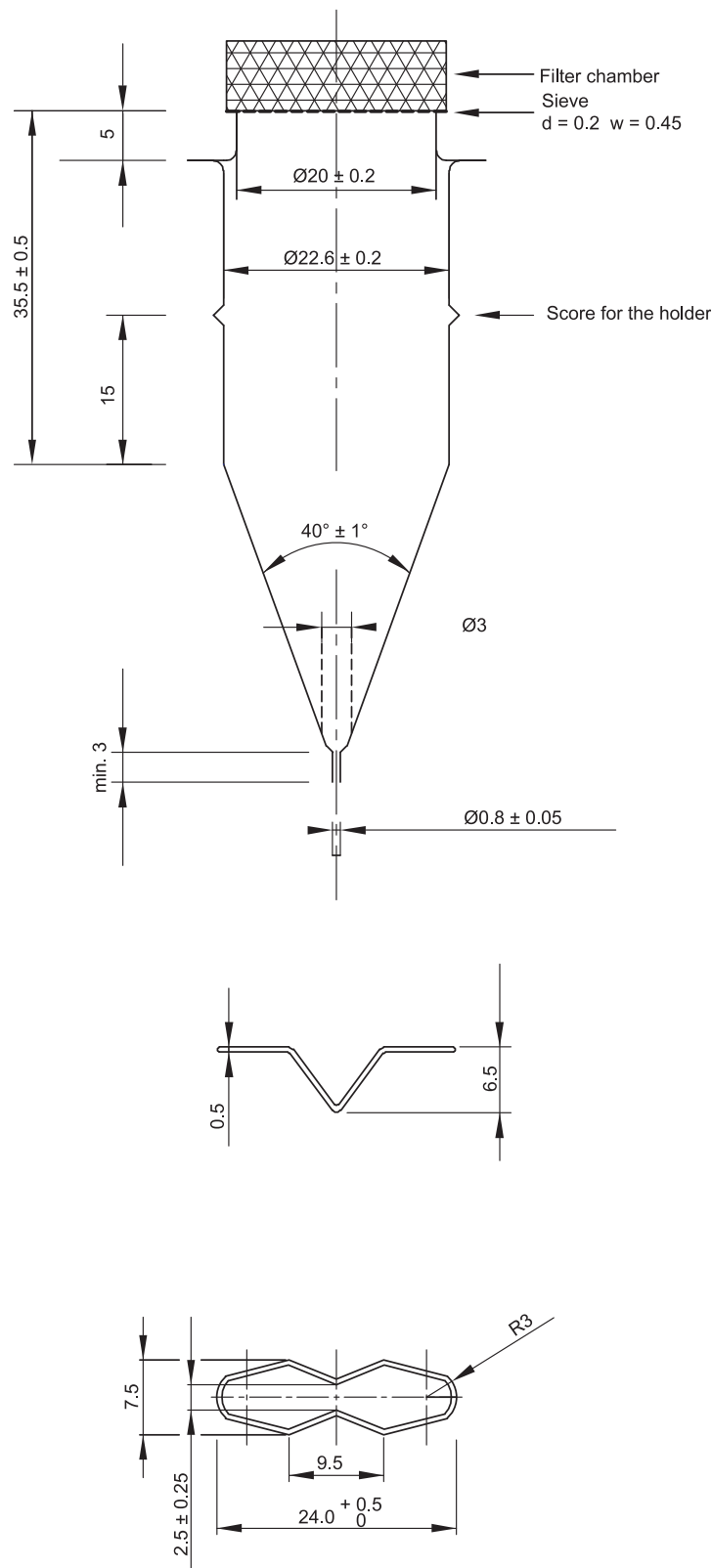


Figure 2.9.3.-5. – Apparatus 4, large cell for tablets and capsules (top), tablet holder for the large cell (bottom)
Dimensions in millimetres unless otherwise specified

Time. Proceed as described for delayed-release dosage forms under Apparatus 1 and 2.

INTERPRETATION

Conventional-release solid dosage forms

Unless otherwise specified, the requirements are met if the quantities of active substance dissolved from the dosage units

tested conform to Table 2.9.3.-1. Continue testing through the 3 levels unless the results conform at either S_1 or S_2 . The quantity Q , is the specified amount of dissolved active substance, expressed as a percentage of the labelled content; the 5 per cent, 15 per cent, and 25 per cent values in the Table are percentages of the labelled content so that these values and Q are in the same terms.

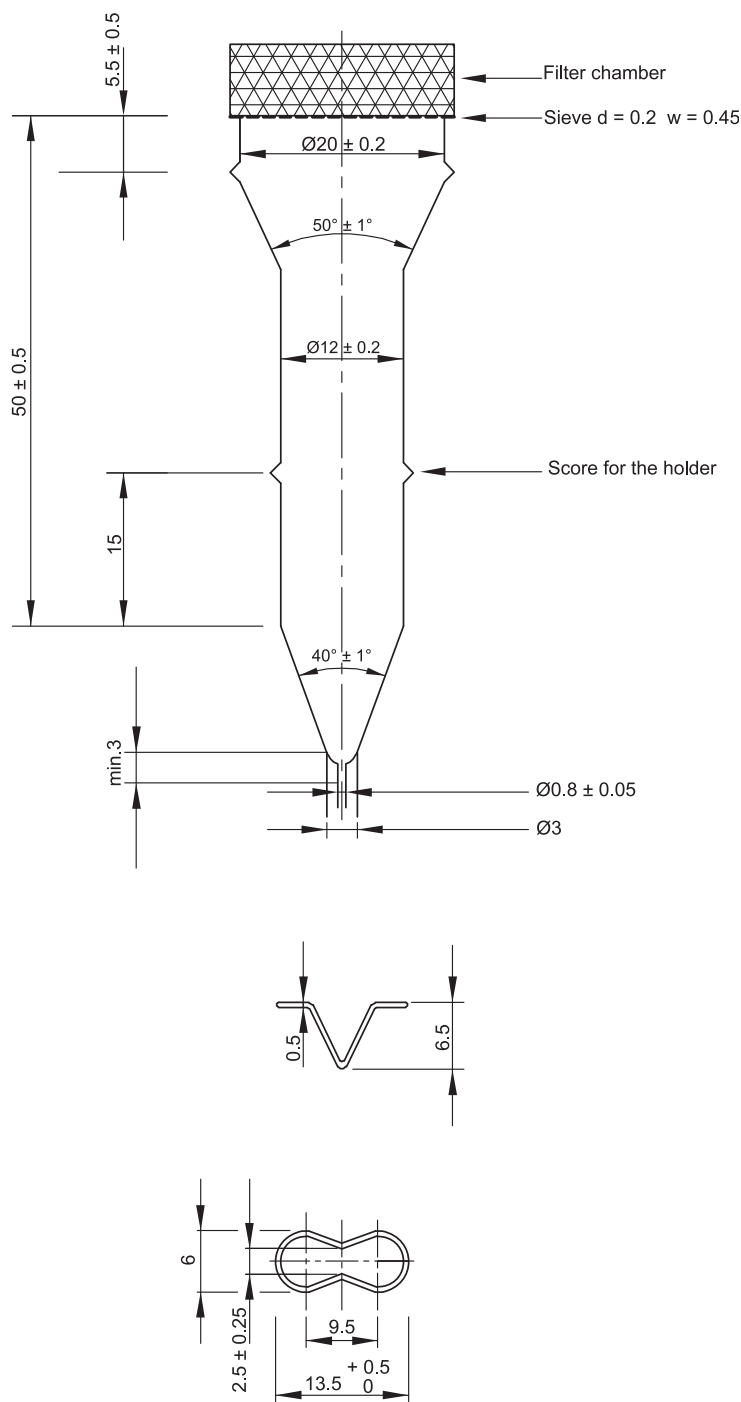


Figure 2.9.3.-6. – Apparatus 4, small cell for tablets and capsules (top), tablet holder for the small cell (bottom)
Dimensions in millimetres unless otherwise specified

Table 2.9.3.-1

Level	Number tested	Acceptance criteria
S_1	6	Each unit is not less than $Q + 5$ per cent.
S_2	6	Average of 12 units ($S_1 + S_2$) is equal to or greater than Q , and no unit is less than $Q - 15$ per cent.
S_3	12	Average of 24 units ($S_1 + S_2 + S_3$) is equal to or greater than Q , not more than 2 units are less than $Q - 15$ per cent, and no is less than $Q - 25$ per cent.

Prolonged-release dosage forms

Unless otherwise specified, the requirements are met if the quantities of active substance dissolved from the dosage units tested conform to Table 2.9.3.-2. Continue testing through the 3 levels unless the results conform at either L_1 or L_2 . Limits on the amounts of active substance dissolved are expressed in terms of the percentage of labelled content. The limits embrace each value of Q_n , the amount dissolved at each specified fractional dosing interval. Where more than one range is specified, the acceptance criteria apply individually to each range.

Table 2.9.3.-2

Level	Number tested	Acceptance criteria
L_1	6	No individual value lies outside each of the stated ranges and no individual value is less than the stated amount at the final test time.
L_2	6	The average value of the 12 units ($L_1 + L_2$) lies within each of the stated ranges and is not less than the stated amount at the final test time; none is more than 10 per cent of labelled content outside each of the stated ranges; and none is more than 10 per cent of labelled content below the stated amount at the final test time.
L_3	12	The average value of the 24 units ($L_1 + L_2 + L_3$) lies within each of the stated ranges, and is not less than the stated amount at the final test time; not more than 2 of the 24 units are more than 10 per cent of labelled content outside each of the stated ranges; not more than 2 of the 24 units are more than 10 per cent of labelled content below the stated amount at the final test time; and none of the units is more than 20 per cent of labelled content outside each of the stated ranges or more than 20 per cent of labelled content below the stated amount at the final test time.

Delayed-release dosage forms

Acid stage. Unless otherwise specified, the requirements of this portion of the test are met if the quantities, based on the percentage of the labelled content of active substance dissolved from the units tested conform to Table 2.9.3.-3. Continue testing through the 3 levels unless the results of both acid and buffer stages conform at an earlier level.

Table 2.9.3.-3

Level	Number tested	Acceptance criteria
A_1	6	No individual value exceeds 10 per cent dissolved.
A_2	6	The average value of the 12 units ($A_1 + A_2$) is not more than 10 per cent dissolved, and no individual unit is greater than 25 per cent dissolved.
A_3	12	The average value of the 24 units ($A_1 + A_2 + A_3$) is not more than 10 per cent dissolved, and no individual unit is greater than 25 per cent dissolved.

Buffer stage. Unless otherwise specified, the requirements are met if the quantities of active substance dissolved from the units tested conform to Table 2.9.3.-4. Continue testing through the 3 levels unless the results of both stages conform at an earlier level. The value of Q in Table 2.9.3.-4 is 75 per cent dissolved unless otherwise specified. The quantity, Q , is the specified total amount of active substance dissolved in both the acid and buffer stages, expressed as a percentage of the labelled content. The 5 per cent, 15 per cent and 25 per cent values in the Table are percentages of the labelled content so that these values and Q are in the same terms.

Table 2.9.3.-4

Level	Number tested	Acceptance criteria
B_1	6	No unit is less than $Q + 5$ per cent.
B_2	6	The average value of the 12 units ($B_1 + B_2$) is equal to or greater than Q , and no unit is less than $Q - 15$ per cent.
B_3	12	The average value of the 24 units ($B_1 + B_2 + B_3$) is equal to or greater than Q , not more than 2 units are less than $Q - 15$ per cent, and no unit is less than $Q - 25$ per cent.

Recommendations on dissolution testing are given in general chapter 5.17.1.

ANEXO 5. Test de parestesia

Q1: Intensidad de la sensación

VAS

0 min

Momento exacto de aparición parestesia:

Marque con una línea vertical el lugar en la escala que mejor refleje la Intensidad con la que percibes sensaciones inusuales en este momento.



Q2-Q3: Sensación inusual

ISS & QLSI

A) Intensidad (ISS)

Estimar la intensidad global de tus percepciones sensoriales en este mismo instante. Marca una de las cajas con X

<input type="checkbox"/>	inaguantable
<input type="checkbox"/>	Muy muy intenso
<input type="checkbox"/>	Muy intenso
<input type="checkbox"/>	intenso
<input type="checkbox"/>	Media, moderado
<input type="checkbox"/>	débil
<input type="checkbox"/>	Muy débil
<input type="checkbox"/>	Muy muy débil
<input type="checkbox"/>	ausente

B) Descripción (QSI)

Qué términos coinciden mejor con la naturaleza de tus sensaciones en este instante? Encierra en un círculo (O) la puntuación que mejor se ajuste a la intensidad percibida (0 = ausente ... 4 = extremadamente fuerte).

0 1 2 3 4	<i>Añiles y agujas.</i>
0 1 2 3 4	<i>Cosquileo y picazón</i>
0 1 2 3 4	<i>Estremecimiento y escalofríos.</i>
0 1 2 3 4	<i>Hipersensibilidad táctil, irritación.</i>
0 1 2 3 4	<i>Entumecimiento, insensibilidad</i>
0 1 2 3 4	<i>Dolor</i>
0 1 2 3 4	Otros?.....

C) Temporalidad

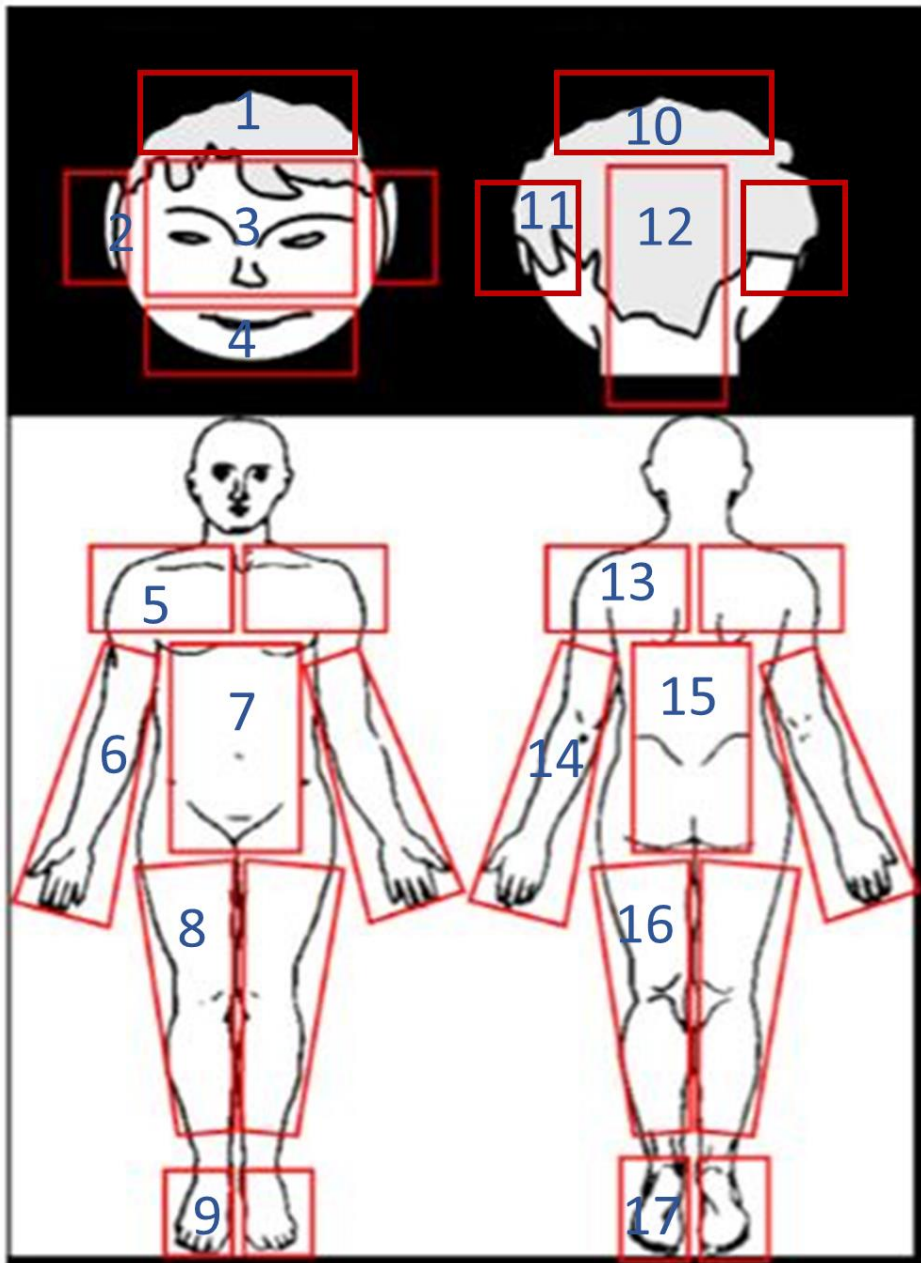
Tu sensación dominante en este el instante es? Marque solo una casilla con una X

<input type="checkbox"/>	breve, transitoria, momentáneo
<input type="checkbox"/>	rítmica, periódica, intermitente, oscilante
<input type="checkbox"/>	continua, constante, regular, sostenida

D) Profundidad

La ubicación de las sensaciones es más bien... (Marque solo una X).

- EXTERNA
- INTERNA



ANEXO 6. Hoja de consentimiento informado.**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo,, con
DNI:.....

DECLARO:

Haber sido informado/a del estudio y procedimientos de la investigación del Proyecto titulado: **Biodisponibilidad Sanguínea y en Orina de un Suplemento de β -Alanina.**

Los investigadores que van a acceder a mis datos personales y a los resultados de las pruebas son: **Francisco Javier López Román, Vicente Ávila Gandía, Antonio Jesús Luque Rubia, Antonio Martínez Garrido, Lydia de Salazar Sánchez-Ferragut, Antonio Torregrosa García, María Querol Calderón, Silvia Pérez Piñero y Desirée Victoria Montesinos.**

Asimismo, he podido hacer preguntas del estudio, comprendiendo que me presto de forma voluntaria al mismo y que en cualquier momento puedo abandonarlo sin que me suponga perjuicio de ningún tipo.

CONSIENTO:

1.-) Someterme a las siguientes pruebas exploratorias (en su caso):

- **Extracción sanguínea.**

- **Bioimpedancia.**

- **Talla.**

2.-) Realizar Test de parestesia.

3.-) Realizar las pautas de suplementación.

4.-) El uso de los datos obtenidos según lo indicado en el párrafo siguiente:

En cumplimiento del Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, Real Decreto-Ley 5/2018, de 27 de julio y Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones a las que se va a someter pasará a formar parte del fichero automatizado INVESALUD, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN LAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO CIENCIAS EXPERIMENTALES Y CIENCIAS DE LA SALUD. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.

En Guadalupe (Murcia) a de de 20

El investigador,

Fdo:.....

Fdo:.....

ANEXO 7. Comité de Ética de Investigación de la Universidad Católica de Murcia
(código CE021902)

DATOS DEL PROYECTO

Título:	"Biodisponibilidad sanguínea y en orina de un suplemento de β -Alanina"	
Investigador Principal	Nombre	Correo-e
Dr.	Francisco Javier López Román	jlroman@ucam.edu

INFORME DEL COMITÉ

Fecha	01/02/2019	Código	CE021902
--------------	------------	---------------	----------

Tipo de Experimentación

Investigación experimental clínica con seres humanos	X
Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, tejidos embrionarios o fetales	X
Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos	
Investigación observacional con seres humanos, psicológica o comportamental en humanos	
Uso de datos personales, información genética, etc.	X
Experimentación animal	
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas	
Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs)	

Comentarios Respecto al Tipo de Experimentación

Nada Obsta

Comentarios Respecto a la Metodología de Experimentación

Nada Obsta



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

Sugerencias al Investigador

--

A la vista de la solicitud de informe adjunto por el Investigador y de las recomendaciones anteriormente expuestas el dictamen del Comité es:

Emitir Informe Favorable	X
Emitir Informe Desfavorable	
Emitir Informe Favorable condicionado a Subsanación	

MOTIVACIÓN

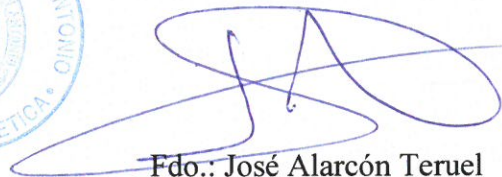
Incrementará conocimientos en su área

Vº Bº El Presidente,



Fdo.: José Alberto Cánovas Sánchez

El Secretario,

Fdo.: José Alarcón Teruel

ANEXO 8. .Certificados de análisis de β -ALA de distintos tamaños.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS (Beta-alanina 40 mesh)

Nombre del producto:	BETA ALANINA		
Lote número	SH181102-40		
Fecha de fabricación	20/12/2018		
Fecha de Re-test	20/12/2020		
Nº CAS	107-95-9		
Fórmula molecular	C ₃ H ₇ NO ₂		
<u>Test</u>	<u>Especificación</u>	<u>Resultado</u>	<u>Métodos</u>
Apariencia	Cristal/polvo cristalino	Conforme	Organoléptico
Color	Blanco/blanquecino	Conforme	Organoléptico
Aroma	Característico	Conforme	Organoléptico
Sabor	Característico	Conforme	Organoléptico
Identificación	Positivo	Conforme	FTIR
Tamaño de partícula	Pasan a través de 40 Mesh	Conforme	Torre tamices
Ensayo (como sustancia seca)	98.0-101.0%	98.9%	HPLC
Pérdida de humedad	Max 0.30%	0.06%	Gravimetría
Transmitancia	Min 95%	>95%	Espectrofotometría UV-Vis
Cloro	Max 0.04%	<0.04%	ICP
Amonio	Max 0.02%	<0.02%	ICP
Sulfatos	Max 0.048%	<0.048%	ICP
Metales pesados	Max 10ppm	Conforme	ICP
Plomo (Pb)	Max 3ppm	<3ppm	ICP
Cadmio (Cd)	Max 1ppm	<1ppm	ICP
Arsénico (As)	Max 1ppm	<1ppm	ICP
Mercurio (Hg)	Max 0.1ppm	<0.1ppm	ICP
Hierro	Max 30 ppm	<30 ppm	ICP
Microorganismos aeróbicos totales	Max 5000 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
Levaduras & Mohos	Max 100 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
<i>E. coli</i>	<10 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
<i>Salmonella</i>	Negativo in 25 g	Conforme	Recuento en placas

Este certificado es una transcripción de los datos de nuestro proveedor.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS (Beta-alanina 100 mesh)**Nombre del producto: BETA ALANINA**

Lote número SH181102-100

Fecha de fabricación 20/12/2018

Fecha de Re-test 20/12/2020

Nº CAS 107-95-9

Fórmula molecular C₃H₇NO₂

Test	Especificación	Resultado	Métodos
Apariencia	Cristal/polvo cristalino	Conforme	Organoléptico
Color	Blanco/blanquecino	Conforme	Organoléptico
Aroma	Característico	Conforme	Organoléptico
Sabor	Característico	Conforme	Organoléptico
Identificación	Positivo	Conforme	FTIR
Tamaño de partícula	Pasan a través de 100 Mesh	Conforme	Torre tamices
Ensayo (como sustancia seca)	98.0-101.0%	99.0%	HPLC
Pérdida de humedad	Max 0.30%	0.05%	Gravimetría
Transmitancia	Min 95%	>95%	Espectofotometría UV-Vis
Cloro	Max 0.04%	<0.04%	ICP
Amonio	Max 0.02%	<0.02%	ICP
Sulfatos	Max 0.048%	<0.048%	ICP
Metales pesados	Max 10ppm	Conforme	ICP
Plomo (Pb)	Max 3ppm	<3ppm	ICP
Cadmio (Cd)	Max 1ppm	<1ppm	ICP
Arsénico (As)	Max 1ppm	<1ppm	ICP
Mercurio (Hg)	Max 0.1ppm	<0.1ppm	ICP
Hierro	Max 30 ppm	<30 ppm	ICP
Microorganismos aeróbicos totales	Max 5000 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
Levaduras & Mohos	Max 100 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
<i>E. coli</i>	<10 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
<i>Salmonella</i>	Negativo in 25 g	Conforme	Recuento en placas

Este certificado es una transcripción de los datos de nuestro proveedor.

CERTIFICADO DE ANÁLISIS (Beta-alanina 200 mesh)

Nombre del producto:	BETA ALANINA		
Lote número	SH181102-200		
Fecha de fabricación	20/12/2018		
Fecha de Re-test	20/12/2020		
Nº CAS	107-95-9		
Fórmula molecular	C ₃ H ₇ NO ₂		
<u>Test</u>	<u>Especificación</u>	<u>Resultado</u>	<u>Métodos</u>
Apariencia	Cristal/polvo cristalino	Conforme	Organoléptico
Color	Blanco/blanquecino	Conforme	Organoléptico
Aroma	Característico	Conforme	Organoléptico
Sabor	Característico	Conforme	Organoléptico
Identificación	Positivo	Conforme	FTIR
Tamaño de partícula	Pasan a través de 200 Mesh	Conforme	Torre tamices
Ensayo (como sustancia seca)	98.0-101.0%	99%	HPLC
Pérdida de humedad	Max 0.30%	0.06%	Gravimetría
Transmitancia	Min 95%	>95%	Espectofotometría UV-Vis
Cloro	Max 0.04%	<0.04%	ICP
Amonio	Max 0.02%	<0.02%	ICP
Sulfatos	Max 0.048%	<0.048%	ICP
Metales pesados	Max 10ppm	Conforme	ICP
Plomo (Pb)	Max 3ppm	<3ppm	ICP
Cadmio (Cd)	Max 1ppm	<1ppm	ICP
Arsénico (As)	Max 1ppm	<1ppm	ICP
Mercurio (Hg)	Max 0.1ppm	<0.1ppm	ICP
Hierro	Max 30 ppm	<30 ppm	ICP
Microorganismos aeróbicos totales	Max 5000 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
Levaduras & Mohos	Max 100 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
<i>E. coli</i>	<10 ufc/g	Conforme	Recuento en placas
<i>Salmonella</i>	Negativo in 25 g	Conforme	Recuento en placas

Este certificado es una transcripción de los datos de nuestro proveedor.

ANEXO 9. Concentración plasmática por sujetos del resto de aminoácidos después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL) y formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

ÁCIDO ASPÁRTICO

Concentración plasmática por sujetos de Ácido Aspártico después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Ácido Aspártico (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	1,00	-	0,69	1,02	0,89	1,19	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,17
30	2,25	-	0,69	2,79	1,00	1,00	1,00	1,25	1,12	1,00	1,00	1,26
60	1,00	-	1,34	1,05	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,45
90	1,00	-	2,88	0,57	1,19	1,05	1,00	1,00	1,00	3,37	1,00	1,35
120	1,00	-	0,99	0,51	0,69	1,41	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,22
150	1,00	-	1,70	0,88	1,00	1,04	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,77
180	1,05	-	0,85	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
210	1,50	-	0,65	0,96	0,52	1,02	4,37	1,00	1,00	1,00	1,00	1,46
240	1,00	-	0,88	1,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,18
300	1,00	-	0,69	0,55	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
360	2,14	-	1,01	0,57	0,44	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,03
420	1,18	-	0,60	0,60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,93
480	1,00	-	0,59	0,94	0,51	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,63

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Ácido Aspártico después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Ácido Aspártico (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	0,59	-	1,05	1,00	1,11	0,64	1,00	1,00	1,00	1,00	1,91	1,77
30	0,80	-	1,45	1,00	1,00	0,76	1,00	1,00	1,00	1,83	1,00	1,70
60	0,85	-	1,00	1,25	1,00	1,32	1,00	7,68	1,00	1,23	1,00	4,40
90	0,65	-	1,00	1,00	1,77	0,73	1,00	1,00	1,00	1,73	1,00	2,60
120	0,48	-	4,04	1,00	1,00	0,52	1,00	1,00	1,00	1,45	1,00	1,53
150	0,47	-	1,04	1,93	1,00	0,58	1,00	1,00	1,00	1,27	1,00	1,33
180	0,71	-	1,00	1,00	1,00	0,69	1,00	1,00	1,00	1,48	1,00	1,02
210	0,67	-	1,00	1,42	1,10	0,70	1,00	1,00	**	1,44	1,00	1,18
240	0,47	-	1,00	4,73	1,00	0,85	1,00	1,00	1,00	1,17	1,00	2,68
300	0,54	-	1,00	4,47	1,00	0,70	1,00	1,00	1,00	1,62	1,55	1,23
360	1,03	-	1,00	1,16	1,00	1,02	1,00	1,00	1,00	1,84	1,00	1,38
420	0,68	-	1,00	1,06	1,11	0,97	6,60	1,00	1,00	1,25	1,00	1,04
480	0,49	-	1,00	1,00	1,00	0,54	1,00	1,00	1,00	1,00	**	1,27

*El sujeto no acudió a la segunda visita; **Muestra no tomada.

TREONINA

Concentración plasmática por sujetos de Treonina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Treonina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	154,56	-	94,36	137,83	187,31	160,90	127,01	88,89	120,75	84,61	230,58	137,22
30	189,08	-	103,48	187,33	183,57	183,58	109,93	103,31	109,59	117,71	172,07	120,81
60	181,63	-	105,08	193,42	184,33	205,93	133,16	138,71	88,54	122,21	189,97	142,37
90	167,86	-	107,00	125,58	261,88	165,40	114,48	100,12	97,99	118,53	183,51	117,19
120	113,58	-	43,77	143,94	135,07	126,56	112,19	100,26	83,85	139,46	146,12	114,36
150	138,97	-	88,16	129,72	156,99	112,25	103,38	76,60	112,04	127,15	154,32	123,37
180	163,28	-	86,89	125,97	188,92	164,92	112,55	98,76	72,12	127,15	133,64	132,38
210	135,66	-	80,04	122,84	266,68	183,62	89,94	88,84	167,02	131,38	139,17	100,19
240	122,38	-	105,22	248,05	158,99	163,30	100,98	104,82	83,78	100,19	123,04	119,87
300	105,02	-	88,51	107,64	162,00	224,92	74,28	72,66	103,39	67,78	121,92	106,07
360	116,30	-	92,38	111,91	134,45	107,27	62,30	101,82	88,19	88,81	114,75	96,05
420	92,78	-	85,32	110,66	142,99	92,77	53,02	100,06	84,19	88,91	112,11	203,98
480	150,66	-	63,11	96,88	112,23	127,76	63,37	110,99	65,23	92,36	107,19	120,57

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Treonina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Treonina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	186,26	-	171,72	170,82	166,44	158,26	60,79	88,89	105,19	170,04	214,91	135,43
30	183,91	-	141,89	166,70	208,39	167,86	63,88	93,93	103,13	152,64	212,90	165,50
60	140,00	-	127,03	145,04	174,93	210,92	86,65	122,94	110,67	126,70	123,52	233,86
90	130,05	-	154,21	173,63	198,01	163,28	85,99	92,13	114,91	182,04	127,27	198,70
120	126,41	-	158,44	112,03	132,64	170,75	120,85	132,21	116,10	153,69	114,56	172,28
150	116,30	-	176,32	147,75	186,14	165,47	73,38	85,45	237,71	167,10	118,47	128,90
180	125,21	-	119,27	117,69	202,63	122,34	119,29	88,40	87,12	125,57	113,50	138,19
210	169,20	-	162,15	136,47	163,06	146,84	94,21	138,19	**	104,55	157,27	97,98
240	161,61	-	161,11	121,40	162,44	122,02	104,90	119,44	92,30	115,90	118,03	170,42
300	119,28	-	171,23	115,37	179,47	157,17	113,41	139,91	93,18	170,96	133,14	115,08
360	131,02	-	119,21	118,20	119,75	78,99	108,60	89,06	104,14	118,58	91,19	177,10
420	108,11	-	143,14	76,30	151,79	100,34	98,31	71,22	93,55	84,53	183,87	130,20
480	96,42	-	142,80	115,24	174,63	91,14	93,10	95,08	94,37	111,31	**	123,98

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

SERINA

Concentración plasmática por sujetos de Serina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Serina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	114,58	-	88,52	126,19	129,37	119,83	107,34	90,90	188,26	93,93	118,15	117,45
30	128,02	-	87,53	158,42	113,37	143,00	104,64	87,88	132,73	96,83	108,23	116,67
60	128,37	-	103,63	136,67	132,07	130,43	110,95	149,96	130,65	107,79	105,24	137,41
90	112,58	-	115,39	99,44	130,01	114,68	100,98	110,71	134,82	101,66	106,65	109,42
120	106,89	-	45,05	101,18	104,03	105,82	110,88	118,31	111,14	98,03	96,94	99,68
150	97,19	-	102,11	105,18	115,73	96,74	89,48	97,31	111,92	110,29	101,25	109,37
180	95,76	-	82,84	98,72	132,01	96,07	105,70	122,53	141,05	101,98	104,96	114,95
210	101,00	-	82,59	99,05	114,29	93,24	73,86	100,21	270,93	101,99	95,03	113,25
240	102,73	-	87,60	136,93	113,84	111,01	88,00	110,43	108,98	107,83	94,33	100,58
300	114,15	-	116,53	93,53	108,77	97,41	73,75	94,59	104,62	92,01	97,14	97,90
360	112,77	-	97,25	85,10	90,55	128,42	85,88	95,32	94,96	78,71	92,50	102,24
420	106,97	-	100,97	96,47	87,22	87,25	98,15	86,52	101,91	67,78	97,25	151,89
480	110,36	-	73,52	76,32	85,75	112,37	80,62	86,26	97,60	83,89	99,25	136,91

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Serina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Serina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	150,94	-	106,77	86,12	139,11	129,53	74,39	102,64	160,11	148,24	235,98	149,91
30	128,32	-	100,85	85,76	103,68	176,12	105,76	81,09	122,77	153,63	182,52	145,73
60	132,22	-	80,30	75,58	97,29	229,86	99,48	97,90	121,48	115,06	87,66	201,21
90	131,40	-	104,46	95,56	110,26	148,92	85,25	91,91	128,63	181,36	108,69	212,58
120	110,06	-	101,93	90,16	81,33	153,43	137,82	62,96	120,05	171,43	112,00	117,68
150	111,12	-	92,83	112,21	104,84	166,01	102,01	90,14	139,68	149,79	121,20	112,91
180	108,84	-	128,59	83,89	84,21	136,65	123,56	103,88	101,33	129,84	108,31	124,80
210	104,36	-	78,23	86,67	86,88	111,40	104,59	111,11	**	105,06	152,63	101,92
240	139,20	-	111,87	116,12	99,47	146,65	117,06	92,56	115,34	103,00	103,68	167,37
300	124,65	-	103,06	109,79	100,77	141,69	108,36	65,93	134,63	140,66	160,15	120,17
360	143,01	-	66,75	89,06	84,38	91,69	116,70	87,95	101,41	142,14	80,15	169,27
420	104,34	-	109,75	78,81	117,87	109,14	110,31	58,07	90,16	85,53	187,62	122,68
480	103,98	-	113,68	63,73	102,77	123,21	112,09	101,19	101,86	89,14	**	92,72

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

ASPARAGINA

Concentración plasmática por sujetos de Asparagina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Asparagina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	45,57	-	55,21	80,80	98,45	63,99	49,69	68,23	92,30	46,49	154,00	71,51
30	61,17	-	76,94	153,85	120,49	62,68	75,33	82,11	73,31	82,87	127,53	49,91
60	87,20	-	72,08	109,53	121,99	123,81	49,60	106,04	82,69	64,64	108,32	80,18
90	72,51	-	112,42	74,91	122,92	76,33	53,03	70,88	69,09	69,82	76,51	17,50
120	46,22	-	40,25	77,98	88,70	69,10	51,14	67,16	64,18	53,11	82,97	19,98
150	74,74	-	69,02	100,29	90,83	72,23	66,93	101,65	65,17	77,76	105,33	56,65
180	49,62	-	55,94	106,86	102,54	65,81	58,07	69,91	69,59	63,56	115,02	68,09
210	55,79	-	61,53	66,99	82,70	45,60	60,45	42,25	143,51	64,10	76,65	42,79
240	69,50	-	88,37	154,10	79,03	56,62	53,91	90,09	80,07	79,25	78,90	23,34
300	53,06	-	79,45	85,55	78,26	60,90	66,33	69,51	83,92	76,12	97,32	66,77
360	67,92	-	93,34	89,40	76,55	101,00	82,34	88,62	83,83	90,48	67,91	57,17
420	61,21	-	93,67	67,69	85,22	84,52	48,20	100,26	70,15	79,60	89,39	81,89
480	85,68	-	84,10	55,36	84,71	65,68	50,79	87,51	49,86	82,83	92,96	75,24

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Asparagina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Asparagina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	83,13	-	49,70	67,31	58,30	70,50	40,85	42,09	155,90	88,16	128,00	77,88
30	80,07	-	53,53	45,46	53,17	120,23	57,81	61,46	91,54	70,04	135,60	64,89
60	75,54	-	65,44	65,05	46,78	169,17	70,50	65,98	142,33	86,13	51,04	137,21
90	76,94	-	50,63	88,95	94,05	111,53	59,77	59,27	112,64	149,11	20,09	133,71
120	70,94	-	57,84	62,39	91,35	136,30	64,39	47,69	133,48	38,67	55,02	19,59
150	72,39	-	45,25	118,15	55,83	101,60	43,25	68,78	152,32	130,45	53,07	69,96
180	92,66	-	67,66	69,28	49,33	84,89	51,21	78,65	113,03	54,52	67,79	57,22
210	73,05	-	43,46	43,88	59,04	92,91	45,26	95,88	**	92,02	93,78	61,80
240	87,60	-	92,36	92,16	98,96	86,64	44,28	72,94	102,59	23,10	100,07	100,86
300	89,40	-	72,33	77,04	82,83	100,32	46,53	41,02	164,17	161,44	61,20	59,14
360	146,85	-	53,25	55,15	86,05	61,67	49,17	87,14	150,95	138,69	57,32	84,43
420	123,59	-	174,35	84,04	79,50	95,16	37,23	62,86	157,52	64,70	134,64	51,62
480	79,85	-	70,72	90,81	64,66	81,97	45,93	108,68	174,23	63,57	**	56,93

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

ÁCIDO GLUTÁMICO

Concentración plasmática por sujetos de Ácido Glutámico después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Ácido Glutámico (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	51,60	-	63,23	77,65	37,58	52,56	68,99	86,09	101,31	61,61	93,78	115,32
30	75,52	-	56,92	136,95	29,27	37,22	56,93	106,14	84,16	58,93	78,06	62,94
60	49,29	-	47,85	63,31	35,94	92,11	42,32	155,09	64,77	82,40	54,22	180,27
90	54,11	-	94,44	61,33	43,67	52,86	52,32	103,85	101,21	71,41	57,47	142,94
120	48,63	-	39,87	51,47	45,46	41,62	50,79	105,11	74,58	62,95	56,75	110,28
150	66,48	-	64,99	54,70	76,22	52,99	25,41	110,56	93,48	88,34	53,22	74,68
180	45,35	-	42,99	41,08	67,80	39,52	50,11	84,88	72,65	109,00	62,12	114,48
210	43,63	-	36,69	60,48	60,69	40,33	40,38	120,09	140,33	80,45	71,80	69,76
240	43,29	-	48,64	62,65	56,33	38,68	68,14	95,96	89,48	57,01	69,43	106,67
300	43,64	-	48,69	55,86	54,93	38,54	78,52	98,80	65,60	66,71	65,22	112,06
360	50,94	-	71,70	47,03	41,14	50,07	70,69	72,18	62,36	81,35	61,97	120,20
420	35,59	-	69,90	48,74	39,74	45,88	35,27	86,11	87,42	98,27	63,20	139,43
480	53,76	-	47,49	46,25	27,57	40,50	64,30	80,62	85,41	106,31	67,91	155,16

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Ácido Glutámico después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Ácido Glutámico (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	51,10	-	34,75	66,75	46,90	49,30	46,89	63,49	91,29	167,85	75,38	146,51
30	51,31	-	40,71	34,80	33,41	116,88	69,99	42,08	47,36	101,58	106,28	130,77
60	44,02	-	50,66	58,98	30,83	76,84	83,83	64,26	45,78	117,36	81,77	248,09
90	54,90	-	46,47	121,46	54,20	57,08	65,33	65,61	56,46	179,73	100,20	258,44
120	32,08	-	62,04	43,99	64,93	50,89	109,33	26,47	31,49	167,00	53,09	159,03
150	37,57	-	22,66	53,16	41,15	50,89	78,07	65,84	58,28	181,21	78,38	101,22
180	39,75	-	31,90	60,59	41,18	38,60	86,43	58,75	62,30	93,36	86,06	128,97
210	45,69	-	37,17	60,55	45,22	42,00	82,23	103,90	**	113,62	123,75	106,53
240	33,80	-	42,57	50,76	44,04	57,01	93,15	66,13	79,58	134,51	126,59	224,67
300	42,10	-	42,81	76,35	62,24	54,92	67,84	89,50	49,70	132,27	88,22	132,43
360	98,22	-	31,95	70,20	55,05	53,83	69,96	63,43	36,65	172,10	78,97	183,19
420	45,59	-	51,32	48,84	36,54	45,01	88,29	52,07	53,81	102,98	149,81	119,97
480	26,24	-	38,48	86,76	45,77	54,83	102,84	92,41	100,74	87,83	**	144,23

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

GLUTAMINA

Concentración plasmática por sujetos de Glutamina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Glutamina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	436,53	-	354,23	526,08	462,53	506,39	393,89	383,29	714,54	512,63	412,62	388,08
30	493,24	-	479,69	654,32	410,66	498,23	457,82	378,35	502,90	480,05	578,66	464,65
60	581,79	-	489,23	692,07	453,63	707,10	464,77	625,17	531,76	526,80	554,93	590,85
90	584,02	-	518,80	431,86	459,12	564,45	383,67	436,69	565,24	450,72	531,59	432,21
120	505,29	-	225,46	546,09	497,82	537,41	375,01	583,72	514,52	545,73	527,31	462,69
150	554,82	-	573,92	492,58	486,39	531,66	421,79	554,16	531,22	536,84	572,44	739,84
180	458,37	-	363,83	560,80	460,82	479,31	504,78	485,74	606,30	602,78	587,72	552,70
210	517,33	-	379,26	567,35	484,13	505,83	411,72	438,78	1022,15	551,03	629,74	566,96
240	521,03	-	509,08	708,51	456,83	567,70	397,93	401,90	528,60	554,97	540,15	707,95
300	423,14	-	404,94	464,06	395,48	482,68	382,02	472,03	381,24	495,79	539,92	441,96
360	496,32	-	470,73	381,81	374,56	661,06	391,43	437,76	434,70	398,41	440,18	612,72
420	467,10	-	436,00	568,25	367,94	492,91	450,83	393,57	448,45	400,69	479,74	817,93
480	528,45	-	352,65	458,51	353,94	514,78	346,83	402,91	450,58	451,32	449,80	610,60

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Glutamina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Glutamina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	559,85	-	428,57	375,66	480,69	567,51	245,10	484,03	776,60	900,53	917,29	398,15
30	484,53	-	429,60	580,93	410,62	664,40	385,08	507,25	572,01	845,04	677,95	521,43
60	568,75	-	481,47	379,97	404,24	954,94	403,08	584,97	613,74	519,24	407,01	712,82
90	543,52	-	508,40	455,59	517,61	649,47	320,15	512,71	642,39	872,55	407,17	730,47
120	493,30	-	449,30	476,65	487,84	669,53	565,95	394,76	819,67	672,46	544,06	442,82
150	537,82	-	515,76	516,78	415,65	733,13	425,72	452,25	814,53	720,42	484,49	412,46
180	471,93	-	742,80	462,66	441,56	575,51	468,92	472,57	615,37	641,42	468,25	438,38
210	388,33	-	466,98	517,42	463,08	547,39	392,58	637,73	**	638,91	584,96	345,66
240	633,94	-	504,49	518,95	433,13	613,44	457,66	573,71	664,98	467,45	433,01	586,09
300	681,43	-	472,41	545,72	424,56	565,17	429,17	308,67	562,65	733,75	725,90	391,72
360	677,69	-	319,28	460,72	460,95	352,54	406,04	505,69	547,17	623,88	309,13	674,05
420	498,19	-	654,35	352,55	499,93	449,10	401,60	429,96	586,86	429,92	708,58	466,13
480	503,63	-	389,41	398,02	429,40	493,73	391,80	550,89	556,24	473,76	**	402,76

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

PROLINA

Concentración plasmática por sujetos de Prolina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Prolina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	185,29	-	110,54	156,60	141,03	158,47	141,39	166,48	136,26	217,03	236,43	142,24
30	186,08	-	101,24	196,47	109,52	151,77	141,05	182,91	111,50	182,12	209,29	138,10
60	190,24	-	129,88	183,43	196,73	202,00	138,86	225,47	113,56	191,36	176,44	171,24
90	186,67	-	150,28	147,87	129,85	148,01	124,03	188,17	112,50	181,04	151,12	122,50
120	231,01	-	41,21	163,74	185,21	143,74	129,41	167,53	105,48	215,82	138,18	118,48
150	168,39	-	120,70	144,07	143,00	111,85	131,22	161,08	121,16	202,89	136,94	129,07
180	154,50	-	94,00	136,82	129,33	114,93	136,87	180,16	131,15	183,95	133,67	132,13
210	180,77	-	110,69	133,14	137,44	120,55	102,87	147,99	191,15	183,24	145,18	134,06
240	150,77	-	170,16	172,08	129,04	124,07	116,24	165,66	105,54	176,95	143,07	117,14
300	167,17	-	150,16	121,12	114,38	137,94	142,85	156,99	105,92	187,17	139,03	110,68
360	175,61	-	148,20	131,74	100,49	134,99	112,66	167,49	111,77	215,25	102,93	118,94
420	155,66	-	159,11	152,23	99,83	150,46	105,73	164,00	101,32	183,88	115,94	149,80
480	158,13	-	109,72	120,11	90,15	143,29	104,55	155,76	89,80	179,21	126,72	156,79

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Prolina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Prolina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	189,70	-	170,65	151,91	133,75	130,45	98,12	151,33	273,42	172,15	359,47	150,86
30	187,52	-	139,58	166,98	126,54	176,59	162,88	158,73	211,53	155,92	222,10	156,37
60	188,77	-	121,31	168,31	118,45	245,56	149,01	190,56	199,45	124,85	184,78	211,97
90	192,07	-	143,05	181,50	179,19	164,76	145,34	174,67	208,34	224,34	138,27	196,25
120	167,52	-	137,58	188,66	146,63	160,27	188,93	120,20	187,65	150,91	131,31	113,56
150	168,12	-	139,45	139,77	120,51	159,50	143,28	129,16	227,44	165,31	139,47	131,39
180	160,74	-	129,30	150,22	123,63	166,04	172,38	143,27	178,63	134,81	124,41	106,21
210	157,30	-	124,06	162,00	104,08	151,63	185,25	222,78	**	144,91	180,88	94,32
240	166,10	-	174,87	114,49	120,13	129,73	158,24	179,55	181,23	120,95	118,38	190,47
300	186,22	-	157,01	124,72	153,21	155,16	179,34	106,98	210,74	248,64	161,39	116,46
360	203,29	-	125,71	153,11	152,26	96,24	159,41	151,30	178,45	177,00	101,08	172,92
420	164,72	-	144,35	150,79	142,13	110,96	186,77	120,65	204,66	113,73	169,00	142,90
480	152,81	-	136,72	138,45	136,23	120,65	182,09	169,81	298,81	139,22	**	150,86

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

GLICINA

Concentración plasmática por sujetos de Glicina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Glicina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	204,13	-	166,49	196,37	184,69	207,06	181,68	169,73	177,71	182,31	236,98	214,61
30	231,74	-	181,43	283,24	169,61	195,42	227,60	213,52	159,60	185,54	324,69	188,53
60	207,80	-	223,37	323,40	167,93	214,29	180,55	267,90	164,87	156,91	367,34	249,39
90	211,84	-	196,50	165,96	159,82	240,29	147,36	216,76	155,20	172,93	231,22	188,41
120	203,15	-	80,85	214,06	202,87	177,77	195,56	245,07	143,93	184,84	216,13	175,28
150	187,92	-	181,77	166,71	134,44	157,09	162,36	185,94	147,92	156,90	254,09	231,06
180	203,03	-	146,16	195,86	210,08	168,76	172,99	216,89	121,12	154,23	203,31	274,78
210	196,13	-	140,92	191,70	161,40	130,70	128,93	149,41	266,55	151,43	223,92	150,48
240	183,02	-	166,24	271,81	163,44	148,37	120,26	198,67	139,38	181,03	209,48	181,73
300	218,86	-	135,11	168,34	183,93	231,52	147,70	180,11	137,09	140,62	200,29	185,14
360	197,19	-	191,94	189,74	153,78	174,25	99,02	202,03	151,48	128,96	192,04	181,20
420	150,43	-	171,41	178,61	184,48	184,56	131,94	210,01	151,78	144,75	198,23	230,03
480	161,13	-	139,47	167,50	138,01	180,62	112,17	211,47	146,71	177,25	194,51	228,15

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Glicina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Glicina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	204,12	-	198,21	175,64	206,40	170,22	94,17	211,28	261,99	161,83	371,99	308,05
30	182,95	-	217,90	189,94	193,89	224,14	135,16	222,21	217,02	151,90	339,44	242,11
60	228,21	-	178,32	181,36	145,42	320,46	186,46	260,33	219,81	152,35	201,29	324,75
90	186,51	-	246,30	191,24	220,61	207,02	133,15	219,84	193,40	290,26	201,47	328,75
120	168,01	-	228,31	148,36	183,91	218,15	180,05	182,63	239,89	183,87	183,26	191,51
150	170,45	-	226,06	174,70	127,40	215,97	150,81	182,25	251,23	165,01	194,22	192,64
180	158,32	-	180,89	218,32	150,98	161,80	173,31	194,81	120,44	167,06	185,83	194,10
210	166,76	-	213,12	185,79	132,97	231,26	150,71	251,63	**	130,88	261,67	157,04
240	188,46	-	231,61	191,84	140,40	170,51	150,78	278,08	132,83	137,36	217,72	328,81
300	188,45	-	274,88	173,40	177,11	190,56	179,35	141,12	208,07	217,39	229,93	207,03
360	227,14	-	175,22	149,80	179,92	138,15	208,69	230,39	189,93	258,54	175,46	266,71
420	174,61	-	227,12	184,11	144,60	163,29	180,30	168,58	184,96	156,78	346,41	208,84
480	173,37	-	208,62	162,18	177,62	159,98	150,30	223,25	152,93	124,10	**	192,62

*El sujeto no acudió a la segunda visita;** Muestra no tomada.

ALANINA

Concentración plasmática por sujetos de Alanina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Alanina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	234,23	-	202,03	278,14	198,72	374,43	209,65	234,82	342,15	214,65	457,70	325,29
30	372,10	-	338,31	390,81	228,60	487,32	165,02	314,78	294,91	246,06	412,89	339,38
60	250,29	-	321,60	381,39	295,58	444,87	196,11	403,17	311,36	286,19	362,39	440,50
90	261,44	-	365,27	251,98	271,16	440,95	165,34	276,06	279,40	246,04	310,83	326,15
120	289,60	-	112,30	349,58	357,43	402,94	155,58	291,91	262,62	238,46	281,10	354,59
150	257,94	-	283,88	384,63	296,33	287,38	153,27	285,55	238,89	356,14	153,93	348,37
180	280,42	-	222,66	301,16	256,76	205,58	135,92	256,00	287,14	224,48	210,41	418,50
210	331,65	-	219,36	243,73	225,29	304,53	120,22	233,21	533,01	277,73	274,31	291,97
240	239,66	-	352,86	310,69	274,75	313,47	179,66	276,37	250,17	238,85	287,33	329,23
300	268,03	-	310,49	336,76	255,34	331,32	234,05	267,44	356,62	406,17	264,94	205,70
360	242,78	-	344,69	327,56	209,36	417,55	188,50	297,26	358,86	356,99	289,85	287,42
420	301,87	-	344,63	297,43	284,33	404,07	168,00	323,26	313,72	299,96	267,93	394,08
480	210,48	-	320,65	262,55	216,15	463,11	212,54	330,24	385,89	345,92	230,80	371,51

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Alanina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Alanina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	323,25	-	374,11	248,88	310,31	257,90	130,99	169,31	605,19	355,72	613,19	430,75
30	322,18	-	335,95	284,22	279,56	410,05	229,37	260,63	353,23	311,63	571,40	427,44
60	342,86	-	213,34	267,77	269,27	423,83	170,92	266,69	433,02	260,90	319,73	505,55
90	280,33	-	259,20	244,31	390,72	325,53	164,86	342,27	475,26	380,98	314,91	568,48
120	239,20	-	228,05	263,96	202,55	260,06	231,79	188,58	410,00	259,94	255,98	335,09
150	257,76	-	311,48	285,60	271,99	313,63	204,73	233,01	465,00	315,93	253,54	338,88
180	300,43	-	231,09	243,51	169,37	266,63	259,36	237,80	353,72	223,78	248,13	338,97
210	237,91	-	278,81	252,16	243,91	285,87	268,15	294,34	**	187,56	354,44	313,90
240	267,15	-	381,90	260,96	213,56	199,90	261,56	273,35	388,47	248,08	215,95	512,69
300	321,41	-	369,95	321,29	251,22	315,02	243,64	173,56	566,59	562,89	467,78	385,15
360	415,07	-	303,56	299,14	266,70	236,81	263,24	313,49	419,55	524,16	219,19	476,49
420	270,85	-	254,06	278,24	341,07	213,69	262,64	204,12	572,06	308,65	436,25	338,71
480	231,04	-	406,08	350,77	346,26	251,64	299,99	275,80	576,95	242,02	**	321,66

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

VALINA

Concentración plasmática por sujetos de Valina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Valina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	221,75	-	180,17	269,84	275,15	275,79	235,37	182,10	240,21	240,29	254,93	305,50
30	230,26	-	193,52	317,38	247,22	251,37	249,71	213,28	202,70	224,58	238,97	274,33
60	230,90	-	203,91	274,58	267,46	351,81	219,52	259,49	196,34	220,62	242,99	348,15
90	217,69	-	197,81	196,36	287,96	249,74	220,76	189,31	191,48	202,87	197,30	258,14
120	207,59	-	77,81	241,39	222,45	223,27	202,91	193,35	175,21	201,14	163,97	231,73
150	202,77	-	208,44	211,85	288,69	202,48	218,72	179,03	174,13	222,07	186,65	254,15
180	195,27	-	166,38	210,58	314,95	170,88	219,07	182,84	179,64	215,43	188,90	280,82
210	225,25	-	170,40	227,93	259,80	203,10	175,51	181,43	341,10	236,14	209,47	231,48
240	200,05	-	197,83	303,68	252,47	222,78	202,49	178,22	187,28	223,95	183,98	236,81
300	189,53	-	151,39	200,38	235,38	177,42	188,09	179,46	164,51	200,29	190,76	218,56
360	205,33	-	177,42	180,15	212,81	179,79	197,12	190,75	130,17	180,93	186,25	214,85
420	183,65	-	165,65	179,30	206,56	199,52	158,43	176,68	147,94	188,36	184,86	253,68
480	200,33	-	123,40	183,31	215,55	200,85	150,95	166,43	154,56	200,35	183,98	291,06

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Valina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Valina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	322,65	-	194,81	248,84	191,89	242,63	110,77	219,17	208,62	358,30	434,01	255,19
30	267,05	-	171,12	249,46	184,24	300,80	186,39	219,08	157,46	283,20	425,52	243,00
60	272,84	-	249,23	256,46	171,20	427,41	169,68	250,59	146,50	236,30	241,33	301,35
90	271,13	-	191,79	289,01	213,35	302,91	182,23	234,46	161,38	337,25	238,09	326,86
120	235,93	-	174,02	246,38	244,90	304,25	226,32	160,10	146,44	287,67	214,25	185,55
150	245,15	-	183,64	154,59	192,05	306,41	178,67	212,62	178,01	293,82	238,40	182,28
180	236,32	-	179,49	259,46	177,11	263,66	180,06	203,40	146,03	252,22	232,74	193,02
210	236,70	-	178,81	272,45	186,12	288,20	155,99	301,62	**	238,84	330,78	159,96
240	248,47	-	210,42	201,77	208,25	264,57	171,76	250,90	148,89	217,09	229,33	273,20
300	250,99	-	183,21	212,15	165,03	295,53	163,66	182,97	140,60	290,01	273,23	181,51
360	267,98	-	159,81	218,63	215,24	171,30	155,91	205,87	106,45	275,93	205,87	274,13
420	220,40	-	211,18	222,83	168,67	210,92	172,13	178,70	125,52	170,24	399,97	207,69
480	204,34	-	209,92	190,76	175,92	211,78	164,53	241,37	160,25	263,29	**	197,85

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

METIONINA

Concentración plasmática por sujetos de Metionina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Metionina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	22,81	-	16,00	25,92	26,43	29,78	17,35	14,88	22,86	22,45	31,52	26,99
30	23,43	-	18,11	33,86	20,59	30,14	19,69	19,27	22,16	23,39	28,39	24,74
60	23,63	-	18,86	30,43	21,87	37,88	17,47	24,53	21,35	25,34	27,98	28,83
90	23,73	-	18,47	21,40	23,98	28,21	16,29	19,58	19,95	20,14	22,98	20,77
120	20,96	-	7,15	24,57	20,42	24,86	16,39	19,89	17,87	20,99	17,65	20,42
150	17,81	-	19,77	22,85	21,76	18,80	16,20	19,10	17,86	24,96	18,90	25,59
180	18,39	-	13,59	21,15	22,50	18,12	16,76	21,06	18,68	24,29	19,44	29,24
210	20,21	-	14,29	22,25	20,68	20,21	14,33	17,43	36,56	24,15	23,73	23,90
240	14,19	-	16,24	27,86	19,67	22,16	13,87	20,37	15,80	24,78	21,21	19,88
300	15,49	-	13,12	17,76	17,60	20,30	15,09	19,73	14,58	22,18	23,89	16,22
360	16,20	-	13,44	16,29	16,48	17,75	12,54	21,38	14,22	19,19	18,31	19,02
420	17,81	-	14,06	15,53	16,76	18,00	13,02	18,63	14,73	20,82	17,90	27,51
480	17,93	-	10,82	16,66	15,72	20,30	13,76	18,54	15,28	22,85	18,16	30,24

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Metionina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Metionina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	30,28	-	22,46	23,78	20,14	22,37	9,42	15,83	31,55	31,83	47,01	30,85
30	24,85	-	20,57	22,78	19,58	26,03	15,24	19,02	24,93	30,05	37,66	28,67
60	24,20	-	20,98	23,46	17,94	44,20	15,60	21,75	23,63	22,10	21,56	35,76
90	23,42	-	21,12	27,54	23,62	26,74	16,30	18,26	28,11	33,62	18,63	38,72
120	20,09	-	19,61	23,61	20,79	27,66	22,83	13,46	23,23	27,60	18,91	20,29
150	21,13	-	20,25	13,80	18,32	27,25	17,97	17,99	28,51	31,38	20,18	20,02
180	19,99	-	18,63	18,68	14,22	25,99	18,16	16,29	22,38	23,47	18,54	21,23
210	19,30	-	18,93	21,44	16,79	27,57	16,61	21,84	**	22,30	28,89	16,67
240	20,46	-	20,16	20,68	18,48	21,80	16,94	20,43	24,74	23,11	17,97	31,87
300	19,23	-	19,54	19,79	14,72	28,09	17,17	13,50	20,75	31,51	28,06	18,39
360	22,33	-	18,11	16,86	16,39	13,92	17,79	15,41	17,01	31,32	15,94	28,77
420	18,19	-	20,56	17,56	17,43	16,50	19,19	13,58	19,66	20,53	31,42	25,68
480	15,14	-	20,50	20,31	17,26	16,38	15,90	19,43	19,39	20,97	**	23,38

*El sujeto no acudió a la segunda visita; **Muestra no tomada.

ISOLEUCINA

Concentración plasmática por sujetos de Isoleucina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Isoleucina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	67,52	-	48,31	90,35	77,34	82,88	94,48	56,93	78,06	74,66	94,91	89,64
30	68,11	-	49,94	104,63	67,43	73,61	100,35	66,67	65,69	68,16	77,53	78,02
60	70,78	-	50,68	91,36	89,77	102,95	93,72	84,08	64,99	65,10	64,88	87,08
90	67,32	-	48,01	67,58	81,59	71,33	87,39	59,73	59,05	60,53	59,92	63,93
120	60,28	-	19,63	76,98	55,62	63,12	83,43	58,02	54,49	58,39	53,11	55,59
150	60,17	-	54,64	68,45	78,98	60,30	89,23	53,95	55,23	66,34	53,89	63,42
180	59,83	-	43,05	70,45	83,61	54,16	96,33	60,80	57,33	69,83	59,54	80,80
210	68,00	-	48,97	76,57	74,15	61,68	71,65	60,95	106,47	71,52	73,63	64,64
240	65,10	-	50,32	103,71	45,76	70,54	80,93	53,46	59,95	71,72	65,60	62,32
300	55,44	-	36,95	61,17	67,48	46,06	58,13	56,04	44,45	48,11	67,96	60,33
360	56,41	-	40,63	53,05	53,98	45,16	66,63	62,86	37,56	47,70	62,74	59,95
420	59,21	-	40,45	49,29	56,70	55,89	56,57	43,25	41,15	48,83	63,89	85,21
480	62,43	-	30,37	57,63	56,75	53,48	50,16	41,62	46,74	56,19	62,01	95,44

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Isoleucina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Isoleucina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	94,49	-	51,29	91,58	52,42	68,51	39,61	74,73	76,13	106,91	147,14	78,92
30	76,56	-	46,80	87,84	49,60	72,45	61,08	79,41	54,67	82,33	100,54	72,52
60	77,97	-	84,95	87,18	48,11	124,40	58,35	86,61	51,93	70,08	64,62	95,43
90	79,57	-	52,54	101,78	62,18	80,76	55,22	74,32	52,45	102,24	60,31	98,92
120	71,31	-	46,68	87,21	85,87	85,03	79,92	52,79	48,00	81,07	59,77	57,63
150	75,23	-	51,02	43,04	62,63	81,79	59,08	66,95	59,14	88,73	66,18	56,46
180	69,93	-	52,99	85,28	58,73	72,03	55,85	65,14	46,68	71,51	61,71	60,66
210	70,07	-	54,86	91,33	61,32	79,97	53,23	95,26	**	69,32	95,22	50,57
240	74,51	-	61,74	56,87	71,33	70,56	57,74	81,66	49,22	57,76	67,41	87,86
300	67,31	-	49,68	61,03	45,78	83,91	54,29	67,73	41,91	73,49	75,09	98,86
360	74,98	-	49,34	56,24	63,59	36,01	52,79	56,90	28,86	64,20	56,09	87,22
420	67,06	-	72,37	62,82	48,86	54,21	51,64	46,90	39,59	45,25	106,35	73,82
480	62,85	-	67,09	56,09	50,01	56,62	52,82	71,29	52,38	83,83	**	70,49

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

LEUCINA

Concentración plasmática por sujetos de Leucina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Leucina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	125,87	-	94,75	149,90	160,35	155,47	146,37	92,74	140,38	138,40	166,48	141,29
30	126,76	-	103,48	177,73	151,87	147,55	152,47	114,51	117,52	127,00	142,77	138,54
60	128,64	-	105,77	163,89	189,68	185,22	149,33	146,39	119,44	126,62	123,77	172,26
90	113,80	-	98,93	119,63	183,66	136,29	135,27	99,23	105,60	121,01	106,35	120,26
120	108,61	-	40,69	138,74	120,44	115,15	131,49	100,02	96,38	112,76	99,02	114,70
150	104,64	-	113,24	123,88	174,77	105,04	136,82	94,99	96,75	128,59	105,66	131,79
180	109,11	-	89,30	121,28	179,26	91,70	146,24	100,76	102,27	125,77	114,38	151,89
210	123,50	-	96,80	142,99	169,00	115,49	114,64	114,38	190,48	135,98	134,37	124,57
240	110,87	-	105,42	183,35	156,98	131,06	125,81	104,28	110,10	135,76	121,35	123,14
300	96,35	-	69,60	115,07	148,55	95,18	114,66	98,98	82,05	102,09	114,62	123,36
360	101,07	-	82,14	94,44	128,41	86,44	98,54	112,48	70,44	87,86	110,31	118,38
420	102,53	-	79,21	88,38	134,60	104,23	85,45	91,33	80,39	93,90	110,55	158,27
480	101,66	-	55,96	105,48	119,44	108,68	68,54	87,28	89,06	115,18	108,97	177,79

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Leucina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Leucina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	166,10	-	106,45	143,66	97,34	143,42	69,63	135,17	163,71	199,15	284,90	137,47
30	138,23	-	97,04	143,76	94,10	156,34	102,37	131,20	120,53	167,48	225,63	131,30
60	140,11	-	148,81	151,17	93,63	243,33	102,63	153,28	111,11	136,39	134,46	168,09
90	144,57	-	104,76	165,38	112,63	169,89	102,32	131,15	113,74	195,00	129,63	175,55
120	123,87	-	94,91	143,54	143,66	167,09	147,68	91,32	100,73	157,99	120,31	101,29
150	131,25	-	102,93	75,22	100,05	167,23	112,70	118,21	125,35	174,08	132,03	101,23
180	123,82	-	104,02	159,53	95,52	145,71	110,36	115,21	91,60	141,76	128,90	113,93
210	127,08	-	109,36	161,20	109,90	155,97	100,50	173,94	**	128,62	202,10	92,46
240	135,61	-	124,29	98,43	116,28	140,24	103,55	151,78	99,99	127,16	132,45	170,21
300	127,03	-	97,05	116,04	79,22	158,54	97,12	105,01	83,88	154,56	142,33	99,29
360	142,96	-	94,50	115,13	114,26	79,50	96,41	106,70	60,09	137,42	114,84	157,83
420	122,09	-	117,27	118,90	80,92	109,63	94,19	89,35	67,13	90,86	245,91	129,43
480	114,24	-	124,73	105,40	85,81	117,56	88,08	135,92	83,30	161,17	**	126,19

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

TIROSINA

Concentración plasmática por sujetos de Tirosina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Tirosina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	66,07	-	58,52	68,73	47,98	62,04	50,57	41,10	59,38	55,01	87,68	67,92
30	64,16	-	64,17	82,54	42,39	55,45	49,25	54,78	47,39	54,35	88,35	68,67
60	63,70	-	64,04	74,57	45,95	80,82	44,15	71,72	48,42	54,49	67,76	85,09
90	61,66	-	65,93	50,96	46,90	56,65	40,06	44,40	40,03	49,81	61,78	59,49
120	54,40	-	25,50	61,19	46,63	48,79	38,47	52,19	40,36	47,15	53,64	54,84
150	54,64	-	67,27	51,89	46,54	40,28	38,96	47,36	35,59	52,00	54,97	61,27
180	48,50	-	46,76	50,43	48,26	40,03	40,90	42,91	38,96	48,61	51,82	65,75
210	58,60	-	48,47	53,73	41,45	40,07	31,67	56,78	71,70	51,27	61,77	49,60
240	49,78	-	55,41	74,47	39,55	44,82	32,35	39,03	36,78	48,71	54,87	53,56
300	47,49	-	44,59	45,83	36,89	62,97	32,58	44,57	33,84	45,06	45,89	51,95
360	44,94	-	48,81	39,31	32,13	36,47	29,78	39,08	27,52	40,62	45,55	46,85
420	45,65	-	49,01	39,20	32,80	39,37	27,85	38,87	30,52	42,17	43,93	65,21
480	45,98	-	38,89	41,30	32,79	39,86	31,19	37,01	32,95	50,48	46,36	72,73

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Tirosina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Tirosina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	91,84	-	66,42	52,90	50,99	39,75	24,35	38,91	76,60	86,02	155,35	91,43
30	72,12	-	63,58	52,90	47,55	54,43	40,24	40,63	56,29	70,29	139,09	79,08
60	71,46	-	44,90	54,67	42,39	90,36	37,89	47,45	49,88	50,22	76,08	95,05
90	70,08	-	63,12	56,10	54,75	58,55	37,88	38,85	54,79	84,53	67,35	110,61
120	57,30	-	59,19	48,07	43,77	57,95	62,39	29,53	45,87	62,76	62,52	55,21
150	59,56	-	63,54	28,22	41,06	56,53	47,83	34,57	57,01	68,16	63,58	59,26
180	58,03	-	59,12	47,34	35,87	49,39	47,21	35,14	42,01	54,82	58,18	56,29
210	55,45	-	58,21	45,47	37,30	57,57	42,55	49,46	**	40,21	85,35	47,31
240	58,15	-	64,25	40,06	41,21	46,97	53,37	43,76	40,09	53,26	43,48	92,79
300	60,47	-	55,21	42,22	32,73	58,79	46,53	28,53	36,51	69,82	66,15	48,77
360	68,27	-	45,52	38,98	39,12	30,98	49,37	35,56	29,31	69,37	46,64	76,94
420	53,52	-	63,18	39,38	31,67	36,02	50,18	32,14	32,24	40,72	94,68	52,51
480	51,59	-	62,24	44,25	33,55	40,49	47,91	44,13	36,20	59,52	**	59,37

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

FENILALANINA

Concentración plasmática por sujetos de Fenilalanina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Fenilalanina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	45,17	-	51,55	63,82	58,67	48,15	41,26	49,08	55,80	52,09	64,25	60,23
30	48,48	-	55,48	77,90	50,23	45,39	44,40	63,15	49,17	52,40	59,31	56,38
60	51,37	-	57,93	66,91	56,90	68,60	39,64	81,35	49,74	57,68	49,00	77,24
90	47,35	-	56,25	47,78	57,16	41,60	35,38	56,23	45,76	47,72	46,08	50,97
120	40,86	-	21,25	57,00	49,08	35,26	32,69	57,32	41,35	46,20	39,27	52,16
150	45,72	-	61,67	50,36	53,29	36,75	34,71	54,87	42,98	56,94	43,99	59,19
180	40,43	-	45,17	51,18	61,09	37,16	38,53	56,27	45,15	58,79	45,36	69,35
210	48,55	-	46,29	53,38	54,56	36,45	28,73	44,30	89,17	61,74	57,35	54,72
240	44,92	-	52,51	74,70	65,05	40,12	36,28	60,84	44,11	62,61	54,76	55,08
300	41,33	-	45,22	49,74	64,88	42,18	56,28	61,05	40,91	54,66	56,96	43,43
360	44,36	-	52,99	49,91	47,87	38,34	32,56	62,86	36,38	53,36	50,54	54,20
420	43,68	-	54,07	47,63	46,97	46,44	31,31	60,20	44,12	53,57	51,50	72,41
480	50,12	-	41,82	46,89	46,94	42,25	36,42	54,85	46,93	56,57	49,67	81,94

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Fenilalanina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Fenilalanina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	63,05	-	42,43	45,53	38,56	49,06	26,19	54,86	66,91	86,28	88,64	72,19
30	52,82	-	39,77	43,33	37,36	59,80	45,20	56,96	48,44	71,19	82,66	68,90
60	53,81	-	46,41	43,30	36,37	85,68	42,39	65,76	43,97	56,77	45,29	85,78
90	53,16	-	38,84	53,50	43,55	59,75	37,61	63,94	52,47	85,20	42,90	97,53
120	45,74	-	39,18	40,98	45,07	58,82	54,93	42,57	42,26	69,74	41,16	48,64
150	48,85	-	38,34	35,72	45,51	62,06	43,28	57,21	54,73	73,59	44,71	49,28
180	47,09	-	40,94	42,73	34,32	52,32	44,80	57,12	42,88	60,41	44,15	51,20
210	50,50	-	38,65	42,58	35,23	52,38	39,82	83,82	**	51,05	71,40	42,02
240	52,77	-	43,09	35,03	48,14	51,38	40,84	64,60	46,70	50,41	44,31	79,93
300	58,38	-	40,98	45,59	35,74	56,73	42,29	29,62	39,46	82,58	72,13	48,61
360	67,24	-	37,46	41,46	43,82	36,77	43,39	57,13	28,15	86,93	43,27	76,75
420	51,76	-	51,98	43,94	37,81	44,53	47,06	48,78	38,52	52,25	93,46	61,42
480	48,94	-	46,18	53,97	37,82	46,30	42,42	73,34	46,71	69,75	**	58,31

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

LISINA

Concentración plasmática por sujetos de Lisina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Lisina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	139,88	-	131,27	178,44	163,57	194,77	111,52	98,56	172,86	162,97	170,71	211,40
30	142,80	-	158,72	217,42	145,10	191,56	147,83	118,99	135,82	170,04	203,54	213,79
60	168,81	-	151,33	197,41	153,85	255,36	138,93	156,95	142,33	144,99	164,49	267,52
90	175,43	-	158,46	143,39	169,97	198,07	126,15	112,67	136,98	152,06	132,08	225,42
120	150,82	-	64,30	159,68	156,19	185,91	106,90	124,49	117,32	167,67	151,07	199,90
150	165,21	-	161,83	157,01	153,48	188,86	133,87	116,03	126,98	153,60	142,47	209,22
180	136,99	-	120,58	157,88	175,13	164,63	146,89	122,99	134,40	136,74	129,11	270,69
210	146,48	-	129,82	166,12	158,37	162,96	117,39	122,58	270,69	168,06	146,09	212,96
240	136,93	-	154,60	251,95	145,37	181,76	104,96	120,31	131,50	172,24	142,56	230,21
300	125,04	-	141,05	126,44	133,45	178,51	117,76	123,71	123,90	150,43	127,32	130,34
360	142,68	-	163,09	143,71	133,14	187,71	95,38	131,32	116,88	152,03	126,05	204,57
420	136,05	-	153,57	147,72	121,44	205,04	93,32	119,10	129,39	156,58	114,63	269,71
480	133,28	-	114,59	142,76	128,23	179,72	84,88	119,86	123,84	212,63	123,20	278,57

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Lisina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Lisina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	166,27	-	148,90	157,61	144,13	164,77	79,30	146,96	207,60	220,60	287,94	229,47
30	152,85	-	144,79	149,26	136,79	214,63	120,17	136,09	151,21	190,39	250,72	206,98
60	163,07	-	190,72	159,32	126,56	268,55	127,08	173,51	140,82	169,26	141,94	318,80
90	156,42	-	163,62	217,47	167,19	200,15	113,25	128,78	125,09	265,86	147,68	339,18
120	140,34	-	192,64	152,40	169,06	203,67	156,37	115,53	128,24	232,18	120,80	197,85
150	147,21	-	159,06	154,00	128,67	222,56	125,41	116,95	168,82	225,32	140,33	184,42
180	151,53	-	195,18	157,93	150,93	182,05	133,92	115,36	104,15	190,40	141,68	177,41
210	146,97	-	154,20	157,11	120,97	183,42	116,67	153,08	**	177,66	210,48	145,71
240	153,24	-	173,33	178,31	154,89	178,91	130,32	187,57	113,76	178,09	139,11	283,72
300	172,00	-	167,39	226,24	154,84	195,20	129,10	124,51	108,35	245,41	273,97	178,75
360	206,19	-	128,15	158,70	170,12	113,84	136,88	135,59	96,30	294,70	124,99	250,94
420	147,07	-	207,94	186,71	135,21	159,39	122,99	104,02	111,39	158,40	250,32	188,01
480	144,53	-	168,46	220,01	143,67	148,45	107,52	154,84	130,68	120,20	**	204,72

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

ORNITINA

Concentración plasmática por sujetos de Ornitina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de Ornitina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	44,27	-	20,98	31,97	32,17	57,54	56,62	48,32	62,32	39,80	62,64	62,89
30	75,96	-	20,02	38,09	42,49	56,16	44,85	36,09	57,49	43,88	43,16	34,53
60	55,69	-	22,98	36,95	42,95	78,54	53,99	57,79	75,60	51,81	43,59	44,66
90	44,48	-	11,47	35,84	33,75	49,79	34,03	69,87	47,40	44,46	41,94	30,90
120	79,42	-	4,37	45,15	29,52	70,25	46,21	34,84	53,60	42,01	50,57	28,04
150	45,23	-	16,30	38,70	39,62	56,74	35,60	28,71	40,64	48,20	47,95	34,59
180	43,81	-	18,04	26,68	18,55	43,87	47,25	57,13	52,37	46,75	36,47	30,66
210	73,74	-	21,22	44,25	37,14	62,04	19,61	36,89	45,64	42,83	40,76	40,88
240	45,31	-	38,26	36,63	38,27	48,47	50,17	67,76	39,89	39,05	46,44	30,69
300	68,31	-	25,67	52,59	31,59	36,04	50,06	25,44	35,77	61,22	49,00	27,39
360	54,63	-	21,08	39,32	30,24	64,66	36,76	59,55	58,38	54,60	37,28	35,49
420	39,70	-	21,91	32,49	36,23	55,67	27,94	71,44	33,01	32,32	41,34	38,99
480	36,94	-	20,39	34,89	29,52	58,58	30,67	58,24	32,72	33,51	46,65	23,83

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de Ornitina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de Ornitina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	41,74	-	34,37	33,56	39,03	53,50	24,41	44,18	66,57	39,63	79,61	63,36
30	46,12	-	22,61	29,90	28,09	76,36	59,52	36,86	73,09	22,54	30,02	20,72
60	43,44	-	29,75	43,09	30,63	49,72	44,98	28,84	58,30	39,25	66,71	32,19
90	46,95	-	34,76	31,97	30,89	55,03	36,01	44,68	67,00	39,58	41,63	24,87
120	38,90	-	35,36	49,15	28,15	42,91	41,72	23,54	60,11	43,87	18,98	30,64
150	45,44	-	32,12	60,48	40,67	48,35	26,08	41,64	67,18	38,25	37,78	43,84
180	40,74	-	38,18	39,19	46,22	70,39	53,78	40,96	61,86	35,92	38,71	29,61
210	42,03	-	38,95	27,78	28,56	51,25	56,03	40,74	**	33,54	47,53	14,47
240	42,79	-	43,98	55,26	47,11	49,76	29,64	53,14	58,28	32,18	55,25	38,89
300	47,44	-	34,59	82,66	54,88	59,59	59,23	34,02	73,57	53,67	36,08	36,41
360	42,40	-	27,74	34,66	38,81	48,05	64,90	44,11	55,37	36,76	25,46	40,57
420	32,43	-	36,64	28,43	43,70	38,14	50,88	28,65	43,76	24,84	60,55	54,58
480	37,33	-	43,46	36,00	35,45	44,67	54,89	37,79	53,82	6,55	**	33,72

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

1-METIL-HISTIDINA

Concentración plasmática por sujetos de 1-Metil-Histidina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de 1-Metil-Histidina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	2,07	-	46,94	8,08	14,69	21,75	14,40	9,34	1,00	1,00	11,98	26,78
30	1,81	-	46,46	9,64	16,81	26,82	9,39	1,00	1,00	11,05	5,15	1,00
60	1,00	-	49,83	6,34	18,40	37,68	9,58	1,00	1,00	13,24	5,34	1,00
90	6,20	-	42,06	4,97	17,71	18,59	5,08	8,80	1,00	8,61	7,63	1,00
120	2,13	-	22,35	5,81	3,63	22,73	5,27	1,00	1,00	7,43	3,65	1,00
150	1,49	-	50,89	5,25	12,79	21,78	9,73	1,00	1,00	10,85	4,32	1,00
180	1,36	-	35,03	4,51	14,50	19,05	8,15	8,33	1,00	13,40	5,54	1,00
210	6,21	-	34,51	6,04	11,52	18,12	9,27	1,00	1,00	8,37	9,69	1,00
240	4,73	-	33,30	7,74	13,48	16,12	8,04	8,52	1,00	7,48	8,49	1,00
300	1,58	-	33,41	4,09	14,55	2,03	14,10	1,00	1,00	11,08	8,29	1,00
360	1,09	-	35,75	4,18	11,35	14,43	7,62	6,13	1,00	6,63	10,44	1,00
420	2,25	-	35,52	3,52	10,37	11,79	8,76	6,19	1,00	7,85	7,49	1,00
480	13,70	-	21,86	3,50	8,13	14,48	7,09	5,36	1,00	9,86	7,48	1,00

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de 1-Metil-Histidina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de 1-Metil-Histidina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	24,83	-	2,77	44,94	16,59	8,82	1,00	15,00	2,59	1,00	1,00	1,00
30	19,98	-	1,96	40,83	16,08	12,54	1,00	15,14	3,01	1,00	1,00	1,00
60	18,65	-	32,09	28,94	16,42	22,49	1,00	18,00	1,00	1,00	1,00	1,00
90	18,65	-	4,06	41,76	17,42	10,99	2,82	17,64	2,77	1,00	1,00	1,00
120	15,77	-	2,29	37,11	32,36	9,31	1,00	12,61	1,00	1,00	1,00	1,00
150	14,90	-	2,35	11,91	17,57	11,66	1,00	16,70	1,00	1,00	1,00	1,00
180	14,00	-	1,00	28,36	13,15	10,60	1,00	19,53	1,95	1,00	1,00	1,00
210	15,01	-	2,36	29,35	11,88	13,92	1,00	22,66	**	12,77	1,00	1,00
240	16,86	-	2,86	12,92	21,16	10,33	1,00	22,90	3,54	1,00	4,96	1,00
300	17,36	-	3,25	15,54	14,23	12,02	1,00	10,14	3,42	1,00	1,00	1,00
360	17,91	-	1,44	23,98	26,15	5,40	1,00	11,69	1,00	1,00	1,00	1,00
420	12,68	-	1,00	21,57	13,34	6,30	1,00	12,48	4,24	1,00	1,00	2,64
480	9,51	-	4,61	9,61	12,27	4,75	1,00	16,75	3,25	1,00	**	1,00

*El sujeto no acudió a la segunda visita; ** Muestra no tomada.

3-METIL-HISTIDINA

Concentración plasmática por sujetos de 3-Metil-Histidina después de la administración a voluntarios sanos de formulación en polvo de liberación controlada (POL).

Concentración plasmática de 3-Metil-Histidina (polvo) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	6,33	-	6,75	4,42	4,99	5,11	1,87	3,06	2,93	4,96	3,74	4,28
30	7,12	-	6,58	6,45	5,89	7,30	4,04	4,57	4,01	6,64	4,53	4,47
60	5,26	-	7,00	3,84	6,10	7,90	1,00	3,85	3,22	6,88	4,88	7,15
90	1,00	-	9,59	3,64	7,13	5,56	4,77	3,50	2,87	6,85	3,32	5,24
120	3,65	-	3,22	3,95	3,87	4,39	3,11	4,68	2,85	5,78	4,61	5,22
150	6,74	-	8,93	4,03	5,35	3,15	1,00	4,20	3,11	4,80	4,32	5,27
180	3,54	-	5,39	2,74	6,44	5,43	3,57	3,61	2,91	5,03	4,75	4,83
210	4,88	-	5,98	4,18	4,68	4,91	5,10	2,20	3,89	6,72	3,94	4,12
240	6,07	-	6,33	6,12	4,28	3,60	4,75	3,05	2,57	5,39	4,10	3,63
300	5,27	-	5,55	3,47	4,59	5,11	6,05	3,69	2,04	6,19	4,73	4,40
360	3,69	-	7,38	4,06	5,16	3,88	1,95	3,80	2,44	3,55	4,91	3,64
420	4,98	-	6,65	2,70	4,39	5,29	2,42	3,57	2,68	4,20	4,50	4,37
480	3,42	-	4,66	3,36	4,40	6,85	1,81	2,64	2,65	7,82	3,97	4,76

*El sujeto no acudió a la segunda visita.

Concentración plasmática por sujetos de 3-Metil-Histidina después de la administración oral a voluntarios sanos de formulación en comprimidos de liberación controlada (COM).

Concentración plasmática de 3-Metil-Histidina (comprimido) ($\mu\text{Mol/L}$)												
Sujetos												
Tiempo (min)	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0	5,69	-	2,96	4,39	4,41	4,38	2,20	5,64	5,03	8,36	5,20	3,67
30	4,81	-	5,48	8,34	4,02	5,96	2,80	7,14	2,17	9,31	7,51	5,45
60	4,53	-	4,28	6,58	5,86	11,41	3,60	11,40	3,98	5,14	5,28	6,03
90	4,94	-	4,91	5,56	6,43	4,98	3,15	4,86	3,36	10,28	7,31	7,06
120	4,39	-	4,65	5,78	8,01	6,21	3,20	6,82	6,05	8,56	3,16	3,72
150	4,02	-	4,72	1,99	5,89	5,84	3,03	7,04	5,83	8,62	3,26	3,37
180	5,04	-	6,35	6,53	4,23	5,72	2,20	7,14	2,15	8,02	4,43	3,70
210	3,39	-	4,38	4,57	4,64	5,69	3,00	8,88	**	6,46	6,53	3,55
240	5,14	-	5,81	5,93	5,15	5,48	2,93	8,88	2,87	5,55	4,24	5,00
300	4,87	-	4,61	4,53	7,72	6,03	2,24	6,65	2,05	8,54	3,91	4,26
360	5,28	-	3,73	5,13	5,62	4,44	3,03	5,50	6,30	11,10	3,76	4,71
420	3,69	-	2,75	7,49	4,74	4,71	2,89	5,99	4,45	5,62	8,74	1,16
480	4,06	-	5,55	6,50	5,20	4,15	2,99	6,91	2,18	4,45	**	3,12

*El sujeto no acudió a la segunda visita;** Muestra no tomada.

