

UNIVERSIDAD DE SONORA
UNIDAD REGIONAL NORTE
CAMPUS CABORCA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**“Análisis de ácido lipóico en diabetes
mellitus tipo II por HPLC”**

DISERTACIÓN

Qué para obtener el título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Opción Análisis Clínicos

PRESENTA
Francisco Javier Hernández Heredia

H. Caborca, Sonora.

Julio del 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
OBJETIVOS	vii
General	vii
Particulares	vii
INTRODUCCIÓN	1
GENERALIDADES	5
Diabetes Mellitus	5
Manifestaciones clínicas de la diabetes	8
Diabetes tipo I	8
Diabetes mellitus tipo II	9
Complicaciones agudas de la diabetes	10
Cetoacidosis diabética	10
Coma hiperosmolar	10
Neuropatía Diabética	10

Radicales Libres	11
Daños de los ácidos nucleicos	13
Antioxidantes	13
Descripción	15
En el organismo	15
Actividad pro-oxidantes	16
Tratamiento de enfermedades	17
Prevención de enfermedades	17
Estrés Oxidativo (EOx)	18
Propiedades químicas y físicas del ácido lipóico	20
ÁCIDO LIPÓICO	22
Actividad antioxidante.	22
Mecanismo de acción en su actividad Antioxidante	22
Funciones fisiológicas y efectos sobre la salud	23
Acción hipoglucemiante	23
Acción contra enfermedades típicas del envejecimiento	24
Ácido lipóico en el sistema nervioso	24
Riesgos sobre la salud del ácido lipóico	24
Riesgos del ácido lipóico a dosis fisiológicas	25
CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	26
Proceso de derivatización	30
Solvente utilizado para el análisis de ácido lipóico	31

ELABORACIÓN DE PROTOCOLO	32
Condiciones para el análisis de ácido lipóico	32
Porcentaje de recuperación	32
Preparación de la muestra	34
Derivatización pre-columna	34
Protocolo de limpieza	35
Tiempos de retención	36
Valores aceptables	38
Comparación con la diabetes mellitus II	40
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Daño producido por los radicales libres a las biomoléculas	12
2.	Estructura química del ácido lipóico	21
3.	Partes fundamentales en las que se compone un HPLC	27
4.	Representación de cromatografía de fase inversa	29
5.	Tiempos de retención del ácido lipóico	37

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Antecedentes recientes en la determinación de ácido lipóico y su forma reducida	4
2.	Condiciones para el análisis de ácido lipóico en HPLC	33
3.	Valores aceptables	39

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados centígrados
C _{max}	Concentración máxima
C _m	Centímetros
DHLA	Ácido dihidrolipóico
DM	Diabetes mellitus
EDTA	Etilen-diamino-tetra-acetato
E _{ox}	Estrés oxidativo
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HClO	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LA	Ácido lipóico
μL	Microlitro
mg/dL	Miligramos/decilitros
mL/min	Mililitros/minuto
Mm	Milímetros
mmol/L	Milimol/litro
mOsm/kg	Miliosmoles por kilogramo

ng/mL	Nanogramo/mililitro
nm	Nanómetro
nmol/mL	Nanomol/mililitro
O ²⁻	Radical superóxido
-OH	Oxidrilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO-	Peroxinitrito
Psi	1 libra por pulgada cuadrada.
Q ⁻	Coenzima (ubiquinol)
RL	Radicales libres
-SH	Sulfhidrilo
Vitamina B1	Tiamina.
Vitamina C	Ácido ascórbico
Vitamina E	Tocoferol
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

En el organismo producimos ácido lipóico en pequeñas cantidades, lo podemos encontrar en los alimentos, como en suplementos dietéticos, comercialmente se produce también para aquellas personas que practican el fisicoculturismo por su efecto energizante y antioxidante.

El ácido lipóico es un efectivo imitador de la insulina, se le conoce por su gran potencia antioxidante, ha tenido un significativo progreso en la dieta de los diabéticos, los efectos secundarios aparecen raramente pero sin gravedad, no se han encontrado efectos tóxicos, regenera algunas vitaminas.

En las complicaciones de la diabetes, como el padecimiento mismo existen evidencias de que son producidos por el exceso de radicales libres generando daños en partes del cuerpo, como también un estrés oxidativo.

Es por ello que al hacer uso del suplemento del ácido lipóico ayudamos al cuerpo a reducir el estrés oxidativo que se genera por parte de la diabetes.

Estudios recientes demuestran que el ácido lipóico, ha tenido un efecto satisfactorio en las enfermedades como derrames cerebrales, trombos entre otros, gracias a que el ácido lipóico atraviesa la barrera hematoencefálica protegiendo a los tejidos del cerebro.

Hasta el día de hoy para las personas, dichos efectos satisfactorios no han sido demostrados, sin embargo se puede extrapolar en animales de laboratorio como ratas, conejos, perros etc.

Para los estudios de ácido lipóico, los investigadores hicieron uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo este uno de los indicados para dicha determinaciones.

OBJETIVOS

General

Presentar la técnica más eficaz en el análisis de ácido lipóico en diabetes mellitus tipo II por HPLC.

Particulares

1. Hacer las comparaciones con diabetes mellitus tipo II.
2. Destacar la importancia de ácido lipóico en la salud humana.
3. Destacar los efectos cuando hay deficiencia en su aporte diario.
4. Destacar el método de HPLC en la detección y cuantificación del ácido lipóico.

INTRODUCCIÓN

El organismo sintetiza muy pocas cantidades de ácido lipóico. A nivel de alimentos se encuentra en espinacas, brócoli, carne, levaduras y ciertos órganos (riñón y corazón).¹

El ácido lipóico se está utilizando recientemente como ingrediente activo de suplementos dietéticos por su efecto antioxidante, hipoglucemiante y energizante. Es un complemento de la dieta muy comprometedor, tanto por sus beneficios como por sus prácticamente nulos efectos secundarios.¹

Este compuesto actúa como coenzima de muchas reacciones del organismo, una por ejemplo en el proceso llamado glucólisis que es el responsable de la conversión de azúcar sanguíneo en energía.¹

El organismo lo puede sintetizar; como sus principales beneficios podemos decir que es un efectivo imitador de la insulina sin efectos secundarios, de hecho, también es un posible agente estimulante de la síntesis proteica de forma natural.¹

El ácido lipóico en la dieta de pacientes con diabetes mellitus tipo II incrementa significativamente la utilización de glucosa en sangre.¹

Por que se tiene en cuenta que el músculo es el principal demandante de glucosa sanguínea, el ácido lipóico ayudará al músculo a la absorción de la misma al interior de la célula muscular, incrementando a la vez, la síntesis de glucógeno.¹

Disminuye la captación de glucosa por medio de las células del tejido adiposo (o adipositos). El resultado de todo esto es un aumento en la producción de energía y una disminución de la acumulación de grasa en el organismo. El ácido lipóico es capaz de reducir el dolor, la sensación de quemazón, irritación, enrojecimiento, debilidad y calambres producidos por la neuropatía diabética. ¹

Los efectos secundarios producidos por dicho compuesto se presentan muy raramente, a dosis altas produciendo síntomas como fatiga, ansiedad, confusión. También como alergias en la piel e hipoglucemia en pacientes diabéticos. La administración crónica de ácido lipóico en animales ha interferido con la actividad de la biotina; en humanos esta interferencia no ha sido demostrada. ²

El ácido lipóico o tioctico (ácido α -1,2-ditioil-3-pantoténico) es un micronutriente de marcado poder antioxidante que actúa como cofactor de las enzimas protectoras frente a los radicales libres y su capacidad para regenerar a la vitamina C, D y E de sus formas oxidadas por lo que se le considera el antioxidante universal. ²

Se sabe poco acerca de los alimentos que contengan este nutriente. Sin embargo, se piensa que los alimentos que contienen mitocondrias, como las carnes rojas, proporcionan la mayor cantidad de ácido lipóico. Nuestro organismo es capaz de sintetizarlo de manera natural, a partir del aminoácido cisteína, pero en pocas cantidades. ²

En la administración de pacientes, No se debe sobrepasar las dosis recomendadas: Se inicia con 100-200 mg/día, siguiendo de 200-300 mg diarios para lograr su efecto antioxidante. Por ultimo de 400-600 mg/día para el tratamiento de diabetes.²

La diabetes mellitus tipo II influye en los procesos bioquímicos, en los que reacciona espontáneamente junto con proteínas como el colágeno, destruyendo la glucosa en sangre. El colágeno se encuentra en la piel, pero también en los vasos sanguíneos, en el tejido conjuntivo y en la mielina (cubierta protectora de los nervios), entre otros.²

Con el paso del tiempo, estos procesos llevan a una aceleración del envejecimiento de los tejidos, problema en los riñones, aterosclerosis y pérdida de visión, que son también consecuencia de la diabetes.³

Retrasa la unión de las moléculas de glucosa con las moléculas de proteína, favoreciendo la absorción por parte de las células de la glucosa sanguínea, una tarea propia de la insulina.³

Se ha revelado en numerosos estudios como un excelente remedio contra un elevado estrés oxidativo. El ácido lipóico puede frenar el cese progresivo de la función de las mitocondrias y un aumento del estrés oxidativo, que se asocia al envejecimiento. Sin embargo, para su máxima aplicación terapéutica, se necesitan unos niveles muy elevados de plasma.³

Estudios recientes han demostrado el análisis de ácido lipóico, por medio del sistema de HPLC para ser tratado en varias enfermedades.³ Haciendo comparación en pacientes con diabetes mellitus tipo II, como se muestra en la tabla 1.

AUTOR	ARTÍCULO
Abdullah I. Haj-Yehia, Peter Assaf, Taher Nassar and Jehoshua Katzhen dler Available online 11 February 2000.	Determinación de ácido lipóico y ácido dihidrolipóico en plasma humano y orina por HPLC con detector fluorescente.
Soichiro Satoh, Toshimasa Toyo'oka, Takeshi Fukushima and Shinsuke Inagaki. Available online 13 April 2007.	Determinación simultánea de ácido lipóico por HPLC con detector fluorescente
Jens, Teichert, Rainer Preiss Faculty of Medicine, University of Leipzig, Härtelstraße 16/18, D-04107 Leipzig, Germany. 2002.	Análisis de ácido lipóico y cinco de sus metabolitos por HPLC
Adil EL Midaoui, Jacques de Champlain <i>Hypertension</i> . 2002;39:303-307	Prevención de Hipertensión, insulino resistente y estrés oxidativo por ácido lipóico
Renu A. Kowluru and Sarah Odenbach <i>Diabetes</i> 53:3233–3238, 2004	Efecto a largo plazo en la administración de ácido lipóico en células muertas de la retina capilar y desarrollo de la retinopatía en ratas diabéticas.

TABLA 1. Antecedentes recientes en la determinación de ácido lipóico y su forma reducida.

GENERALIDADES

Diabetes Mellitus

El termino diabetes procede del griego diabetes, que a su vez deriva del verbo diabaino “caminar” formado a partir del prefijo día “a través de” y baino “andar para”.³

A lo largo del siglo XVIII y XIX el concepto diabetes era un tanto impreciso, pues el termino se utilizaba con varios sentidos; en primer lugar, se aplicaba de forma genérica para designar toda expulsión abundante de orina, sin importar el estado químico del líquido excretado ni atender a otros síntomas contaminantes; en este sentido la palabra diabetes se usaba como sinónimo de poliuria.³

Término acuñado por el médico inglés Thomas Willis en 1647 y que designa una variante de la diabetes, la orina, a primera vista, tiene color claro, pero miraba con atención se percibe un matiz amarillento, lo que hace compararse a una solución de miel en una gran proporción de agua. La orina por lo general es más o menos dulce al paladar. El termino diabetes mellitus a permanecido en inglés hasta nuestros días y por influencia de esta lengua, ha entrado en el castellano con gran vigor, desplazando a las traducciones clásicas españolas diabetes sacarina y diabetes azucarada.³

Manuel Hurtado De Mendoza (1840) ofrece en su diccionario: se designa con este nombre una enfermedad caracterizada por un aumento considerable y alteración en la secreción de orina, sed viva y enflaquecimiento progresivo.³

En los siglos XVIII y XIX en la literatura europea se designaron otros términos para la enfermedad de la diabetes, uno de ellos dice: padecimiento con exceso de urea en sangre, que corresponde a la diabetes insípida, otro término: padecimiento en sangre con materias grasas, que equivale a diabetes lácteas entre otras.³

Fisiológicamente la diabetes sacarina es un síndrome orgánico que se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en la sangre (híper glucemia) resultado de concentraciones bajas de la hormona insulina o por su inadecuado uso por parte del cuerpo y está asociada con alto riesgo de aterosclerosis, daño renal, neural y ceguera que conducirá posteriormente alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas.³

Es la enfermedad endocrina más frecuente, su prevalencia mundial se ha incrementado de forma espectacular en el transcurso de las dos últimas décadas. Entre 1976 y 1994, un ejemplo de la prevalencia de DM tipo II en los adultos aumentó del 8.9% al 12.3%, al aumentar su incidencia en todo el mundo es lo que la convierte en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad.³

Actualmente existen evidencias de la aparición de la diabetes mellitus tipo II, se debe a que principalmente se produce un desequilibrio bioquímico por la producción excesiva RL lo que provoca daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa.³

La poliuria (producción excesiva de orina), la polidipsia (incremento de la sed), la pérdida de peso, algunas veces polifagia (aumento anormal de la necesidad de comer) y la visión borrosa son los síntomas cardinales de este padecimiento.³

Afortunadamente, la aparición de DM tipo II y enfermedades cardíacas, puede ser evitado o disminuido con la administración adecuadas de antioxidantes como son las vitaminas C, D, E y ácido lipóico esto con el propósito de que las complicaciones vasculares ocasionadas por los radicales libres disminuya.⁴

Cuando la diabetes daña los nervios del corazón, esto conduce a un padecimiento llamado neuropatía cardíaca autónoma. El ácido lipóico ha demostrado ser muy prometedor en el tratamiento de este padecimiento¹. En la diabetes también se producen daño en nervios de extremidades del cuerpo, a este trastorno se le llamo neuropatía diabética.⁵

El ácido lipóico también ha sido ampliamente propuesto como un tratamiento para este padecimiento. Sin embargo, una revisión de la evidencia muestra que el ácido lipóico intravenoso ha mostrado ser benéfico para el padecimiento de neuropatía diabética.⁵

Se ha escrito que la DM tipo II está asociada con las reacciones oxidativas catalizadas por la transición de metales. El EOx juega un importante papel en la patogénesis y complicaciones de la DM los mecanismos que puede contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes diabéticos son diferentes, en particular en aquellos sujetos con pobre control de la glicemia e hipertriglicemia.⁵

La OMS reconoce tres formas de diabetes: de tipo I, diabetes mellitus tipo II, y diabetes gestacional (ocurre durante el embarazo), cada una con diferentes causas y con distinta incidencia.⁵

Estudios estadísticos realizados por la OMS estimaron que para el año 2000, 171 millones de personas eran diabéticos en el mundo y que llegarán a 370 millones en el 2030.⁶ Este padecimiento causa diversas complicaciones, dañando frecuentemente a ojos, riñones, nervios periféricos y vasos sanguíneos. Sus complicaciones agudas son (hipoglucemias, cetoacidosis, coma hiperosmolar no cetosico y acidosis láctica, esta última muy raramente).⁵

Manifestaciones clínicas de la diabetes

Diabetes tipo I

Diabetes juvenil ó diabetes tipo I suele comenzar en personas con temprana edad. El inicio de los síntomas suele ser brusco con la pérdida de peso a lo largo semanas o ya sea días, a veces la enfermedad debuta con una cetoacidosis. Las personas con diabetes tipo I los niveles de insulina son indetectables y los del glucagón están aumentando.⁵

El tratamiento con insulina es necesario desde el principio. Con frecuencia después del inicio de la enfermedad existe un periodo de remisión parcial (luna de miel) de duración variable, donde las necesidades de insulina se reducen.⁵

Diabetes mellitus tipo II

Es una enfermedad metabólica caracterizada por altos niveles de glucosa en la sangre, debido a una resistencia celular a las acciones de la insulina, combinada con una deficiente secreción de insulina por el páncreas. Un paciente puede tener más resistencia a la insulina, mientras que otro puede tener un mayor defecto en la secreción de la hormona en los cuadros clínicos pueden ser severos o bien leves.⁶

La diabetes mellitus tipo II es la forma más común dentro de las diabetes Mellitus y la diferencia con la tipo I es que los pacientes no requieren de la administración exógena de insulina para su sobrevivencia, sin embargo, cerca del 30% o más de los pacientes con diabetes tipo II se ven beneficiados con la terapia de insulina para controlar el nivel de glucosa en sangre.⁶

La deficiente disponibilidad de las funciones de la insulina hace que se afecte el metabolismo celular, resultando en un aumento en los ácidos grasos, en los niveles circulantes de triglicéridos. La cetoacidosis puede ocurrir en estos pacientes como resultado de estrés, como una infección, la administración de ciertos medicamentos como los corticosteroides, deshidratación o más control de la enfermedad.⁶

Entre un 80 y 90% de los pacientes con diabetes mellitus tipo II son obesos, de ello se puede deducir que una dieta rica en carbohidratos y grasa, así como una vida sedentaria, favorezcan la aparición de este trastorno.⁶

Complicaciones agudas de la diabetes

Cetoacidosis diabética

Bioquímicamente se define como una glucemia mayor de 300 mg/dL, sumada a una acidosis metabólica con disminución del bicarbonato plasmático. En su fisiología se combinan por una parte un déficit de insulina y el aumento de las hormonas contra insulares, estimulando la glucogenolisis hepática y la glucogénesis; y por otra parte la activación de la glucogénesis a partir de los ácidos grasos libres.⁷

Coma hiperosmolar

Complicación que se puede definir como una glucemia mayor de 600 mg/dL. Con osmolaridad mayor de 350 mOsm/kg, se caracteriza por una deshidratación profunda consecuencia por una hiperglucemia mantenida la mortalidad puede alcanzar el 50%.⁷

Neuropatía diabética

Es una causa frecuente de mortalidad en los pacientes diabéticos y se puede afectar casi a cualquier parte del sistema nervioso central. La neuropatía diabética en el paciente desgasta los nervios es ciertas extremidades del cuerpo como también en manos o pies, tales dolores son extremadamente fuertes, por la deshidratación que hay en el paciente diabético, el exceso de azúcar y radicales libres. El ácido lipóico prometedor en este padecimiento ya

que reduce dolor, las concentraciones altas de glucosa y gran poder antioxidante frente a los radicales libres.⁷

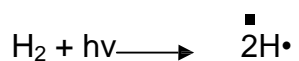
Radicales libres

Es una molécula (orgánica o inorgánica), en general extremadamente inestable y por tanto, con gran poder reactivo. Se puede sintetizar en el laboratorio, se pueden formar en la atmósfera por radiación y también se forman en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno y actúan alterando las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN.⁸

Los radicales libres tienen una configuración electrónica de capas abiertas por lo que llevan al menos un electrón desaparejado que es muy susceptible de crear un enlace con otro átomo o molécula.⁸

Desempeñan una función importante en la combustión, en la polimerización, en la química atmosférica, dentro de las células y en otros procesos químicos, como se muestra en la figura 1.⁸

Para escribir las ecuaciones químicas, el radical libre frecuentemente se escribe poniendo un punto situado inmediatamente a la derecha del símbolo atómico o de la forma molecular como:⁸



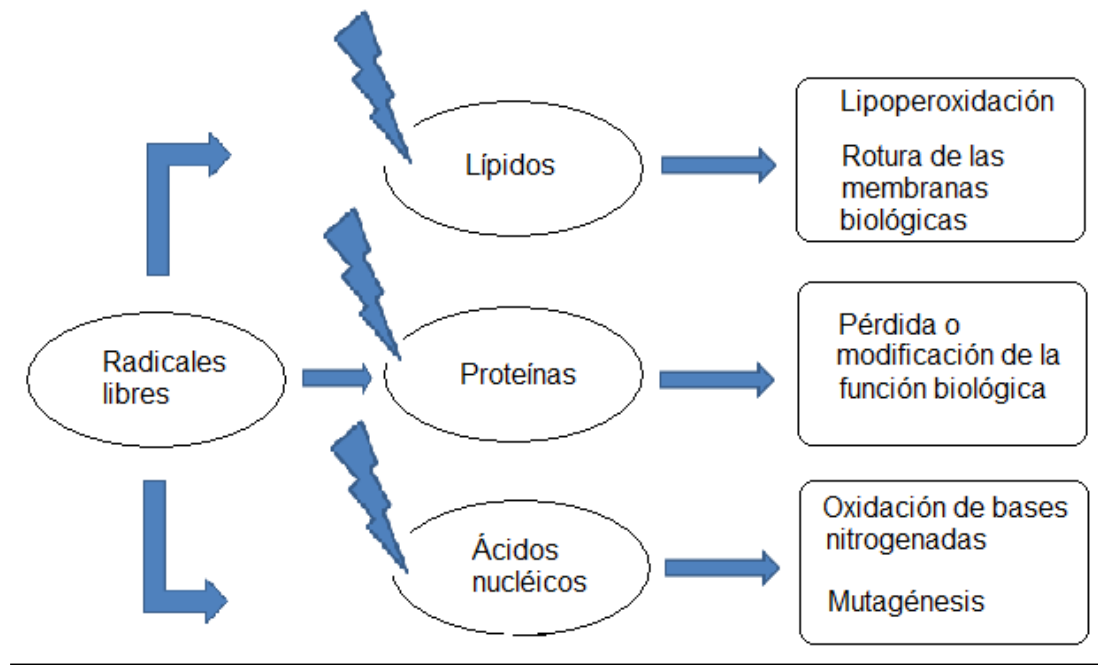


Figura 1. Daño producido por los radicales libres a las biomoléculas.
Tomado de: Knight J. 2000.

Daños de los ácidos nucleicos

En el ser humano se ha calculado que los radicales libres modifican aproximadamente diez mil bases de ADN por célula por día. El principal agente lesivo es el radical hidroxilo. Los RL serían capaces de dañar directamente las cadenas de ADN originando su fragmentación en un primer momento. Posteriormente los RL modifican las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, capaz de provocar importantes mutaciones.⁸

Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante, produciendo radicales libres que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermediarios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos.⁹

Así niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes tales como tioles o polifenoles. Los antioxidantes se encuentran en ajo, arroz integral, café, coliflor, brócoli, jengibre, cebolla, entre otras muchas sustancias. También son parte importante en la leche materna.⁹

Estos compuestos se pueden sintetizar en el cuerpo u obtener de la dieta, los diferentes antioxidantes están presentes en una amplia gama de concentraciones en fluidos corporales y tejidos.⁹

Las especies reactivas del oxígeno que se producen en las células incluyen el (H_2O_2), el (HClO), y radicales libres como radical (HO^*) y el radical (O_2^-).⁹

El radical hidroxilo es particularmente inestable y reacciona rápidamente y de forma no específica con la mayoría de las moléculas biológicas.⁹

Las especies que son reactivas se producen del peróxido de hidrógeno en reacciones redox catalizadas por metales como la reacción de Fenton. Estos oxidantes pueden dañar las células comenzando reacciones químicas en cadena tales como la peroxidación de lípidos u oxidando el ADN o proteínas.⁹

Particularmente importante es la reducción de la coenzima Q en el complejo III, ya que un radical libre altamente reactivo se forma como intermediario ($\text{Q}\cdot^-$). Este intermediario inestable puede conducir a una pérdida de electrones cuando estos saltan directamente al oxígeno molecular y forman el anión superóxido en vez de desplazarse con la serie de reacciones bien controladas de la cadena de transporte de electrones.⁹

Los daños al ADN pueden causar mutaciones y posiblemente cáncer si no son revertidos por los mecanismos de reparación del ADN. Mientras que los daños producidos en las proteínas causan la inhibición de enzimas.⁹

Descripción

Los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, si son solubles en agua ó en lípidos. En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos.⁹

La importancia y las interacciones entre estos diferentes antioxidantes constituyen un área compleja, con varios metabolitos y sistemas de enzimas teniendo efectos sinérgicos e interdependientes unos de otros. La acción de un antioxidante puede depender de la función apropiada de otros miembros del sistema antioxidante.⁹

La cantidad de protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, de su reactividad hacia la especie reactiva del oxígeno y del estado de los antioxidantes con los cuales interactúa.⁹

En el organismo

Es importante saber que el cuerpo utiliza oxígeno para obtener energía de los alimentos y a su vez suministrarla para que todos los órganos realicen los procesos bioquímicos que deben llevar a cabo. El procedimiento se desarrolla en la sangre, donde participa importante proteína (hemoglobina) que es la que contiene hierro, gracias a la cual el vital líquido puede absorber 50 veces más oxígeno que el agua.⁹

Actividades pro-oxidantes

Los antioxidantes que son agentes pueden también actuar como pro-oxidantes. Por ejemplo, la vitamina C, tiene actividad antioxidante cuando reduce sustancias oxidantes tales como el peróxido de hidrogeno, sin embargo puede también reducir iones de metales lo que conduce a la generación de radicales libres a través de la reacción de Fenton.¹⁰

La importancia de las actividades de los antioxidantes como pro-oxidantes y antioxidantes es un área de investigación actual, pero la vitamina C, por ejemplo, parece tener una acción mayormente antioxidante en el cuerpo. Sin embargo hay menos datos disponibles para otros antioxidantes de la dieta, como los polifenoles antioxidantes, el zinc y la vitamina E.¹⁰

En muchos de los casos, donde se presentan las enfermedades neurológicas, no es claro si los oxidantes son los causantes, o si se producen como consecuencia de esta.¹⁰

Una enfermedad neurodegenerativa puede resultar del efecto de las mitocondrias que realizan reacciones de oxidación. Un caso en el cual este encaja es en el comprometido papel del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares.¹⁰

Una dieta con pocas calorías prolonga la esperanza de vida media y máxima en muchos animales. Este efecto puede implicar una reacción en el estrés oxidativo. Dietas abundantes en frutas y vegetales, que poseen elevados niveles antioxidantes.¹⁰

Tratamiento de enfermedades

El cerebro es único en cuanto a su gran vulnerabilidad a daños oxidativo debido a su alta tasa metabólica y a niveles de lípidos poliinsaturados que son el blanco de la peroxidación de lípidos. Por lo tanto los antioxidantes son de uso general en medicina para tratar varias formas de lesiones cerebrales.¹¹

Los antioxidantes también se están investigando como posibles tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de alzhéimer, la enfermedad de Parkinson.¹¹

El uso de antioxidantes, ha sido satisfactorio en este tipo de enfermedades, por que se tiene en cuenta que el cerebro es órgano que más sufre daños por los ataques de los radicales libres que en muchos de los casos suelen ser irreversibles.¹¹

Prevención de enfermedades

Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células y a la gente con una dieta de frutas y vegetales ricos en polifenoles y antocianinas tienen un riesgo más bajo de contraer cáncer, enfermedades cardiacas y algunas enfermedades neurológicas.¹²

Una observación sugirió que los compuestos antioxidantes pudieran prevenir condiciones tales como inmunidad suprimida debido a una nutrición pobre y neurodegeneración, que son causados por el estrés oxidativo.¹²

Sin embargo, a pesar del papel claro del estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares, estudios controlados usando vitaminas antioxidantes no han mostrado ninguna reducción clara en el progreso o riesgo de contraer enfermedades cardíacas.¹²

Esto sugiere que otras sustancias en las frutas y los vegetales, por lo menos expliquen parcialmente la mejor salud cardiovascular de quienes consumen más frutas y vegetales.¹²

Estrés oxidativo (EOx)

Es la consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies oxidantes que no son exclusivamente derivadas del oxígeno y pueden ser radicales libres o no radicales.¹³

El EOx ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudio de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebro vasculares y enfermedades neurodegenerativas.¹³

Sin embargo, se desconoce si el estrés oxidativo es la causa o la consecuencia de tales enfermedades. Los antioxidantes también son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades como el cáncer y la cardiopatía isquémica.¹³

Aunque algunos estudios han sugerido que los suplementos antioxidantes tienen beneficios para la salud, otros grandes ensayos clínicos no detectaron ninguna ventaja para las formulaciones probadas y el exceso de la suplementación puede ser dañino.¹³

En una etapa temprana del estudio de los efectos biológicos de los radicales libres oxidativos se reconoció, que tanto un aumento de los radicales libres como una disminución de las defensas antioxidantes llevan igualmente a daño celular. El concepto de estrés oxidativo se define como el desbalance entre radicales libres y antioxidantes.¹³

Una idea de estrés había sido incorporada a la forma de pensar a través de la fisiología y la psicología. Más recientemente, se ha refinado el concepto de la condición de estrés oxidativo como un aumento de las concentraciones intracelulares de radicales libres oxidantes.¹⁴

En numerosos casos se ha comprobado una acción protectora y beneficiosa de los antioxidantes clásicos (vitamina E) así mismo, se ha observado que la administración prolongada de Vitamina E mejora el funcionamiento mitocondrial durante el proceso de envejecimiento y prolonga la vida en ratas y ratones, que fueron suministrados con vitaminas con tal de estudiar su comportamiento ante el envejecimiento.¹⁴

El Eox puede aumentar la producción de su peróxido, los cuales llevan a la formación de pro-oxidante peroxinitrilo (ONOO⁻). Este compuesto es un potente oxidante capaz de oxidar a las lipoproteínas de baja densidad y por ende, causar disfunción vascular al actuar sobre los residuos de tirosina de las proteínas. Debido a que la producción de ONOO⁻ es difícil de determinar, se ha propuesto la medición de nitro tirosina como marcador de su generación.¹⁴

Propiedades químicas y físicas del ácido lipóico

Comercialmente tiene una apariencia y caracteres organolépticos: polvo cristalino amarillo brillante. Olor débil característico, punto de fusión: 59-62°C, punto de ebullición: 160-165°C, características de solubilidad: prácticamente son solubles en agua, soluble en metanol, etanol, cloroformo y N-N dimetil formamida.¹⁵

Otros nombres: ácido tioctico; Ácido DL-6,8-ditiooctanoico, Ácido D,L-1,2-ditiolano-3-valérico; Ácido D-L-5-(1,2-dotiolano-3-il)pentanoico.¹⁵

Peso molecular: 206,33g/mol., Densidad aparente: 260Kg/m³., Absorbancia (332nm; 0,1%; etanol). Almacenamiento: bien cerrado, seco, refrigerado (<15°C).¹⁵

El ácido lipóico aparece en forma de cápsula para la ingesta por vía oral y como ingrediente en fórmulas en polvo con creatinina, aminoácidos o hidratos de carbono y proteínas también para la ingesta por vía oral.¹⁵

Su estructura química está formada por C₈ H₁₄ O₂ S₂, dos disulfuros cíclicos, dos grupos funcionales (-SH) cuando se reduce y un grupo carboxilo, como se muestra en la figura 2.¹⁵

Sus grupos (-SH) se reduce y oxida de manera alternativa, el grupo carboxilo le permite unirse a la proteína enzimática para formar la estructura de la coenzima, casi siempre se encuentra unido covalentemente a la enzima por un enlace amida entre sus grupos carboxilo y el grupo amino de la cadena lateral de una lisina (lipoamida).¹⁵

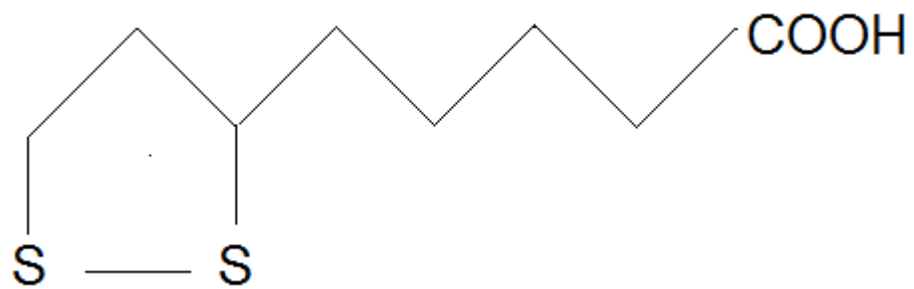


Figura 2. Estructura Química del ácido lipóico.

Tomado de: Vasdev S. 2000.

ÁCIDO LIPÓICO

El ácido lipóico es una coenzima clave en el metabolismo energético de las células, es derivado del ácido graso octanoico, unido covalentemente a la lisina, el cual actúa en un proceso llamado glucólisis que es el responsable de la conversión del azúcar sanguíneo en energía.¹⁶

Se encuentra en el organismo formando parte de la maquinaria metabólica que transforma la glucosa en energía para las necesidades del cuerpo, es un gran imitador de la insulina.¹⁶

Actividad antioxidante

Se le considera como el antioxidante universal porque es liposoluble e hidrosoluble, lo cual le permite actuar en cualquier parte del organismo.¹⁶

Además de tener sus propias acciones antioxidantes, es también capaz de regenerar a la vitamina C y E de sus formas activas.¹⁶

Mecanismo de acción en su actividad antioxidante

El ácido lipóico, juega un importante papel, ha ganado recientemente una considerable atención como antioxidante. El lipoato, o su forma reducida, dihidrolipoato, reacciona con especies reducidas del oxígeno tales como radicales superóxido.¹⁶

También protege las membranas celulares, mediante la interacción de la vitamina C, el glutatión, pudiendo reciclar la vitamina E. Adicionalmente a estas actividades antioxidantes, el dihidrolipoato puede producir acciones antioxidantes a través de la reducción del hierro.¹⁶

La administración del ácido lipóico ha demostrado ser beneficioso en numerosos modelos de estrés oxidativo tales como isquemia, diabetes. Formación de cataratas, activación del VIH, neurodegeneración.¹⁶

Funciones fisiológicas y efecto sobre la salud

Acción hipoglucemiante

Estudios recientes han demostrado que la adición de ácido lipóico en la dieta de los pacientes con diabetes mellitus tipo II ha incrementado significativamente la utilización de glucosa en sangre. Teniendo en cuenta que el músculo es el principal demandante de glucosa sanguínea, el ácido lipóico ayudará al músculo a la absorción de la misma al interior de la célula muscular, incrementando a la vez, la síntesis del glucógeno.¹⁷

Al mismo tiempo, disminuye la captación de glucosa por medio de las células del tejido adiposo (adipocitos). El resultado de todo esto es un aumento en la producción de energía y una disminución de la acumulación de grasa en el organismo. Algunos estudios han demostrado que el tratamiento con ácido lipóico es capaz de reducir el dolor, la sensación de quemazón, irritación, enrojecimiento, debilidad y calambres producidos por la neuropatía periférica.¹⁷

Acción contra enfermedades típicas del envejecimiento

El ácido lipóico no solo es protector del sistema nervioso, sino que además, está relacionado con la regeneración nerviosa. Es por ello estudiado en el tratamiento del Parkinson y el Alzheimer con excelentes resultados. También ayuda a regenerar el daño tisular hepático en caso de alteraciones en el mismo.¹⁸

Ácido lipóico en el sistema nervioso

Debido a que el ácido lipóico atraviesa la barrera hematoencefálica, tiene efecto protector del cerebro y del tejido nervioso y ha demostrado ser muy prometedor en el tratamiento de pacientes con derrames cerebrales, formación de trombos y otras alteraciones del cerebro relacionadas con el daño producido por los radicales libres.¹⁹

Animales tratados con ácido lipóico, por ejemplo, sufrieron un menor daño cerebral y tuvieron un nivel de supervivencia cuatro veces mayor que los animales que no ingirieron dicho suplemento. Aun no se tiene información a este respecto sobre los seres humanos.¹⁹

Riesgos sobre la salud del ácido lipóico

Los efectos secundarios producidos por el ácido lipóico aparecen muy raramente, pero a veces a dosis altas pueden aparecer síntomas como fatiga, ansiedad, confusión.²⁰

También pueden aparecer alergias en la piel e hipoglucemia en pacientes diabéticos. La administración crónica de ácido lipóico en animales ha interferido con la actividad de la Biotina; en humanos esta interferencia no ha sido demostrada.²⁰

Riesgos del ácido lipóico a dosis fisiológicas

Debido a que el ácido lipóico está asociado con el control del azúcar sanguíneo, los pacientes con diabetes mellitus tipo II deben controlar sus niveles de sangre cuidadosamente cuando tomen ácido lipóico para evitar posibles hipoglucemias. De hecho, el médico debería reducirles a los pacientes las dosis de insulina y de fármacos hipoglucemiantes.²¹

Aunque todavía no hay documentación de peligros sobre el uso del ácido lipóico, durante el embarazo se debe de tener prudencia al consumirlo, también los Individuos con deficiencia de vitamina B1 como lo son las personas alcohólicas deben tomar ácido lipóico conjuntamente con vitamina B1.²¹

Es evidente, que la alteración en el futuro de los procesos bioquímicos celulares, como sucede con el metabolismo de la glucosa, específicamente en la hiperglucemia, la cual causa EOX, en la célula,¹⁵ son provocados principalmente por factores como la sobre nutrición y la disminución de la actividad física en el individuo, lo que a su vez desencadena:²¹

- Sobrecarga celular de ácido grasos libres
- Disfunción endotelial.
- Resistencia a la insulina en el músculo.
- Alteración de la secreción de insulina en las células beta.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta

llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido.²¹

Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.²¹

Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo del compuesto, sus partes lo describe la figura 3.²¹

El papel esencial de las bombas es impulsar a la fase móvil con presión y flujo constante, el proceso de inyección de la muestra en la actualidad es automática, las columnas que se utilizan normalmente son de acero inoxidable y los detectores su papel fundamentalmente es de indicar el momento de aparición de los diferentes componentes que constituyen la muestra, calificarlo cuantitativamente como cualitativamente.²¹

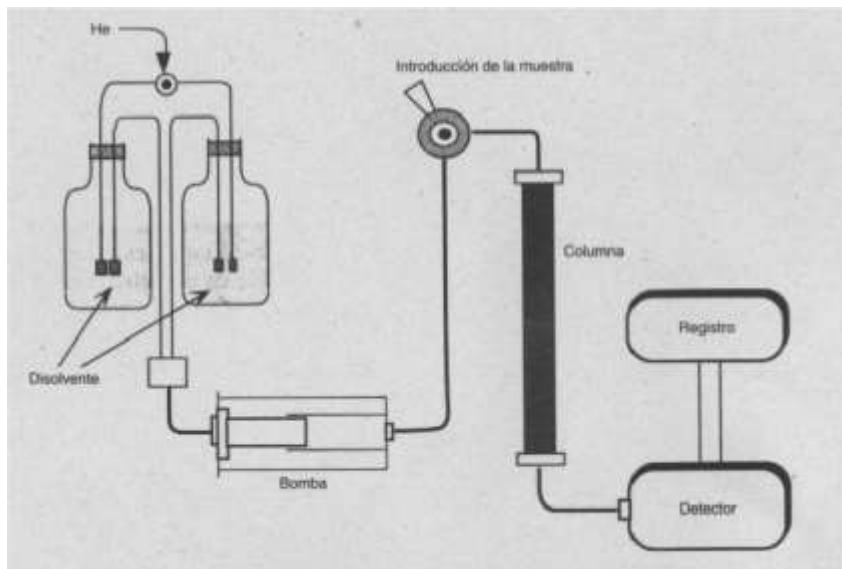


Figura 3. Partes fundamentales en las que se compone un HPLC.

Tomado de: Skoog, Leary. 2000.

El uso de la cromatografía ha demostrado ser muy significativo para el estudio del ácido lipóico, un tipo de cromatografía utilizado fue el HPLC-fase inversa (figura 4), porque trabaja con las polaridades de los compuestos que se van analizar en el futuro, ya que la fase móvil es mas polar que la fase estacionaria. La fase móvil es agua con un componente menos polar como puede ser: agua/metanol, agua/ACN.²¹

El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, tal es el caso del ácido lipóico que es un compuesto apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.²¹

En este tipo de estudios, los proveedores recomiendan que se filtre y se desgasifique todo componente antes de ser introducido a un sistema de HPLC, esto con el propósito de evitar daños futuros.²¹

En el análisis de ácido lipóico todos los solventes, el agua de HPLC, junto con la fase móvil deben ser pasados a través de un filtro de 4 μ y desgasificados al bajo vacío, antes de su uso.²¹

Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. El efecto hidrofobico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil.²¹

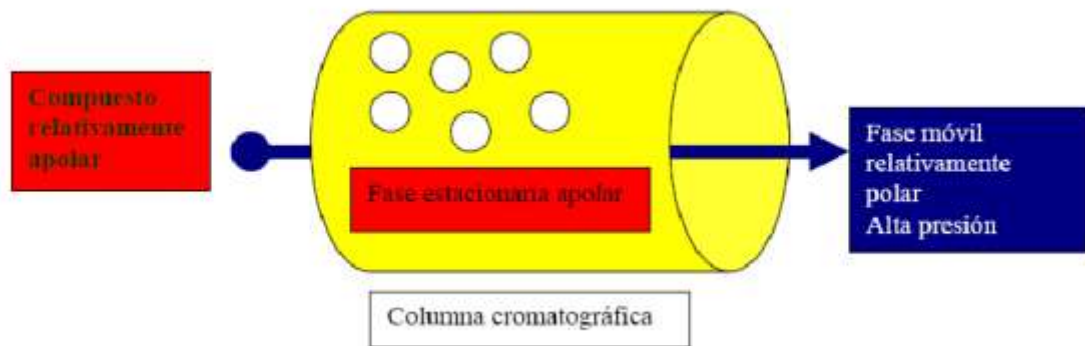


Fig. 4 Representación de cromatografía de fase inversa.

Tomado de: Skoog, Leary. 2000.

Proceso de derivatización

Derivatización pre-columna. Esta acoplada con cromatografía de fase reversa en lugar de cromatografía de intercambio catiónico, fue originalmente introducida como respuesta al incremento en la demanda de mayor sensibilidad y mayor velocidad de análisis, las ventajas de la metodología de la derivatización pre-columna incluyen simplicidad, velocidad y alta sensibilidad.²²

Por ello, si se requiere máxima sensibilidad de detección, un reactivo fluorescente combinado con la derivatización pre-columna es el método más indicado.²²

Como desventaja está la necesidad de garantizarse la completa reacción del reactivo derivatizante y la posibilidad de interferencia con la separación por exceso del reactivo, el medio de reacción o la producción de diferentes derivados de un componente.²²

Además la estabilidad del derivado puede ser un importante factor durante la derivatización pre-columna, la demora entre la derivatización y la inyección llega a ser fundamental para los resultados obtenidos.²²

La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.²²

Solvente utilizado para el análisis de ácido lipóico

El uso de agentes acarreadores es de suma importancia ya que es quien transporta la muestra por todo el sistema de HPLC, en el análisis de ácido lipóico el solvente mas efectivo para su elusión es una mezcla de agua/ACN en concentraciones de (80:20), por ser bajo en contenido de impurezas, disolviéndose junto con la muestra, sin degradar la fase estacionaria y es de baja viscosidad lo que le permite reducir caídas de presión.²²

ELABORACIÓN DE PROTOCOLO

Condiciones para el análisis de ácido lipóico

En la tabla 2, se muestran las condiciones que la bibliografía señala y que estas son las de mayor uso generalizado.²²

Porcentaje de recuperación

Los criterios de aceptación se llevan a cabo mediante un análisis de varianza, del porcentaje de recuperación ó del error relativo en porcentaje, para determinar si hay o no hay diferencia significativa.²²

El porcentaje de recuperación esperado para el análisis de ácido lipóico es a 97% y 102% que es equivalente a $\pm 2.7\%$ del error relativo, que igual se encuentra dentro de ± 3 SD.²²

Rango de flujo	0.01-10mL/min
Rango de presión	1-6000psi
Pulso de presión	<1%
Fluorescencia	380nm (excitación) 510nm (emisión)
Columna	150mm x 4.6mm
Disolvente (gradiente de elusión)	Agua/ACN (80:20)
Cmax plasma	2.23 ± .9014nmol/mL
Inyectores	0.1 – 10µL

TABLA 2. Condiciones para el análisis de ácido lipóico en HPLC. Tomado de: Kohen R. 2002.

Preparación de la muestra

El ácido lipóico se obtiene del plasma, su preparación de este compuesto inicia desde la selección de pacientes, como son: personas sanas y pacientes con diabetes mellitus tipo II.²³

Como ya se describió anteriormente el cuerpo es capaz de producir ácido lipóico pero en pequeñas cantidades, tanto que para el análisis es necesario dosificar a los pacientes con tabletas de ácido lipóico.²³

La muestra de sangre es recogida en tubos con anticoagulante, las muestras son centrifugadas inmediatamente después de haber hecho la extracción. El plasma es separado y transferido a tubos nuevos y guardados a -80°C hasta analizarse.²³

Derivatización pre-columna

La derivatización es un proceso en la que un compuesto es transformado en otro con la finalidad de aumentar la respuesta del detector.¹⁹ Este paso es fundamental en el análisis del ácido lipóico el agente derivatizante se prepara en solución de ACN, agregándose a la muestra, e incubándose a 60°C por espacio de 5min. Siguiendo con la adición de un compuesto de fluorescencia para posteriormente incubar, en un tiempo más largo (30min. aproximadamente).²³

Se coloca la muestra a temperatura ambiente y se toman 10µL para ser inyectados al sistema de HPLC.²³

Protocolo de limpieza

Verificar la pureza de los disolventes mediante un gradiente: el agua se puede controlar para su adecuabilidad en HPLC, bombeando de 20-30mL de agua a través de una columna C18, seguida por un gradiente de hasta 100% de un disolvente organico.²⁴

El burbujeo de He ó N₂ sirve para evitar la formación de peróxidos. Se recomienda utilizar agua grado HPLC recientemente preparada para obtener el máximo funcionamiento y prolongar el tiempo de vida del sistema HPLC, especialmente para trabajos de gradiente de alta sensibilidad.²⁴

El agua grado HPLC preparada en un sistema de purificación casero deberá tener una etapa final sobre carbon activado seguida de filtración. Se debe de tener cuidado de no introducir disolventes que no sean miscibles entre si. Se deberá permitir suficiente tiempo para que la columna se limpie completamente.²⁴

La pureza de disolventes es importante para tomar ventajas de alta sensibilidad de los detectores, la absorción de oxígeno causará ruido a corto y largo plazo que dependerá de la temperatura. Este efecto puede acentuarse cuando el disolvente es desgasificado por vacío y después utilizado en contacto con la atmosfera.²⁴

Los disolventes varían en viscosidad (resistencia al flujo). Este significa que la presión cambiara conforme cambia el disolvente. Durante el gradiente la presión sera mayor que con un disolvente puro.²⁴

Esto es especialmente cierto para gradientes entre agua y disolventes orgánicos tales como metanol, isopropanol o acetonitrilo, todos los buffers deben ser filtrados después de la preparación. No almacenar agua en recipientes de plástico u otros contenedores que puedan liberar plastificantes u otros contaminantes.²⁴

Tiempos de retención

Según lo representado en figura 5 el ácido lipóico es separado de la amina fluorescente usando una columna estándar con la elución isocrática simple. (Reactivo fluorescente 5 A).²² La presencia de otros sulfhidrilos endógenos tales como glutatión y cisteína no interfiere con la detección puesto que su recuperación con el método de extracción aplicada con HPLC es extremadamente baja.²⁴

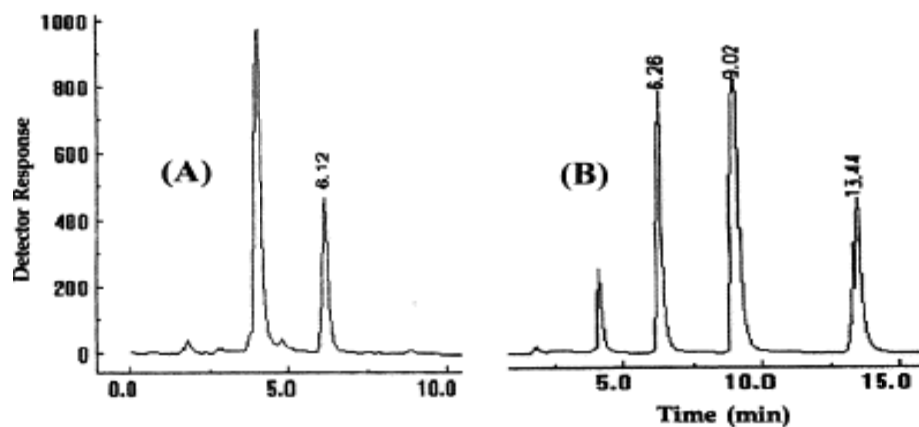


Fig. 5 Tiempos de retención del ácido lipóico.

Los cromatogramas que demuestran los derivados fluorescentes de la amida del LA se muestran en la figura 5 A ($t_R=6.12$), después de la extracción del plasma el cromatograma señala el LA en la figura 5 B con ($t_R=6.26$) y su la de su forma reducida DHLA con ($t_R=9.02$), con el estándar interno ácido decanal ($t_R=13.44$).

Tomado de: Abdullah I. Haj-Yehia. 2000.

Valores aceptables

Los valores aceptables para el análisis de ácido lipóico y otros antioxidantes se muestran en la tabla 3.²⁵

Típicamente la desviación estándar es menos de 2 SD (región de cuidado) según lo que se determine en las medidas de las muestras del control de calidad preparadas en concentraciones bajas, medias y altas dentro de la gama de las curvas de calibración, uno de tres o dos de seis muestras de control de calidad podrían estar fuera del valor de ± 3 SD. (región de control).²⁵

La selectividad es mediante plasma u orina en blanco del control, con los estándares de referencia también como varias muestras de pruebas que se obtienen de pacientes deteriorados. El análisis de los estándares de referencia auténticos del LA y algunos de sus metabolitos es necesario para identificar los tiempos de retención.²⁵

La reproducibilidad y la exactitud son calculadas analizando muestras del control de calidad en el nivel de concentración baja, media y alta según el número de repeticiones. La reproducibilidad para el ácido lipóico es de 97.4%.²⁶

El control de calidad del plasma u orina son medidos en partes alícuotas y almacenados bajo mismas condiciones.²⁶

El método para el análisis cuantitativo del ácido lipóico posee sensibilidad adecuada, selectividad y exactitud. Por lo tanto, es bien aplicable para la farmacocinética y sus metabolitos importantes.²⁷

Elemento	Vol. Mínimo (óptimo) en mL	Material	Rango normal	Unidades	Método
Ácido lipóico	1.0-2.0	Plasma	<10	µg/L	HPLC
B1 (tiamina)	1.0-2.0	Sangre EDTA	20-100	ng/mL	HPLC
VIT. C	1.0-2.0	Plasma EDTA	--	mg/L	HPLC
VIT. D	1.0-2.0	Sangre EDTA	20-100	ng/mL	HPLC
VIT. E	1.0-2.0	Suero	5.0-18.0	µg/L	HPLC

TABLA 3. Valores aceptables.

Tomado de: www.synlab.com. 2009.

Los métodos para la determinación de ácido lipóico poseen excelente especificidad para dicha determinación. Al igual que su estabilidad ya que no se guardaba la muestra solamente para su transporte.²⁷

Estudios demuestran que el volumen mínimo es de 1.0 a 2.0mL que pueden ser introducidos al sistema de HPLC, con un rango normal de menos de 10µg/L utilizando el método de HPLC.²⁸

Comparación con diabetes mellitus tipo II

Hasta el día de hoy, las comparaciones que existen en personas sanas con las personas diabéticas se ha hecho a discreción por la razón que en las personas sanas es muy pequeña la producción de ácido lipóico y en pacientes diabéticos es casi indetectable.²⁹

Por tal motivo hay que dosificar ambos pacientes sanos y diabéticos para poder obtener un mejor análisis.²⁹

Estudios recientes demuestran que se pueden obtener comparaciones en tres tipos de pacientes como son: sanos, diabéticos con una dieta pobre en antioxidantes y rico en grasas, y por ultimo diabéticos con una dieta rico en antioxidantes.³⁰

Los resultados son notorios, retomando el tema de los trastornos producidos por las personas con diabetes mellitus tipo II, la neuropatía diabética siendo la más común produciendo dolores musculares, los diabéticos que en su dieta la complementan con ácido lipóico y así mismo hacer un ejercicio diario adquieren una mayor calidad de vida.³⁰

CONCLUSIONES

1. Ya que el cuerpo sintetiza muy poca cantidad de ácido lipóico, es necesario dosificar a pacientes con diabetes mellitus tipo II y personas sanas para obtener una comparación.
2. En la diabetes mellitus tipo II, el ácido lipóico ayuda a disminuir la producción de radicales libres. Fortaleciendo así al sistema de defensa antioxidante.
3. Gracias a que el ácido lipóico, es un gran imitador de la insulina ayuda al organismo no sufra un aumento a igual que una disminución de glucosa sanguínea.
4. La resequedad de la piel en pacientes diabéticos es gracias a la deshidratación causada por el exceso de secreción de orina, el ácido lipóico ayuda al colágeno a restaurar la piel por la pérdida de agua.
5. El ácido lipóico es prometedor para enfermedades neurológicas causadas por el envejecimiento, como es el mal Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.
6. El ácido lipóico ayuda a la barrera hematoencefálica contra la peroxidación de los lípidos, disminuyendo el ataque de radicales libres al sistema nervioso.

7. La neuropatía diabética siendo el trastorno más común de la diabetes mellitus tipo II, provocando dolores intensos gracias a la deficiencia de antioxidantes, el ácido lipóico ayuda a disminuir dicho dolor.
8. El mejor método para la determinación y cuantificación de ácido lipóico es el sistema de HPLC en fase inversa ya que trabaja con las polaridades de los compuestos que se van analizar.
9. La derivatización pre-columna esta acoplada con cromatografía de fase inversa por mayor sensibilidad y velocidad de análisis.
10. Los agentes acarreadores es de suma importancia y para el análisis de ácido lipóico, la mezcla de agua/ACN es el más efectivo por su bajo contenido de impurezas y evita caídas de presión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. **2000**. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 398:139 –146.
2. Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. **2003**. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-[alpha]-lipoic acid. *Free Rad Biol Med* 34:186 –195.
3. Wolff S.P. **2003**. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull*, 49:642-652.
4. Saltiel AR, Olefsky JM. **2006**. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 45:1661-1669.
5. www.worlddiabetesday.org
[accesado el día: 8 de diciembre del **2008**]
6. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. **2004**. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5):1047-1053.

7. Secretaría de Salud. **2000**. Proyecto de modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. *Rev Med IMSS*, 38(6): 477-495.
8. Knight J. **2000**. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*, 28(6): 331-46.
9. Wolf G. **2005**. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *J Nutr*, 135 (3): 363-6.
10. Jacob R. **2001**. Three eras of vitamin C discovery. *Subcell Biochem* 25: 1–16.
11. A. Alwan, H. King. **2006**. World Health Organization. Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Technical Report series 727. Diabetes.
12. German J. **2000**. Food processing and lipid oxidation. *Adv Exp Med Biol* 459: 23–50.
13. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. **2001**. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*, 44:834-838.
14. Kohen R, Nyska A. **2002**. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 30: 620-650.

15. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. **2004**. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1135–1146.
16. Vasdev S, Ford CA, Parai S, Longerich L, Gadag V. **2000**. Dietary alpha-lipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 18:567–573.
17. Freisleben H. **2000**. Lipoic acid reduces ischemia-reperfusion injury in animal models. *Toxicology* 148:159-171.
18. Melhem MF, Craven PA, Derubertis FR. **2001**. Effects of dietary supplementation of alphas-lipoic acid on early glomerular injury in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol.* 12:124-133.
19. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. **2004**. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1135–1146.
20. Gibson TM, Cotter MA, Cameron NE. **2003**. Effects of alpha-lipoic acid on impaired gastric fundus innervation in diabetic rats. *Free Rad Biol Med* 35:160–168.
21. Skoog, Leary. **2000**. *Análisis Instrumental*, 4^a Ed. Mc Graw Hill. México. P. 575.

22. Kozlov, E. I.; Solunina, I. A.; Lyubareva, M. L.; Nadtochii, M. A. Moscow, Russia. **2004**. HPLC determination of lipoic acid and vitamins A and E in multivitamin compositions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 38(11): 642-643.
23. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ. **2000**. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid. (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. *Diabetes Care*. 22:1296 – 301
24. Abdullah I. Haj-Yehia, Peter Assaf, Taher Nassar and Jehoshua Katzhendler. **2000**. Determination of acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*. Volumen 870, P. 381-388.
25. Soichiro Satoh, Toshimasa Toyo'oka, Takeshi Fukushima, Shinsuke Inagaki. **2007**. Simultaneous determination of lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, Volumen 854, Pages 109-115.
26. Jens, Teichert, Rainer Preiss. Germany. **2002**. High-performance liquid chromatographic assay for α -lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Volume 769. 269-281.
27. H. Hiroyuki. J. **1998**. *Chromatorgr. B* 717, p. 247.

28. http://es.synlab.de/fileadmin/users/synlab_es/pdf/catalogo.pdf
[accesado el día 20 de noviembre del 2008]
29. L. M. Tierney, S J McPhee, M A Papadakis. **2002**. Current medical Diagnosis & Treatment. International edition. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 1203-1215.
30. Pavia C, Ferrer I, Valls C, Artuch R, Colomé C, Vilaseca MA. **2002**. Totalhomocysteine in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care;23:84-87.