



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Determinación de los métodos de ortotoluidina  
y glucosa oxidasa para determinar glucosa sé-  
rica en bovinos Holstein Frisson.

TESIS PROFESIONAL

RAUL HIROMOTO YOSHINO.

México, D. F.

1971.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"COMPARACION DE LOS METODOS DE ORTOTOLUIDINA Y GLUCOSA OXIDASA  
PARA DETERMINAR GLUCOSA SERICA EN BOVINOS HOLSTEIN FRISSON"

TESIS

Que para obtener el título de  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta

RAUL HIROMOTO YOSHINO

---

México, D. F.

1971

BIBLIOTECA CENTRAL  
BIBLIOTECA CENTRAL

Para mis queridos padres, con abnegación  
y cariño, este pequeño fruto.

Al Dr. Hedberto Ruiz Skewes  
quien, con su valiosa ayuda, hizo posible ✓  
la culminación de este trabajo.

A la Mtra. Judith Licea con agradecimiento  
por su ayuda y estímulo.

A quien ha sido un estímulo para seguir  
adelante, agrandando mi futuro, mi querida güera.

I N D I C E

INTRODUCCION	.....1
MATERIAL Y METODOS.....	4
RESULTADOS	.....5, 6
DISCUSION	.....7
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	7
REFERENCIAS	.....9

## INTRODUCCION

En la evaluación de un nuevo método es necesario analizar un determinado número de soluciones estandar, hasta que se pueda conocer en qué rango la absorbancia es lineal con la concentración. Las determinaciones sucesivas nos mostrarán si los resultados son reproducibles día con día o con diferentes equipos de reactivos. En la mayoría de los casos es aconsejable agregar cantidades conocidas del constituyente a especímenes en varias etapas del procedimiento, se realizan los análisis y se determina la "recuperación" para saber qué cantidad se pierde durante la precipitación de las proteínas o en alguna otra fase del método. Finalmente, si se desea reemplazar el nuevo método por el que se está usando, es necesario comparar ambos métodos y aceptar el nuevo método sólo si los resultados son estadísticamente aceptables.

Una de las determinaciones más frecuentemente pedidas en el laboratorio clínico es la determinación de glucosa. La glucosa es un monosacárido que contiene 6 carbonos (hexosa). Su fórmula puede ser escrita en la forma enol o aldehído. En solución alcalina se favorece el cambio a la forma enol. La presencia de una doble ligadura y carga negativa en la forma anión enol hace a la glucosa una substancia reductora activa que permite su determinación analítica. La glucosa en solución alcalina caliente reduce iones metálicos, tales como ion cuproso a cúprico, y el cambio de color indica en forma presuntiva la presencia de glucosa.

En la glucosa los grupos aldehído y alcohol pueden reaccionar con el grupo hidroxilo del carbón 5 y, con esta estructura cíclica, el grupo hidroxilo en el primer carbono puede estar a la derecha o a la izquierda. La forma con el grupo hidroxilo a la derecha es llamada  $\alpha$ -D-glucosa, y el de la izquierda  $\beta$ -D-glucosa. La glucosa común cristalina anhidra es la forma  $\alpha$ -D. La forma  $\beta$ -D es obtenida por cristalización con ácido acético. La

rotación en la luz polarizada de la forma  $\alpha$ -D es de  $+113^\circ$  y la de  $\beta$ -D es de  $+19.7^\circ$ . Cualquiera de las formas en solución acuosa produce una mezcla en equilibrio con una rotación específica de  $+52.5^\circ$ . A la temperatura ambiente el equilibrio se establece existiendo 36% de la forma  $\alpha$  y 64% de la forma  $\beta$ . La enzima glucosa oxidasa sólo reacciona con la forma  $\beta$ .

El ion ferricianuro en solución alcalina caliente (amarilla) es reducido por la glucosa a ion ferrocianuro (incolore). La disminución en color del ion ferricianuro medido a 420nm es proporcional a la concentración de glucosa. El reactivo blanco tiene la mayor absorbancia y las mediciones de glucosa en niveles normales o bajos es menos exacta al utilizar el método manual, ya que la diferencia entre las grandes absorbancias es menor. Con este método se obtiene mayor exactitud utilizando automatización. En este método interfieren con la determinación o -- tras sustancias reductoras como la creatinina y el ácido úrico, por lo tanto, sueros de pacientes con uremia dan valores elevados falsos.

En los métodos de determinación de glucosa por reducción de cobre, la glucosa en solución alcalina caliente reduce los iones cúpricos a cuprosos. La reacción no es estequiométrica y depende de la alcalinidad, tiempo y temperatura de calentamiento. La reacción es reproducible y permite obtener resultados cuantitativos cuando junto con la muestra se trabajan estándares (9).

En el método de Folin-Wu las proteínas séricas son precipitadas con ácido tungstico y se utiliza en la reacción el filtrado claro (9). La cantidad de sacaroides alcanzan valores hasta de 35mg por 100ml (8).

La glucosa oxidasa es una enzima que cataliza la oxidación a ácido glucónico; si a esta reacción se agrega la enzima peroxidasa y un aceptor de oxígeno cromogénico, como la o-diani-

sidina, se puede determinar la glucosa en forma específica. Debido a que la glucosa oxidasa actúa específicamente sobre la forma  $\beta$ -D y la glucosa en solución existe en un 36% en la forma  $\alpha$  y en un 64% en la forma  $\beta$ , es necesaria la mutarrotación de la forma  $\alpha$  a la  $\beta$ ; ésto se lleva a cabo agregando a la reacción -- fosfomutasa. En la segunda etapa la peroxidasa es menos específica y el ácido úrico, ascórbico y glutatona inhiben la reacción. La mayoría de las sustancias interferentes se pueden eliminar -- utilizando el filtrado de Zomogi zinc. La contaminación con catalasa de la glucosa oxidasa disminuye el color final al competir por el peróxido de hidrógeno con la peroxidasa. Los métodos de glucosa oxidasa no se pueden utilizar con orina debido a la gran cantidad de inhibidores que presenta (9).

Existen en la actualidad varias aminas aromáticas -- que reaccionan con la glucosa en una solución de ácido acético -- caliente, tales como la anilina, benzidina y O-toluidina. La O-toluidina se condensa con un grupo aldehído de la glucosa para -- formar una mezcla en equilibrio de glucosamina y base Schiff. Dubowski determinó glucosa sérica con este método y un método de -- ferricianuro alcalino y encontró buena correlación. Este método -- se puede utilizar en suero, plasma, líquido céfalorraquídeo y orina (9). La adición de tiourea mejoró su sensibilidad (6) y actualmente existe un método que no requiere desproteínización (9) del suero, plasma, etc.

En este trabajo se desea comparar un método de glucosa oxidasa a la cual se agrega el doble de la enzima glucosa oxidasa para obtener la oxidación completa de la glucosa durante la incubación, la adición de amortiguador tris para aumentar la estabilidad de la glucosa oxidasa y que inactiva maltasa y después de la incubación con glucosa y peroxidasa el ph se ajusta a <0.5 con ácido sulfúrico para doblar la absorbancia (8), y un método de O-toluidina que no requiere desproteínización (9).

BIBLIOTECA ~~CONSERVADA~~

U. R. M. M.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizó sangre de bovino obtenida por punción en la vena yugular, la cual se dejó coagular espontáneamente y se centrifugó para obtener el suero, el cual se guardó en refrigeración hasta perder su actividad total determinada por los métodos de O-toluidina (9) y glucosa oxidasa (8).

El procedimiento utilizado con las muestras es el recomendado para comparar métodos cuantitativos por Barnett (1).

La prueba de reproducibilidad (tabla 1) se realizó agregando glucosa químicamente pura en tres diferentes concentraciones: bajo 50, intermedio 100 y alto 150 mg por 100 ml. Para la prueba de recuperación (tabla 2) se agregaron 50, 100 y 150 mg por 100 ml al suero conteniendo 150 mg por 100 ml, y determinando la glucosa por triplicado con los métodos manuales mencionados anteriormente y con colorímetro espectrofotómetro Bausch & Lomb, Espectronic 20.

Se preparó una curva de calibración usando ambos métodos, utilizando concentraciones de glucosa de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg por 100 ml.

Se calculó la media ( $\bar{x}$ ), desviación estandar ( $\bar{s}$ ), -- prueba de T (T), inclinación (INC), rango (R), la desviación estandar de las diferencias (SD) y la varianza de las medias de -- las diferencias ( $S\bar{x}D$ ) de acuerdo a Barnett (1).

TABLA 1

RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS METODOS DE GLUCOSA OXIDASA (GO) - Y ORTOTOLUIDINA (O).

PRUEBA DE REPRODUCIBILIDAD

		Concentraciones					
		Baja		Mediana		Alta	
		50 %		100 %		150 %	
		GO	O	GO	O	GO	O
1.	49.2	50.0	103	97.1	151.5	150	
2.	47.5	50.0	98	82.4	156.0	152	
3.	49.0	51.5	92	84.6	160.5	150	
4.	50.5	51.5	92	89.4	148.5	153	
5.	49.2	51.5	103	89.4	148.5	155	
6.	52.0	55.0	92	97.1	144.0	153	
7.	50.5	53.0	94	97.1	156.0	148	
8.	49.2	55.0	94	97.1	144.0	152	
9.	50.5	50.0	98	102.6	143.0	148	
10.	49.2	51.5	103	102.6	156.0	150	
11.	53.5	55.0	108	99.7	148.5	148	
12.	52.0	53.0	108	94.5	144.0	153	
13.	49.2	53.0	92	102.6	143.5	154	
14.	49.2	51.5	98	110.0	143.5	150	
15.	50.5	57.0	108	108.3	156.0	150	
16.	49.2	57.0	98	99.7	160.5	152	
17.	46.2	56.0	108	117.7	151.5	152	
18.	50.5	47.0	94	110.0	148.5	150	
19.	49.2	50.0	108	117.7	151.5	154	
20.	49.2	55.0	94	99.7	144.0	149	
$\bar{y}$ = 49.95	$\bar{x}$ = 52.5	$\bar{y}$ = 99.75	$\bar{x}$ = 99.75	$\bar{y}$ = 149.9	$\bar{x}$ = 151.15		
$\bar{s}$ = 1.79	$\bar{s}$ = 2.36	$\bar{s}$ = 6.14	$\bar{s}$ = 9.35	$\bar{s}$ = 5.76	$\bar{s}$ = 12.3		
R= 9.70 %	R= 7.30 %	R= 8.12 %	R= 8.04 %	R= 5.83 %	R= 2.31 %		
INC= -2.60		INC= 1		INC= 1.25			
T= 11.26		T= 4.47		T= 5.58			
SD= 3.08		SD= 8.11		SD= 5.89			
S $\bar{x}$ D= 0.68		S $\bar{x}$ D= 1.81		S $\bar{x}$ D= 1.31			

$\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ = Medias  
R= Rango  
INC= Inclinación/  
 $\bar{s}$ = Desviación estandar

T= Prueba de T  
SD= Desviación estandar de --  
las diferencias  
S $\bar{x}$ D= Varianza de las medias de  
las diferencias.

Tabla 2

PRUEBA DE RECUPERACION

Concentración Alta

200 %		250 %		300 %		
GO	O	GO	O	GO	O	
1.	204.0	200.0	247.5	292.0	306.0	300.0
2.	196.0	196.0	247.5	260.0	300.0	297.0
3.	204.0	203.0	245.0	242.5	291.0	291.0
4.	196.0	202.0	255.0	242.5	294.0	291.0
5.	200.0	204.0	240.0	242.5	300.0	297.0
6.	204.0	196.0	247.5	242.5	306.0	294.0
7.	196.0	199.0	245.0	292.0	300.0	306.0
8.	196.0	203.0	240.0	245.0	291.0	309.0
9.	200.0	205.0	240.0	252.0	306.0	306.0
10.	200.0	192.0	255.0	242.5	300.0	291.0
11.	204.0	192.0	247.5	257.5	300.0	297.0
12.	196.0	200.0	247.5	252.0	294.0	300.0
13.	204.0	200.0	255.0	245.0	294.0	300.0
14.	200.0	201.0	245.5	245.0	300.0	306.0
15.	200.0	201.0	245.0	252.0	294.0	300.0
16.	204.0	196.0	240.0	257.5	309.0	291.0
17.	196.0	200.0	245.0	252.0	294.0	297.0
18.	204.0	204.0	240.0	260.0	300.0	309.0
19.	196.0	196.0	255.0	242.5	306.0	306.0
20.	200.0	198.0	247.5	260.0	294.0	300.0
$\bar{y}$ = 200	$\bar{x}$ = 199.40	$\bar{y}$ = 246.5	$\bar{x}$ = 255.3	$\bar{y}$ = 298.9	$\bar{x}$ = 299.0	
$\bar{s}$ = 11.2	$\bar{s}$ = 13.75	$\bar{s}$ = 5.08	$\bar{s}$ = 14.34	$\bar{s}$ = 5.38	$\bar{s}$ = 5.91	
R= 2.0 %	R= 3.03 %	R= 3.24 %	R= 9.79 %	R= 3.01 %	R= 3.01 %	
INC= .6		INC= -8.80		INC= 0.10		
T= 0.68		T= 38.33		T= 0.447		
SD= 5.08		SD= 14.67		SD= 8.38		
SxD= 1.13		SxD= 3.28		SxD= 1.87		

$\bar{x}$ ,  $\bar{y}$ = Medias

R= Rango

INC= Inclinación

$\bar{s}$ = Desviación estandar

T= Prueba de T

SD= Desviación estandar de las diferencias

SxD= Varianza de las medias de las diferencias.

## DISCUSION

En la prueba de reproducibilidad, analizando la media, desviación estandar y rango, se encontró mayor exactitud y precisión con el método de glucosa oxidasa en las concentraciones bajas, medias y altas; sin embargo, se nota poca diferencia entre los resultados obtenidos con ambos métodos.

En la prueba de recuperación se observa que la diferencia entre los valores obtenidos no es mayor de  $\pm 2$  DS y esto se encuentra entre límites admisibles para poder utilizar el nuevo método, no existiendo un gran número de grandes discrepancias.

El grado de sensibilidad del nuevo método sugiere su utilización para determinar glucosa sérica en bovinos.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con respecto a calidad, el método tiene una exactitud y precisión adecuadas para diagnóstico clínico, buena sensibilidad y resolución. El método es simple de realizar, económico, rápido, los reactivos son fáciles de conseguir, no requiere una desproteínización previa y compara perfectamente con el método manual de glucosa oxidasa.

Se compararon los métodos de glucosa oxidasa (3) y ortotoluidina (4) manuales para determinar glucosa, utilizando un colorímetro espectrofotómetro Bausch & Lomb, Espectronic 20.

Se encontró que el método de ortotoluidina es exacto, preciso, con buena sensibilidad y resolución, simple y rápido de realizar, económico, con buena estabilidad de los reactivos, sigue la ley de Beer-Lambert, en la cual la absorbancia es

proporcional a la concentración (8), en concentraciones de 50 a 300 mg, da resultados comparables a los de glucosa oxidasa y es útil para diagnóstico clínico cuando se utiliza suero de bóvido.

REFERENCIAS

1. BARNETT, ROY N. "Medical significance of laboratory results". Am. J. Clin. Path., v.50, n.6, 1968:671-6.
2. ----- "A scheme for the comparison of quantitative methods".- Am. J. Clin. Path., v.43, n.6, 1965:562-9.
3. CAMPBELL, L. A. and D. S. KRONFELD. "Estimation of low concentrations of plasma glucose using glucose oxidase". Am. J. Vet. Res., may, 1961:587-9.
4. DUBOWSKI, KURT M. "An o-toluidine method for body-fluid glucose determination". Clin. Chem., v.8, n.3, 1962:215-35.
5. GRADY, HAROLD J. and MARTHA A. LAMAR. "Glucose determination by automatic chemical analysis". Clin. Chem., v.5, -- n.6, 1959:542-50.
6. HYVARINEN, A. and E. A. NIKKILA. "Specific determination of blood glucose with o-toluidine". Clin. Chim. Acta, -- n.7, 1962:140-3.
7. HOFFMAN, WILLIAM S. "A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine". J. Biol. Chem., v.120, n.51, 1937:51-5.
8. RICHTERICH, R. Clinical chemistry; theory and practice. New York, Academic Press, 1969. p.226-234.
9. TIETZ, NORBERT W., ed. Fundamentals of clinical chemistry. -- Philadelphia, W. B. Saunders, 1970. p.155-163.