

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica. Sección de Fisiología
Aplicada de Pamplona

Un método crioscópico rápido y preciso aplicable a líquidos biológicos

por

J. M. Macarulla y Blanca Mendía

(Recibido para publicar el 17 de febrero de 1961)

El método clásico de BECKMANN (6) (7), tan asiduamente empleado en la determinación del descenso crioscópico, cuando se aplica a líquidos biológicos, adolece de varios inconvenientes que hemos superado teórica y prácticamente en el método desarrollado en nuestro laboratorio sin requerir más instrumentos especiales que un termómetro sensible que registre centésimas de grado y permita leer milésimas entre divisiones.

Los inconvenientes antes anotados son : *a*) necesidad de una cantidad notable de muestra para bañar el termómetro y agitador ; *b*) requerimiento de algún tiempo para enfriar lenta y gradualmente las muestras en la cámara de crioscopia ; *c*) modificación de la temperatura de congelación según la cantidad de hielo separado debido a un sobreenfriamiento variable ; *d*) necesidad de extrapolación de la curva Temperatura-Tiempo para obtener resultados correctos ; y *e*) adición a la muestra de cristalitos de hielo que pueden diluirla e inutilizarla para análisis ulteriores.

Todos ellos los resolvemos rigurosa y radicalmente en nuestro método mediante una variación esencial en la forma de alcanzar la temperatura del punto crioscópico.

En efecto, las muestras cuya concentración queremos determinar se someten a un sobreenfriamiento previo controlado que no llega a medio grado por debajo de su punto de congelación. El termómetro se enfría aparte, en un baño muy frío,

pero sólo durante el tiempo suficiente para alcanzar -1 ó -2° C.

El tubo de ensayo con la muestra se pasa, ya sobreenfriado, a la cámara crioscópica, el termómetro se le introduce también frío y, debido a que éste ha recogido microcristalitos inapreciables de hielo de la atmósfera, se produce la congelación inmediata del líquido apenas establece contacto con él.

Durante el proceso de cristalización el tubo que contiene la muestra está separado de un baño frigorífico circundante a $-1,5^{\circ}$ C por una doble cámara de aire. Con ello la difusión térmica es pequeñísima durante la operación.

Con todo esto, como veremos luego con detenimiento, se disminuye tiempo, cantidad de muestra, errores por difusión térmica, y se evita la dilución del líquido biológico que puede ser ulteriormente utilizable (10).

Material y métodos

Para la realización de la técnica crioscópica disponemos de varios vasos Dewar que llenamos con mezclas frigoríficas constituidas por agua, hielo y sal en distintas proporciones según las temperaturas que deseamos alcanzar. En la figura 1 están esquematizados 3 vasos con distintos fines.

VASO I.— De unos 1.500 ml de capacidad; estabilizado a $-1,0^{\circ}$ C para enfriar de 25 a 40 tubos de ensayo con las distintas muestras de líquidos biológicos. Estos tubos de ensayo resultan de capacidad óptima si su diámetro es de 13 mm y su altura de 145 a 150 mm. Para enfriar orinas concentradas conviene disponer de otro Vaso I estabilizado a $-2,5^{\circ}$ C.

VASO II.— De unos 250 ml de capacidad, con la mezcla frigorífica a $-1,5^{\circ}$ C; tiene un tapón de goma atravesado por dos tubos concéntricos de 35 y 25 mm de diámetro respectivo, dejando entre ambos una cámara de aire. El tubo interno tiene dos discos de goma perforados. El inferior, situado casi en el fondo, tiene un orificio pequeño para escurrir el agua que moja por fuera los tubos de las muestras; el superior un orificio suficientemente grande para servir de apoyo lateral a los mismos tubos (fig. 1). Como se ve, las muestras quedan separadas del baño frigorífico por una doble cámara de aire y esto unido a que la diferencia de temperaturas entre unas y otro es muy pequeña (menor de 1° C) hace que la difusión térmica sea mínima.

VASO III. — De menor capacidad, con la mezcla frigorífica tan fría como sea posible (bastan unos -18 ó -20°C) para enfriar rápidamente el termómetro. Este se introducirá en un tubo seco situado en el interior del vaso, como se ve en la figura 1.

El curso de la técnica es el siguiente :

Una vez preparados los 3 vasos de la forma indicada, se toman 2 ml de cada una de las muestras a analizar en sendos tubos de ensayo — ya descritos — y se sumergen en el Vaso I. Un termómetro sensible, que puede ser tipo Beckmann, se prepara para operar entre 0 y -4°C , se lava con agua destilada, se seca con papel de filtro y se introduce un momento antes de las lecturas en el Vaso III (si estuviera allí mucho tiempo daría baja la primera determinación por su enfriamiento excesivo).

El primer tubo, una vez frío a la temperatura del baño, se

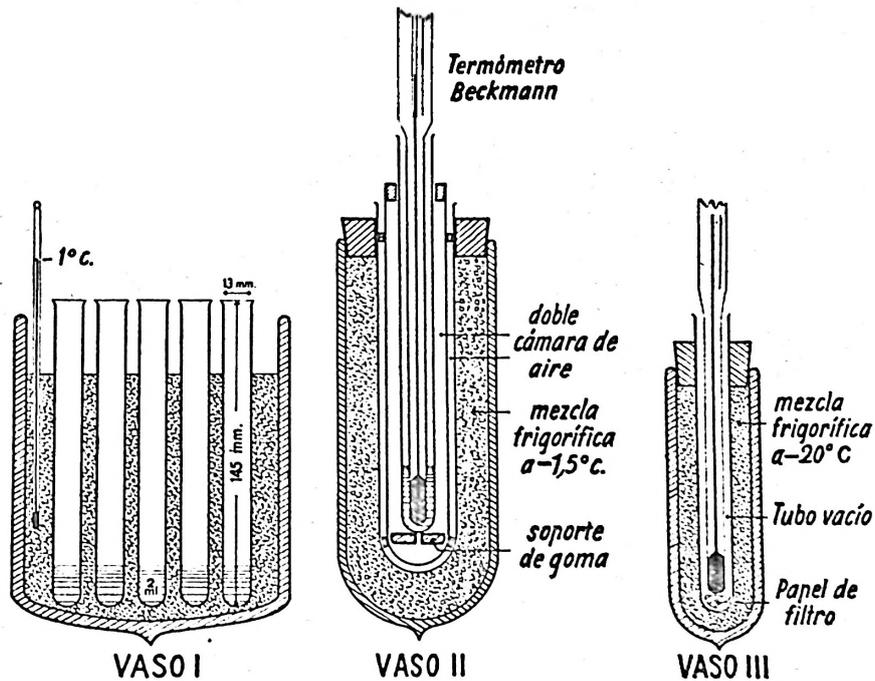


Figura 1. — Esquema de proceso de determinación de descensos crioscópicos. Las muestras de líquidos biológicos son enfriadas en el Vaso I a una temperatura algo inferior a su punto de congelación manteniéndose líquidas a causa del fenómeno de la sobrefusión. En el Vaso III el termómetro se enfría después de cada lectura a -1 ó -2°C . Al pasar las muestras del Vaso I al II e introducir el termómetro frío, se produce la congelación inmediata con estabilización de la temperatura en los puntos crioscópicos. Las pérdidas de calor y la cantidad de hielo separado en la cristalización son mínimas.

lleva del Vaso I a la cámara crioscópica. El termómetro (a -1 ó -2°C) se pasa del Vaso III al interior de ese tubo, produciéndose la congelación inmediata de la muestra. Con el mismo termómetro se agita ésta, vigorosamente al principio, a fin de uniformar la temperatura, y cuando ésta sube muy lentamente, se hace con más suavidad hasta advertir que se estaciona en un punto determinado en el que se mantiene fija durante mucho tiempo. Esta es la temperatura de congelación de la muestra. Se extrae el termómetro, que con papel de filtro se limpia rápidamente y se introduce en III. Se anota la temperatura leída y se sustituye en II el primer tubo por el segundo. Para éste y para todos los sucesivos se repite exactamente lo expuesto para el primero.

Si interesa utilizar la muestra en análisis ulteriores, es necesario lavar el termómetro con agua destilada fría antes de secarlo y enfriarlo en III y, después de leer el punto de congelación, sacar conjuntamente tubo y termómetro para fundir con la mano el hielo formado y evitar así un cambio en la concentración del líquido. El proceso para la determinación precisa del punto crioscópico de una muestra requiere un tiempo global algo inferior a 90 segundos, por lo que se hacen normalmente más de 40 análisis en el término de una hora. Cuando se funde el hielo para guardar la muestra original, el tiempo de cada determinación completa viene a ser de unos tres minutos.

En la figura 2 se recoge la variación aproximada de temperatura que registra el termómetro a partir del instante de su inmersión en las muestras. Una vez alcanzada la temperatura de equilibrio, ésta persiste sin modificarse mientras se agita

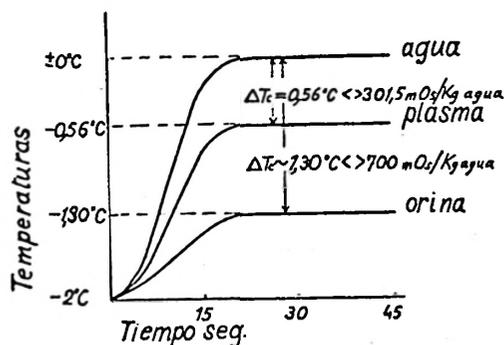


Figura 2.— Variaciones de temperatura señaladas por el termómetro durante la congelación de las muestras. El origen de abscisas corresponde al momento de su inmersión (enfriado a -2°C) en ellas. El máximo se alcanza antes de los 30 segundos de agitación suave. La temperatura se estabiliza durante mucho tiempo y después tiende a descender. Se pueden hacer unas 40 determinaciones en una hora.

con suavidad, y, aún dejando de hacerlo, durante bastante tiempo.

La técnica da resultados óptimos haciendo las determinaciones por triplicado o cuadruplicado (para precisar milésimas) e intercalando de vez en cuando un tubo con 2 ml de agua destilada a fin de contrastar el punto cero del termómetro.

Discusión

El método descrito resuelve satisfactoriamente los inconvenientes ya enumerados al aplicar el método clásico de Beckmann. En efecto :

a) La cantidad de muestra se reduce a 2 ml — que se emplean, no se consumen —, por lo que se hace fácilmente aplicable al trabajo diario de la clínica. Si se trabaja con menos de 2 ml, los resultados, aunque muy aproximados, no son tan seguros.

b) El tiempo de operación en el trabajo en serie se reduce muy considerablemente (a 90 segundos) pudiendo competir esta medición con cualquier otra determinación sustitutiva (por ejemplo, densimetría de una orina para conocer su concentración) (1) que no siendo más rápida resulta menos directa y representativa.

Los inconvenientes *c)*, *d)* y *e)* alusivos a las modificaciones de temperatura durante la congelación, a sobreenfriamiento variable y a la adición de hielo para romper la sobrefusión, se evitan por completo. En efecto : es evidente que la pequeñísima diferencia de temperaturas entre la muestra a congelar (alrededor de $-0,56^{\circ}\text{C}$) y el baño refrigerante (a $-1,5^{\circ}\text{C}$) y la doble cámara de aire hacen que la cesión de calor — de la muestra al baño — sea mínima durante la operación y fácilmente contrarrestada tan sólo con la agitación de la muestra por el termómetro.

La cantidad de hielo separada puede calcularse teóricamente, supuesto el proceso adiabático, por la siguiente expresión aproximada :

$$80 m + Q = m' \Delta t + M \Delta' t \quad (\text{A})$$

donde : m = masa de hielo separada ;

m' = masa de muestra líquida ;

Δt = diferencia de temperaturas entre el punto crioscópico de la muestra y la temperatura del Vaso I ;

M = equivalente en agua de la parte del termómetro que se sumerge en la muestra ;

$\Delta't$ = incremento de temperatura que sufre el termómetro; y

Q = calor producido en la agitación mecánica.

Se puede comprobar que con 2 ml de muestra y unos sobreenfriamientos pequeños m no alcanza el 2 % de la masa líquida, pero esta cantidad puede ser aún menor — de hecho siempre lo es — ya que la agitación mecánica (Q) tiende a fundir buena parte del hielo formado y deja la muestra en el principio de la cristalización y, por tanto, en el punto crioscópico exacto.

En el terreno práctico el método ha demostrado funcionar perfectamente, como se deduce de los resultados con él obtenidos y de la comprobación que hemos realizado trabajando con cantidades mayores de muestra y aplicándoles el método clásico de Beckmann.

Resultados

De acuerdo con la bibliografía (4), aplicamos la fórmula :

$$\Delta = i K_c \cdot c \quad (B)$$

donde : Δ = descenso crioscópico medido ;

i = número de partículas en que se disocia la molécula de soluto ;

c = concentración molal de éste, o sea número de moles de soluto/Kg de agua ; y

$K_c = 1.858^\circ \text{C/mol soluto/Kg de agua.}$

Las divergencias entre las concentraciones determinadas teóricamente o por pesada — osmolalidad ideal — y las deducidas de aplicar esta expresión, conocido Δ — osmolalidad real — vienen relacionadas por el coeficiente osmótico g (4) :

$$g = \frac{\text{osmolalidad real (crioscopia)}}{\text{osmolalidad ideal (pesada)}}$$

Las mediciones realizadas con sustancias puras de índole diversa (electrolitos, solutos orgánicos hidrófilos e inertes) a distintas diluciones vienen a demostrar que, salvo a concentraciones elevadas, todos cumplen satisfactoriamente la fórmula general (B), aproximándose el valor de g a la unidad.

En la figura 3, donde cada punto representa la media de cuatro determinaciones concordantes, se observa : que la urea

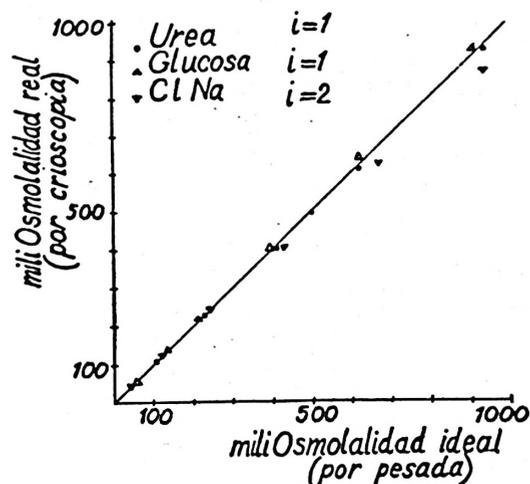


Figura 3.—Determinaciones por cuadruplicado de las concentraciones osmolales de urea (○) glucosa (△) y cloruro sódico (▽) por medida del descenso crioscópico y por pesada de precisión. Hay una clara aproximación a la conducta ideal a concentraciones moderadas y las discrepancias observables a concentraciones mayores están perfectamente de acuerdo con la naturaleza de las sustancias en estudio.

TABLA I

Valores medios de las concentraciones osmolales de seis disoluciones de glicocola determinados por medición cuadruplicada del descenso crioscópico y por pesada de precisión.

Sustancia (2ml)	Temperatura media de congelación (en °C)	Δ (en °C)	Concentración real según la fórmula $c = \frac{1000 \Delta}{1.858}$ (mOsm/kg agua)	Concentración ideal por pesada (mOsm/kg agua) (i = 1) *
Agua	4.286	0	0	0
Glicocola C ₁	4.220	0,066	35,5	34,7
» C ₂	4.157	0,129	69,4	66,3
» C ₃	4.051	0,235	126,5	123,5
» C ₄	3.785	0,501	269,6	268,4
» C ₅	3.295	0,991	533,4	562,8
» C ₆	2.643	1,643	884,3	1005,2

* i: es el número de partículas en que se disocia la molécula.

se ajusta perfectamente al comportamiento ideal a cualquier concentración; la glucosa da valores ligeramente más elevados a concentraciones altas y el cloruro sódico, supuesto totalmente disociado ($i=2$), da valores más bajos que los teóricos en esta misma zona. Sin embargo, las disoluciones diluidas de los tres solutos tienen un comportamiento crioscópico idéntico.

Este mismo resultado hemos obtenido con otras sustancias de distinta estructura y que recogemos en las Tablas I y II.

En la Tabla I se observa que la glicocola, un ion híbrido (de estructura $^+\text{NH}_3\text{—CH}_2\text{—COO}^-$) (9) disuelta en agua destilada se comporta prácticamente como una partícula única, ya que existe una estrecha relación entre los valores de la osmolaridad ideal y la real.

TABLA II

Valores medios de las concentraciones osmolales de cuatro disoluciones acuosas de alcohol mediante medida cuadruplicada del descenso crioscópico y por pesada de precisión en cinco series de determinaciones concordantes.

Disoluciones acuosas de etanol (en g/l)	Temperatura media de congelación (en °C)	Δ (en °C)	Concentración real según la fórmula $c = \frac{1000 \Delta}{1.858}$ (mOsm/kg agua)	Concentración ideal por pesada (mOsm/kg agua) ($i = 1$) *
0,0	4,284	0	0	0
1,0	4,241	0,043	23,1	21,8
2,0	4,199	0,085	45,7	43,6
4,0	4,114	0,170	91,5	87,3
8,0	3,951	0,333	179,2	175,5

* i : es el número de partículas en que se disocia la molécula.

En la Tabla II el alcohol, por su peso molecular tan bajo, aún a pequeñas concentraciones ya modifica profundamente el punto crioscópico de las disoluciones acuosas (1). La desviación osmolal, positiva con respecto al valor ideal, observada al ir creciendo la concentración, parece ser debida a la fuerte hidrofilia de la molécula del alcohol, que hace que sea menor la cantidad de agua libre o sea de disolvente en sentido estricto.

En este ejemplo se ve claramente la ventaja del método crioscópico para determinar la concentración global de solutos sobre el que emplea la densidad, pues, aparte de aumentar ésta de forma distinta según la naturaleza del soluto, en el caso concreto del alcohol la densidad decrece proporcionalmente a

la cantidad de él en la muestra. En cambio, el valor del descenso crioscópico es perfectamente aditivo al añadir alcohol a líquidos biológicos.

En el caso del plasma sanguíneo, la adición de 8 g de alcohol por litro hace que su densidad decrezca en unos 0,002 o 0,003 g/ml mientras que el descenso crioscópico sufre un incremento relativo de 0,349° C (sobre el descenso normal de 0,565° C) (5), lo que supone una osmolalidad real de 188 mOs/Kg agua (mayor de lo indicado en la Tabla II) por ser menor la cantidad de agua en un litro de plasma que en un litro de disolución hidroalcohólica al 8 por mil (p/v).

Conclusiones

a) En el método descrito en el presente trabajo disminuimos o eliminamos las fuentes de error inherentes al método clásico de Beckmann.

b) Como resulta simplificado ahorrando tiempo y cantidad de muestra y no requiriendo instrumentación especial, amplía considerablemente el campo de aplicación del método crioscópico, sobre todo en el trabajo diario de la clínica y en su aplicación a líquidos biológicos cuyas muestras no son abundantes.

c) La concentración global medida en osmoles/Kg agua permite controlar indirectamente otros análisis, ya que la suma de concentraciones de cationes, aniones y sustancias no iónicas debe dar precisamente esta osmolalidad. Una diferencia ostensible delata un error de análisis o la omisión de alguna sustancia importante (3) (8) (11).

Resumen

Hemos modificado la técnica crioscópica de Beckmann con objeto de hacerla aplicable al análisis diario de la clínica y a la investigación universal en líquidos biológicos. El principio teórico descansa en que, mediante un pequeño sobreenfriamiento previo controlado y modificando el aislamiento térmico durante la cristalización, se consigue disminuir notablemente la cantidad de hielo separado y la oscilación de temperaturas. De todo ello se deduce una notable reducción de la cantidad de muestra necesitada, del tiempo de operación y del error del método. Se hace la comprobación práctica del mismo mediante la determinación del descenso crioscópico en varias series de disoluciones de sustancias puras (glucosa, urea, ClNa, glicocola, alcohol, ...) y se registran en tablas o en gráficas. El método se hace perfectamente adaptable al estudio del plasma, suero y orina.

Summary

A rapid and accurate chryoscopic method applicable for biological liquids

Beckmann's classical method of chryoscopic descent is modified in order to obtain the greatest accuracy in the results using the minimum amount of time and sample.

The theoretical principle of the modified method lies in the production of a slight supercooling of the sample (perfectly measured) before the analysis. As a consequence when the liquids are passed into the chryoscopic chamber and the cold thermometer is introduced in, crystallization of ice takes place immediately. The quantity of ice formed is very small, and for that reason the concentration of the sample is not changed. There is a very little difference in the temperature between the refrigerant mixture and the freezing sample, for that reason chryoscopic temperature is not changed during the time of the analysis.

To carry out the determination, three Dewar Vessels are employed (fig. 1), and a refrigerant mixture composed of ice, water, and salt in different proportions is placed in each one. In Vessel I the obtained temperature is about -1.0°C (approximately 0.5°C below the freezing point of the liquids to be analyzed).

Two milliliters of sample are dropped into each standard test-tube (13 mm in diameter), and it is cooled in Vessel I to the same temperature as that of the refrigerant mixture. In Vessel II, the temperature is lowered to -1.5°C . In this Vessel there are two concentric tubes forming a double air-pocket in order to avoid any heat irradiation. In Vessel III in which the temperature has been lowered to -18° or -20°C , a dry test-tube (with some filter paper in the bottom) is placed in it in order to cool the Beckmann's thermometer. For the reading of the freezing-point of the samples, the cold test-tubes are passed from I to II; then the cold thermometer, which has caught microcrystals of ice from the air, is put into the liquid, and the sample is well shaken until the temperature goes up to a maximum where it remains for a certain length of time (fig. 2). The thermometer is dried with filter paper, then it is introduced in III for the next reading. The total time for the analysis of urine is less than 90 seconds for each sample; consequently more than 40 analysis can be done in one hour.

When plasma or serum is needed for further analysis it should be melted by hand-heat before taking the thermometer out, thus a change in its concentration is avoided. In this case

the required time is little more (about 3 minutes) than in the other.

Many concentrations of pure substances have been determined using this method, giving resulting values in satisfactory concordance with the theoretical ones (obtained by weighing) in the zone of physiological concentrations.

Urea, glucose, and NaCl (registered in fig. 3) present an absolute identity of behaviour in low concentrations. On the other hand in higher concentrations the osmotic activity of NaCl is decreased, while the glucose activity increases.

Table I and II register the osmotic behaviours of glycine and ethyl-alcohol which agree with the theoretical predictions, according to their structure. The equation $\Delta = 1.858 c$ is applied, c being the concentration expressed in miliosmols/Kg of water.

Bibliografía

- (1) ACCOYER, P., MIERAL, R., y CAMELIN, A.: *Lyon Méd.*, 192, 207, 1954.
- (2) DARROW, D. C., y PRATT, F. L.: *J. A. M. A.*, 143, 365, 1950, y 143, 432, 1950.
- (3) GAMBLE, J. L.: *Chemical Anatomy, Physiology and Pathology of Extracellular Fluid*. Cambridge, 1953.
- (4) GEIGY, R. J.: *Tablas científicas*, 1958.
- (5) GRAM, H. C.: *Am. J. Med. Sci.*, 168, 511, 1924.
- (6) HAMBURGER, J., RICHERT, G., y CROSNIER, J.: *Techniques de Réanimation Médicale et Contrôle de l'Équilibre Humoral*. París, 1954.
- (7) HENNING, N.: *Klinische Laboratoriumsdiagnostik*. Munich, 1959.
- (8) JEANNERET, P., ROSEMUND, H., y ESSELLIER, A. F.: *Helv. Med. Acta*, 21, 291, 1954.
- (9) MACARULLA, J. M.: *Rev. de Med. E. G. Navarra*, 2, 35, 1958.
- (10) MACARULLA, J. M., y MENDÍA, B.: *Rev. de Med. E. G. Navarra*, 4, 128, 1960.
- (11) RAPOPORT, S., BRODSKY, W., y WEST, C. D.: *Am. J. Physiol.*, 157, 357, 1949.