

## ESTUDIOS SOBRE OLIGODINAMIA

Activación del Agua destilada por el Cobre Metálico y sus Óxidos

POR

RAUL WERNICKE y ALFREDO SORDELLI

Doctores en Química

### I

Bajo la designación de « Oligodinamia » o « Acción oligodinámica », comprendió Naegeli, al crear este vocablo, a la acción tóxica que manifiestan ciertas substancias, las sales metálicas, en soluciones extremadamente diluídas.

Llegó a descubrir este hecho Naegeli (1) cuando se ocupaba de confirmar las ideas de Löw y Bokorny respecto de la acción reductora del protoplasma vivo sobre las soluciones de  $\text{NO}^3\text{Ag}$  acción que desaparece en el protoplasma muerto.

Como material vivo usaba algas (*Espirogira*) sobre las que hacía actuar la solución de Löw compuesta de:

$\text{NO}^3\text{Ag}$ . . . . .	1
$\text{NH}^3$ . . . . .	1
$\text{K}^2\text{O}$ . . . . .	3.6
Agua destilada . . . . .	100.000

Diluyendo 1:100 y 1:1000 y aun más esta solución, comprobó Naegeli que conservaba su acción tóxica, si bien no la manifestaba en una forma instantánea o tan rápida como la solución primitiva. Observó también que éstas soluciones muy diluídas actuaban sobre las algas en forma diferente a las más concentradas.

En efecto: actuando la solución de Löw como un *tóxico común* o *tóxico químico*, el tubo plasmático del alga se contrae conjuntamente con las bandas clorofilianas, sin que se produzca el desprendimiento de éstas; las algas conservan su apariencia verde aun después de muertas y con el tiempo se ponen de color pardo o gris.

Actuando en cambio la solución de Löw muy diluída, se observa que las bandas clorofilianas se separan de las paredes de los tubos plasmáticos, se contraen y pliegan sobre sí mismas formando pequeños ovillitos; las algas pierden su coloración verde, quedando blancas al morir por *acción oligodinámica*.

No sólo el  $\text{NO}^3\text{Ag}$ , sino también las sales de otros metales pueden actuar en forma oligodinámica, así: Cu, Hg, Pb, Sn, Fe; otros metales se manifiestan indiferentes: Au, Pt. Substancias que en soluciones concentradas son tóxicas, como el  $\text{NO}^2\text{NH}^3$ , son completamente inactivas en

soluciones diluídas: grafito, ollín, papel de filtro, algodón, parafina, estearina, goma, dextrina, etc., disminuyen o inhiben la acción oligodinámica y en cambio no influyen la acción del calor y la luz.

Estas investigaciones de Naegeli y otras de las que en seguida nos ocuparemos, si bien fueron publicadas recién en 1893 por Schwendener, es decir, posteriormente a la muerte de su autor, tuvieron su comienzo cerca del año 1880. Mencionamos este hecho porque existen publicaciones anteriores a la que nos ocupa, en las que se investigan estos fenómenos de la toxicidad de los metales. Nos referimos a los trabajos de Miller, Behring, Richet y otros.

En 1883 (2) aparece una comunicación de Richet sobre la acción tóxica comparada de los metales sobre los microorganismos. Observa este autor que una mezcla de 90 p. de agua de mar, 100 p. de orina y 1 parte de peptona, abandonada a 16-20°, se enturbia a las pocas horas por infección microbiana, pero que se evita esta infección agregando diversos metales en proporciones convenientes. En 48 horas no se observa ningún desarrollo con las siguientes concentraciones mínimas de metal:

Hg: 5.5, Zn: 26, Cd: 40, Cu: 62, Ni: 180, Fe: 240, etc., expresadas en partes de metal disueltas en 1.000.000 partes de líquido.

Ca, Na y K son los metales menos activos, y manifiestan su acción con las concentraciones de 30, 43 y 58 por mil, respectivamente.

Era natural que con el medio que experimenta Richet no pudiera observar que los metales pueden actuar como microbicidas aún en concentraciones muy inferiores a las por él halladas, pues como veremos más adelante, la orina y la peptona perturban grandemente esta acción.

Miller (3) estudiando los metales usados en Odontología observó, en 1889, que el oro utilizado para las orificaciones dentarias tienen marcada acción germicida, la que se manifiesta no solamente a su alrededor en las caries, sino también al ser colocado en un medio de cultivo infectado. Esta acción adquiriría grados variables según los gérmenes y la calidad del oro, habiendo algunas marcas que carecían de ella; otros metales como el Sn y Pt no eran germicidas. El oro activo calentado al rojo perdía su propiedad.

En 1890 Behring (4) publica un estudio muy completo sobre «desinfección, desinfectantes y métodos de desinfección», en el que dedica un capítulo al estudio de la acción de los cuerpos insolubles en el agua, al estado sólido. Comenta y discute las observaciones e interpretaciones de Miller. Repite sus ensayos, con el mismo material usado por Miller y que éste le facilita. Algunas contradicciones lo impulsan a proseguir las investigaciones con mayor número de metales.

Encuentra que Ag, Hg, Cu, Ni, Zn son activos en grados variables según los gérmenes y en cambio no lo son Sn, Pb y Fe. Las monedas de oro, plata y cobre son activas, las de níquel muy poco.

Ensaya algunas combinaciones insolubles de Hg, Zn y Pb y encuentra que el calomel tiene más o menos la misma actividad que el Hg y que el HgO es muy activo. SHg (cinabrio) es completamente inactivo.

Hace notar que tanto el mercurio metálico como sus combinaciones actúan en idéntica forma sobre los gérmenes ensayados: carbunco, tifus, piocianico, muermo, difteria, cólera.

Tanto Miller como Behring experimentan colocando el trozo de metal sobre una placa de cultivo infectada, observando que alrededor de los metales activos se mantiene una zona estéril, mientras que en el resto de la placa el desarrollo es normal. Behring prueba que se trata no sólo de un *detenimiento* de desarrollo alrededor del metal activo, sino que en dicha zona ha habido realmente muerte de los gérmenes.

Comprueba también que la zona estéril se manifiesta aún en el caso en que producido el contacto del metal con el medio de cultivo, se siembren los gérmenes después de retirado el metal, es decir, que la presencia del metal no es necesaria para producir la destrucción de los gérmenes y que basta su previo contacto con el medio de cultivo.

En 1891-92 ensayó Shill (5) la acción tóxica de diversos metales químicamente puros colocados en placa de gelatina y agar, hallando que la plata y el talio se manifiestan especialmente activos.

En 1892 publica Ch. Richet (6) un trabajo altamente interesante y que como el anteriormente citado, no es mencionado por ninguno de los numerosos autores que se han ocupado de oligodinamia.

Richet estudia la acción de las soluciones metálicas diluídas sobre la fermentación láctica y establece los siguientes hechos:

1° Ciertas sales metálicas aún en pequeñísimas dosis (*dosis retardatriz*) influyen disminuyendo el desarrollo del fermento,  $SO^4Cu$  y  $Cl^2Hg$  actúan con 0,001 gr. por litro.

2° Existe una dosis *inhibidora* completamente distinta a la anterior y con la que pueda estar en una proporción variable. Si 100 es la dosis *inhibidora*, la *retardatriz*, sería 1 para  $Cl^2 Hg$ , 10 para  $SO^4 Zn$ , 15 para  $Cl^2 Mg$ , etc.

3° A menor dosis que la *retardatriz* todos los metales, aún los más tóxicos, ejercen una acción aceleradora del desarrollo.  $SO^4Cu$  y  $Cl^2Hg$  actúan *aceleradores* con 0.0005 gr. por litro.  $Cl^3Au$  y  $Cl^4Pt$  con 0.0005 gr. por litro,  $Cl^3Fe$  con 0.5 gr. por litro,  $Cl^2Mg$  con 20 gr. por litro.

4° Hay finalmente una dosis *indiferente*, mucho más débil que la generalmente aceptada y que para las sales de  $Cu$  y  $Hg$  es inferior a 0.00025 gr. por litro.

6° El efecto tóxico se manifiesta más sobre el desarrollo cualitativo del germen que sobre su actividad química.

Finalmente, establece distintos grupos de metales, según la dilución en que manifiestan su toxicidad y hace la clasificación:

Actúan en diluciones	$\frac{M}{10}$	:	Na, K, Li, Mg, Ca, Sr, Ba
»	»	»	$\frac{M}{1000}$
		:	Fe, Mn, Pb, Zn, Ur, Al
»	»	»	$\frac{M}{100000}$
		:	Cu, Hg, Au, Pt, Cd, Co, Ni

Hacemos notar que en esta clasificación no figura  $Ag$  que es uno de los metales más activos. Los metales químicamente semejantes ( $Cd$  y

En 1896 Credé y Beyer (11) comprueban la acción germicida de la plata y sus sales sobre los estafilococos, estreptococos y carbunco.

En 1898 Ficker (12) en un trabajo sobre la duración de la vida y muerte de gérmenes patógenos hace un buen comentario de la obra de Naegeli y estudia el efecto de las soluciones oligodinámicas sobre vibriones coléricos. Encuentra que el agua corriente, que ha estado varias horas en la cañería, es activa, no así el agua que sale después de haber dejado correr un buen rato el agua estacionada.

Las soluciones de cobre  $1:5.10^7$ , pierden parte de su actividad después de esterilizadas en recipientes de vidrio. El agua destilada también.

No se nota esta diferencia si se usan recipientes de vidrio de Jena.

Diluciones de peptona al 0.001 por ciento inhiben la acción oligodinámica.

Thiele y Wolf (13) en 1899, emplean en sus experimentos metales químicamente puros preparados por ellos mismos. Utilizando láminas metálicas encuentran que se manifiestan activos sobre estafilococos, Ag y Hg. Son inactivos Au, Pb, Sn, Fe, Zn, Mg, Al. En forma de polvo metálico obtuvieron resultados algo discrepantes, pues se comportaron como activos Sn, Cu y Mg (de Schuchardt); el magnesio de Merck era inactivo.

Poniendo en contacto las láminas de Ag colocadas en el medio de cultivo con otros metales (Pb, Pt, Au), puestos fuera de él, no observó un aumento de su actividad la que en cambio disminuía si establecía contacto con Cu. Igualmente obtenía que metales inactivos como Pd y Pt se manifestaban activos al ser puestos en contacto con metales fuertemente positivos (Fe, Zn, Al, Mg).

En 1901 v. Esmarch (14) aplica a picaportes de hierro y latón gotas de caldo con estreptococos, difteria, prodigioso, extendidas en una fina capa que se seca en seguida. Sobre el hierro mueren los estreptococos en 30', difteria en 45' y prodigioso resiste más de 24 horas. Sobre el latón mueren estreptococos en 5'' difteria en 2' y prodigioso en 9 horas.

La humedad favorecía la acción bactericida. Sobre picaportes de níquel no se notó acción apreciable.

Schenk (15) hace ensayos (1901) con cultivos de bacteria prodigiosa en gelatina y encuentra inactivos Pb, Sn, Fe y Au mientras que la Ag y Zn forman zonas estériles de 15 y 25 mm. de ancho. El punto de fusión de estas zonas era mayor ( $40^{\circ}\text{C}$ ) que el resto de la placa.

Hoffmann (16) trata con éxito heridas infectadas usando preparados de estaño y cobre (Epithol Silber-Epithol Gold).

Bohtz (17) comprueba estos resultados y los amplía ensayando la actividad de diversos polvos metálicos sobre heridas y placas de agar infectadas. Los esporos de carbunco no desarrollan si están bajo la acción del Cd, Mg, Co, Cu, Ag, Bi, Zn, Epithol Silber y Epithol Gold. Son activos sobre estafilococos, puestos en orden decreciente: Zn, Cu, Ag, Co, Ni. Los polvos metálicos impiden también el desarrollo en ascitis.

El descubrimiento de Nageli de la acción algicida de las soluciones muy diluidas de cobre encontró su primera aplicación práctica en la destrucción de las algas que suelen pupular en las aguas destinadas al

consumo de las ciudades, las que ocasionan perjuicios e inconvenientes de diversa índole.

Moore y Kellermann (18) (1905) y Kellermann y Beckwith (19) (1906) hacen en Norte América los primeros ensayos y encuentran que la adición de sulfato de cobre a las aguas no sólo impide el desarrollo de las algas, sino que también provoca la destrucción de gran cantidad de bacterias banales y patógenas. Basset Smith (20) halla que una parte de sulfato de cobre en 10.000 de agua destilada destruye los coli bacilos y Fowler (21) comprueba que una parte de sulfato de cobre en 60.000 de agua, requiere 24 horas para lo mismo.

Clark y Gage (22) comprueban que este método de esterilización es inseguro y que la destrucción de todos los gérmenes requerirá una concentración mínima de 1:1000 de Cu, lo que es inaplicable por el gusto desagradable y la toxicidad que transmite al agua. Phelps, (23) por su parte, encuentra que las aguas suelen contener sustancias que impiden la acción del cobre. También parece que el anhídrido carbónico y los hidrocarbonatos disueltos en el agua tienen una influencia favorable en la acción del Cu (24).

Posteriormente (1909) Goodnough (25) recomienda el sulfato de Cu en diluciones 1:100.000 a 1:50.000.000 para destruir las algas de las aguas de consumo y comprueba que esta adición no acarrea ningún inconveniente, pues todo el cobre es fijado por las algas y el lodo en suspensión.

En 1912 publica Kellermann (26) un cuadro en el que expresa las cantidades de sulfato de cobre necesarias para destruir los organismos que dan mal olor al agua. Para la *Spirógira* y *Uroglena* bastan 0.05 partes en 1.000.000 de agua, mientras que *Schenedesmus* y *Kirchneriella* requieren 10 partes. Tomando el valor medio de las concentraciones necesarias para los distintos organismos resulta una proporción de 1.3 partes de sulfato de cobre en un millón de agua. Algunos peces pueden tolerar cantidades de cobre que no excedan de 0.15 a 2.10 partes de sulfato de cobre en un millón de agua.

Bado (27) (1915) consigue destruir las algas en los depósitos de decantación de la Recoleta y Palermo con una adición de dos partes de sulfato de cobre, en 1.000.000 de agua y comprueba que dicho metal no pasa a las aguas de consumo.

En 1906 hace Kramer (28) los primeros ensayos prácticos de esterilización de agua con cobre metálico. Infecta con cultivo de tifus y cólera agua destilada y le sumerge chapas de cobre. Consigue una esterilización completa empleando 9 centímetros cuadrados de cobre por litro de agua.

Höbener (29) repite en 1909 y confirma los experimentos de Vincent. Encuentra que las monedas de cobre tienen un término medio de 5043 gérmenes, níquel 3236, plata 2902 y oro 4603. Entre los gérmenes abundan los cocos (nunca diplococos o estreptococos) hongos (*penicilium glaucum* y *aspergillus niger*) y a menudo bacilo subtilis, mesentérico y *proteus vulgaris*. Jamás encontró colibacilo en las monedas. Frotando escrementos sobre distintas monedas encontró que desaparecía el colibacilo en 4 días en las monedas de oro, en 3 o 4 días en la de níquel, en 3 días en la de plata y cobre, mientras haciendo esta operación sobre placas de vidrio, aún a los 14 días se conservaban los colibacilos vivos.

Posteriormente, Christian, (30) establece que actuando sobre suspensiones en agua corriente de coli, tifus, disentería y cólera, ocupa el cobre el primer lugar por su actividad esterilizante y le siguen el latón el Zn y el Fe. Plomo es muy poco activo y el níquel nada. Si la suspensión de gérmenes se hacía en orina normal no se obtenían ya estos resultados.

En 1911 publica Bitter (31) un muy extenso trabajo sobre muerte de bacterios sobre los metales y materiales de construcción más importantes, y si bien tienen numerosos experimentos personales, sobre tifus, cólera y áureus, suspendidos en agua y áureus suspendido en orina, no aporta datos nuevos al asunto que nos ocupa.

Matonek y Reitmann (32) (1915) estudian la acción de las monedas sobre medios de cultivo y comprobando todos los hechos conocidos, encuentran además que levaduras, oidium, monilias y hongos son nada o poco (levaduras) influenciados por los metales, por lo que en ciertos casos pueden usarse los medios *metalizados*, es decir, que han estado en contacto con metales, para obtener sus cultivos puros. Encuentran también que las cenizas del agar *metalizado* con Cu y Ag contienen estos metales.

En el mismo año publica Spiro (33) un trabajo en el que trata de establecer si realmente existe una diferencia entre las acciones *tóxica* y *oligodinámica* del Cu, tal como la estableció v. Naegeli. Encuentra que se trata de diferencias de grado solamente, en la manera de actuar, correspondiente a las diferentes concentraciones en que se observan dichas acciones.

En 1916 vuelve a ocuparse Spiro (34) de oligodinamia. A propósito de los experimentos de Loeb y Bullot, en los que éste halla que el Cl Na neutraliza la acción tóxica del agua destinalada sobre el *Gammarus* y que el agua destilada en aparatos de cobre requiere más cantidad de dicha sal para obtener el mismo efecto, hace numerosos experimentos en los que encuentra que las sustancias que favorecen la solubilización del Cu aumentan la acción oligodinámica de este metal y las sustancias *antagonistas* la inhiben. Son sustancias *antagonistas* las que provocan una desionización del cobre, ya sea precipitándolo, o bien disminuyendo la disociación iónica de sus sales, o formando iones complejos, etc., etc.

Con estas publicaciones inicia Spiro una faz racional del problema de la oligodinamia. Vamos a encontrarnos ahora con numerosos trabajos aparecidos en estos últimos años en los que fundamentalmente se trata de buscar una explicación a esta manera de actuar tan particular de los metales, principalmente del Cu, Ag, Hg; se hacen nuevos experimentos, se descubren hechos nuevos, aparecen nuevas hipótesis, etc. Pero sigamos por ahora con esta reseña histórica, sin entrar todavía en la discusión.

El primer trabajo de Spiro fué indirectamente provocado por la guerra europea. Con motivo de que la infantería francesa usaba balas de cobre puro, quiso estudiar su toxicidad. Análogo origen tuvo un extenso trabajo publicado por Messerschmidt (35) en 1916). Encuentra este autor que dichas balas tienen acción oligodinámica como cualquier otro objeto de cobre; que el óxido de cobre se comporta idénticamente

al cobre metálico; que Ag y Cu químicamente puros son menos activos que los productos técnicos. Finalmente, ensayando sobre metales purísimos, comprueba que actúan sobre agar, fuertemente desinfectante: Cu, Sb, As, Zn, Mg y Pb. Son menos activos Ag, Cd, Bi, Mn y Ni. Son inactivos Au, Hg, Al, Fe, Pd y Pt.

Saxl (36) (1917) buscando una interpretación física de la acción de los metales, observa hechos nuevos: los metales subdivididos o en polvo son más activos que en trozos; interponiendo papel o pergamino entre el metal y el agar, actúan lo mismo como germicida, no así si se pone parafina.

Poniendo dos metales sobre la capa de agar infectada, nota que si están en contacto existe una influencia notable sobre la acción germicida que desarrollan. Todo lo conduce a admitir que la acción oligodinámica tiene una esencia especial, de carácter físico, que la diferencia fundamentalmente de la toxicidad química.

Más adelante (1917) encuentra Saxl (37) que la plata puede activar recipientes de vidrio, los que quedan utilizables para guardar agua de bebida que se esterilizaría en pocas horas. La destrucción no es completa para los gérmenes banales, pero sí para los patógenos (coli, Shiga-Kruse, cólera, paratífus B, tífus).

Pfeiffer y Kadletz (38 y 39) (1917) encuentran un nuevo reactivo para la actividad oligodinámica del cobre: la fucsina decolorada. En una placa de agar adicionado de este reactivo, sobre la que se deposita un trozo de cobre, se ve aparecer alrededor de éste, una zona roja de igual forma a la zona estéril que se observa en las placas infectadas. Con este nuevo indicador pueden comprobar los hechos conocidos referentes a la actividad del cobre, y su variación al ser puesto en contacto con otros metales. Comprueban además que el cobre calentado al rojo y oxidado es más activo que el metal brillante. La acción del Cu sobre este reactivo no se manifiesta en una atmósfera de ázoe libre de oxígeno o fuera del contacto del aire. En cambio el oxígeno no es necesario para que el Cu active recipientes de vidrio.

S. Wollmann (40), estudiando las hemolisinas producidas por algunos vibriones, en este instituto, descubrió que colocando metales sobre las placas agar-sangre se producía una zona amarillenta en su derredor, a las 24-48 horas de ser mantenidas en la estufa. Tanto monedas como trozos de metal presentan esta propiedad, la que no fué hallada en Au, Pt, Al y Pb. En medio líquido (solución fisiológica) sólo el hierro produjo hemólisis parcial en 24 horas. Hay concordancia entre los metales que producen hemólisis sobre agar y que actúan germicidas.

Más tarde Pfeiffer y Kadletz (39) encuentran que las soluciones de  $SO_4$  Cu actúan sobre su reactivo hasta una dilución  $10^{-15}$ , en la que todavía se manifiesta la actividad germicida. Las sales de Fe y Ag producen también la coloración aunque no en forma tan sensible como el Cu.

Baumgarten y Luger (41) encuentran un indicador aun más sensible para Cu y Ag, que la fucsina decolorada. Soluciones muy diluídas de estos metales inhiben o restringen la acción de la diastasa sobre el almidón. Este efecto es bien sensible para una solución de Ag al 20 %

diluída 1:10<sup>19</sup> y para una solución de Cu al 30 % diluída al 1:10<sup>10</sup>. Para la Ag no hay reactivo comparable y para el Cu el reactivo de Pfeiffer y Kadletz no acusa diluciones mayores a 1:10<sup>6</sup> y el de F genstecher 2:10<sup>7</sup>.

Después encuentran Baumgarten y Luger (42) que esta acción inhibitoria la ejercen las soluciones diluídas de Cu y Ag no sólo sobre la diastasa, sino también sobre las toxinas diférica y tetánica y la tripsina.

Esta acción destructora de Cu y Ag sobre las toxinas fué confirmada por Erdstein y Fürth (43), quienes además comprueban que la toxina (tetánica) fija Cu, y que pierde simultáneamente su propiedad tóxica y antigénica in vivo (en lauchas).

Elena Langer (44), observa que haciendo actuar soluciones tan diluídas de Cu y Ag como las usadas por Baumgarten y Luger, sobre hojas asoleadas de *Tropeolum Majus*, se nota que la solubilización del almidón no se produce tan rápidamente como en las hojas testigos, lo que también se verifica en la spirógira.

Matsunaga (45) ha ensayado el poder germicida de Cu y Ag en láminas y en polvo para las infecciones de carbunco, neumococo, difteria y tétano, con resultados favorables, sobre todo cuando empleaba el metal en polvo.

Bail (46) (1919), cree encontrar un paralelismo, aunque no absoluto, entre la acción oligodinámica de Ag, Cu, Hg, As y el comportamiento de los gérmenes para con el reactivo de Gram.

Löhner (47) (1919), estudia las zonas estériles que producen Cu y Ag sobre agar, el aspecto de dichas zonas, y emite una teoría del fenómeno, de la que más adelante hablaremos.

En 1919 observó Saxl (48), que las substancias que tienen actividad oligodinámica pueden ejercer su acción a través de una capa de aire. Tales son Cu, Ag, Cl<sup>2</sup>Hg. Los cuerpos (recipientes, agua, etc.), activados adquieren la propiedad de reducir al permanganato de potasio.

Salus (50) estudia la acción de Ag sobre paramecios y la acción de éstos sobre el agua activada. El agua pura es más fácilmente activable que el agua con paramecios. El agua activada pierde su propiedad germicida por repetidas siembra de gérmenes. El agua se activa más fácilmente que el agar. La ebullición no influye sobre la actividad del agua.

Streck (51) encuentra que el Cu es muy activo destructor de los gérmenes del grupo paratipus-coli, que la acción de una lámina de Cu es proporcional a su superficie, el tiempo de contacto, e inversamente proporcional al volumen de agua tratada.

Spät (52) (1920), repite los experimentos de Saxl sobre la acción del Cl<sup>2</sup>Hg a través de una capa de aire. Encuentra que esta acción a distancia se ejerce no solo sobre las placas infectadas, sino también cuando la siembra se hace sobre una placa anteriormente *activada* a distancia antes o después de agregado el agar. Las placas de vidrio expuestas 2 o 3 horas a pocos centímetros del bicloruro de mercurio pierden su actividad si son repasadas con una gasa.

Süpfle (53) (1920), no encuentra diferencia entre toxicidad química y acción oligodinámica, empleando numerosas sales de un mismo



metal. Las soluciones diluídas actúan más lentamente que las concentradas, y el efecto de estas es perfectamente gradual con la variación de la concentración. El agua activada por Cu y Hg pierde su actividad por adición de S (NH<sup>+</sup>)<sup>2</sup>.

Weltman (54) (1920), confirma las ideas de Spät en desacuerdo con Saxl referente a la acción a distancia del Cl<sup>2</sup>Hg. Igualmente, el poder de reducir el MnO<sup>+</sup>K adquirido por el agua activada es debido a impurezas orgánicas del aire o también al hecho de haber sido conservada en recipientes con tapas de corcho.

Luger (55) (1920), también encuentra que el bicloruro de mercurio actúa químicamente, es decir, que por sublimación se condensa e intoxica al medio de cultivo colocado a distancia.

Olga v. Plotho (56), ha estudiado la acción de los metales coloidales sobre protozoarios y sólo el Au no se ha manifestado activo, siéndolo, en cambio, los soles de Cu y Ag, muy enérgicos. Los protozoarios fijan el metal en su membrana externa cuando se procede en medio ácido, lo que no sucede si el medio es alcalino.

Acél (57) (1920), estudia la activación del agua por plata metálica y puede comprobar que dicha agua activada ha disuelto Ag y que la presencia de sulfuro amónico inhibe la acción oligodinámica.

Doerr (58) ha publicado últimamente algunas investigaciones sobre la acción oligodinámica de la plata. Encuentra que el agua activada por este metal se comporta como una solución de desinfectante; puede ser hervida, concentrada por evaporación, diluída, etc. El ClNa se comporta como antagonista e igualmente el suero de caballo disminuye o inhibe la actividad. Las soluciones oligodinámicas no demuestran acción específica sobre determinados gérmenes ni aún una acción diferente sobre gérmenes banales y patógenos. Las soluciones diluídas de sales de Ag se comportan idénticamente al agua activada por Ag metálica.

En una segunda publicación Doerr (59) comprueba que hirviendo en agua repetidas veces la plata, o calentándola al rojo pierde su propiedad activante, así como si se la mantiene varios días sumergida en agar. Recupera su propiedad al ser puesta en contacto con ácidos diluídos. El agente activante del agua es dializable. Doerr encuentra que las soluciones oligodinámicas son también hemolíticas, hecho anteriormente descubierto por S. Wolmann.

En su última publicación encuentra Doerr (60) que la plata inactivada por incandescencia recupera su propiedad activante por largo contacto con el aire. También una determinada superficie de Ag puede activar una cantidad limitada de agua, pero usando distintas láminas de plata y con repetidos contactos puede aumentarse sensiblemente la actividad del agua. Tifus, paratífus A y B se comportan en forma distinta al coli, sembrados en placas de agar en contacto con Ag. Si el medio contiene lactosa se acentúa la diferencia, la que quizás pudiera utilizarse para caracterizar aquellos gérmenes en presencia de gran cantidad de coli.

Hess y Reitler (61) (1920), quieren comprobar si estos fenómenos oligodinámicos que hasta ahora sólo se habían estudiado sobre seres inferiores (bacterios, algas, protozoarios), se manifiestan también en

los seres superiores; es decir si las soluciones diluidísimas de sales metálicas o líquidos *activados* influyen en los procesos vitales de éstos.

Eligen para comenzar sus estudios, la acción de dichas soluciones sobre los eritrocitos, y encuentran que se produce la hemólisis, ya observada por Wolmann y Doerr y también descripta por Hausmann y Kerl (62) para diversos metales.

Debemos hacer constar aquí que la acción de las soluciones metálicas diluidas sobre los vertebrados inferiores ha sido objeto de numerosas investigaciones experimentales. Ya en 1881 publica Richet (63) un trabajo en el que consigna las cantidades mínimas de metal que debe contener disuelta el agua para ser tóxica para los peces. Para causarles la muerte en menos de 48 horas bastan las diluciones, referidas a 1.000.000 de partes de 0.3 de Hg, 3.3 de Cu, 8.4 de Zn, 14 de Fe, etc., etc. Los metales menos activos son Mg, Ca y Na, cuyas concentraciones tóxicas son respectivamente de 1.5, 2.4 y 24 por mil.

Hay trabajos posteriores en los que se consigna que la toxicidad del agua destilada para ciertos vertebrados inferiores puede ser debida a las pequeñísimas cantidades de Cu que tiene disuelta. En la tesis de Mlle. Ledebt (64) (1914), hay una reseña de estos trabajos (no cita a Richet), e investigaciones personales sobre peces y larvas de batracios. Kellermann (26) se ha ocupado también de este asunto (1).

Hess y Reitler no experimentan con placas de agar sangre, sino que activan con distintos metales la solución fisiológica y luego le agregan suspensión al 5 % de glóbulos lavados. Encuentran así que Cu es fuertemente hemolítico, que su acción es favorecida por la temperatura y que la luz parece ser indiferente. El suero disminuye o inhibe la acción del Cu, pero con tiempo suficiente de contacto, o diluyendo el suero, se logra activarlo. La acción hemolítica disminuye proporcionalmente a la cantidad de glóbulos, y es independiente del tiempo de contacto con la solución oligodinámica. Es decir, que glóbulos sumergidos unos instantes en solución oligodinámica, centrifugados, lavados y suspendidos en solución fisiológica, se hemolisan igualmente que dejados todo el tiempo en contacto con el líquido activo. El líquido separado de los glóbulos pierde su actividad hemolisante. Finalmente comprueban que con suspensiones al 5 % de glóbulos, se manifiestan hemolíticos además del Cu, el Cd y el Pb. Con suspensiones al 0.1 % son todos los metales hemolíticos, aunque en diverso grado. Según su actividad, ordenan así los metales en orden decreciente: Cu, Cd, Pb, Ag, Ni, Mo, Sn, Sb, Al.

Bechhold (65) estudia también el problema de la oligodinamia, y la acción hemolisante de diversas combinaciones mercuriales y parece encontrar que la hemólisis que produce el  $\text{Cl}^2\text{Hg}$  (hasta diluciones 1:150.000) el Hg, el  $\text{HgO}$ , etc., es un fenómeno producido por la molécula y no por los iones mercurícos (66).

---

(1) En un trabajo publicado en 1920 por el Prof. Dr. V. Linden (*Centralblatt f. Bakt. etc. I Abt. Originale*. Tomo 85, p. 136) y que a última hora llega a nuestro conocimiento, hay una serie de datos históricos, desde 1807, sobre la acción tóxica de las soluciones diluidas de cobre.

Seiffert (67) (1920), estudia los aspectos de la zona estéril y sus bordes en relieve, cual se observa en agar sembrado con gérmenes del grupo coli-tifus, en el que se colocan monedas de plata o cobre. Löhner, ocupándose anteriormente de lo mismo, interpreta el aspecto de dichas zonas que presenta tres partes características: la estéril, la de gran crecimiento (anillo en relieve) y la de desarrollo normal, como consecuencia de la ley de Arndt, conocida en farmacología, según la cual diluciones crecientes de una sustancia producen efectos tóxicos, estimulantes y dejan de actuar. Seiffert confirma en algunos casos las observaciones de Löhner.

Laubenheimer (68) ha publicado un extenso e interesante trabajo en cuya primera parte refuta las ideas de Saxl, con numerosos experimentos, de los que se deduce que la acción oligodinámica está acompañada de la solubilización del metal. Comprueba así que el  $\text{Cl}^2\text{Hg}$  (sólido o en solución acuosa) y Hg pasan en solución a través de una membrana de goma (dedo de guante) y que el sulfuro de amonio destruye la acción activante de los recipientes que han contenido solución oligodinámica de mercurio, lo que corrobora las observaciones de Süpfle y Acél. En la segunda parte de su trabajo, Laubenheimer estudia el lado práctico de la acción oligodinámica y encuentra que la esterilización de aguas por plata metálica no es eficaz si la cantidad de gérmenes contenida es muy grande. Comprueba que la acción de los metales sobre toxinas, observada por Baumgarten y Luger, sólo afecta al grupo toxóforo, dejando intacto su poder inmunizante. Las toxinas de tétano, difteria, disenteria (Shiga-Kruse), pierden su poder tóxico, pero conservan su calidad de antígenos.

El Cu y Ag no se comportan igualmente con las diferentes toxinas.

Luger (69) estudiando la acción regeneradora de ciertas sales sobre la diastasa inactivada por Cu o Ag, encuentran esta propiedad en  $\text{ClK}$ ,  $\text{S}^2\text{O}^3\text{Na}^4$  y  $\text{ClNa}$  y en forma más manifiesta para la diastasa inactivada por el Cu.

El agua activada por  $\text{ClAg}$  en influenciada por  $\text{ClNa}$ ,  $\text{S}^2\text{O}^3\text{Na}^2$  y  $\text{CO}^3\text{K}^2$ . El autor cree que debe admitirse la solubilización del metal en la acción oligodinámica, y desecha, por lo tanto, las ideas de Saxl.

Falta y Richter-Quithner (70) activan agua destilada por largo contacto con diversos metales y por el comportamiento de esta agua con diversos reactivos (tintura guayaco, bencidina, resorcina, azul de metileno, índigo, albúminas, etc.), establecen una escala de actividad de dichos metales, encabezada por Cu, Hg, Ag, y considerando que provocan acciones catalíticas típicas, se debe admitir que la acción oligodinámica, es debida a los iones metálicos contenidos en soluciones enormemente diluídas.

Zerner y Hamburger (71) encuentran que la toxicidad de las combinaciones difícilmente solubles de Ag sobre las levaduras depende no sólo de sus solubilidades, sino que también parece existir una relación entre la cantidad de sal insoluble agregada y la cantidad de levadura sometida a la intoxicación.

Hess y Reitler (72) han descrito la acción de los metales sobre los sueros. El Cu precipita los sueros frescos, pero no los sueros con-

servados. Creen exista una relación entre la acción del Cu y la presencia de complemento en el suero.

Ultimamente Saxl (49), en una conferencia que dió en Praga, al exponer el estado actual del problema de la oligodinamia, insiste en sus ideas sobre el carácter especial de este fenómeno, diferente al producido por las soluciones metálicas diluídas.

## II

Antes de entrar a discutir las diversas cuestiones que plantea el fenómeno de la oligodinamia, veamos cuáles son los hechos fundamentales adquiridos, que puedan darnos argumentos para esta discusión:

a) Diversos metales puestos en contacto con el agua le transmiten a estas propiedades germicidas (*agua activada*);

b) Las soluciones diluídas de estos metales se comportan en forma idéntica al agua activada por los mismos;

c) Los recipientes no metálicos que han conservado un tiempo agua activa, pueden activar al agua que posteriormente se guarde en ellos;

d) Esta propiedad de los recipientes *activantes*, desaparece lavando sus paredes con HCl,  $\text{NO}^3\text{H}$ , diluídos, o con sulfuro de amonio;

e) Colocando estos metales sobre medios sólidos de cultivo (agar, gelatina) infectados, provocan la formación de una zona estéril en su derredor;

f) Metales inactivos pueden ser activados por el contacto de otros y en cambio otros pueden perder su actividad;

g) En muchos casos ha podido comprobarse que dichos metales se disuelven parcialmente en los medios de cultivo en que actúan;

h) Algunas sales y óxidos metálicos, insolubles, se comportan en igual forma que sus respectivos metales;

i) Los líquidos o medios *activados* demuestran propiedades hemolisantes;

j). Presentan también la propiedad de disminuir o anular la acción de los fermentos, la toxicidad de las toxinas, sin afectar la actividad antigénica de éstas;

k) El agua activada por los metales puede ser hervida, concentrada, etc., sin perder su propiedad;

l) La acción germicida del agua puede desaparecer por repetidas siembras de gérmenes, por adición de coloides o suspensiones finas, o de precipitantes químicos del metal activante;

m) Algunos metales y sales metálicas pueden *activar* sustancias a través de una capa de aire o de ciertos cuerpos sólidos (papel, pergamino, goma, etc.);

n) Se ha comprobado que en estos casos ha habido transporte de sustancia activante hacia el medio activado;

o) La activación del agua por Cu y Ag no se produce fuera del contacto del aire o en una atmósfera libre de oxígeno;

p) El principio activante del agua es dializable.

La primera cuestión que plantea este problema de la *oligodinamia* y a la que preferente atención le han prestado los investigadores, es la de dilucidar cómo es que pueden actuar con tanta energía los metales por su sólo contacto con el agua o medios de cultivo. ¿Se produce la disolución del metal? ¿Es necesaria esta disolución para activar los medios? ¿Si el metal pasa en solución, se encontrará al estado coloidal o de verdadera solución?...

La segunda cuestión que sugieren todos estos hechos, y admitido que el metal pase en solución, es la de explicar la acción tan notable ejercida por diluciones tan extremas, por cantidades tan pequeñas de sustancias.

A este problema, que en realidad es mucho más amplio, pues se refiere a todos los fenómenos enzimáticos, catalíticos en general, a la desinfección en particular, etc., etc., sólo incidentalmente lo hemos tocado y ya volveremos sobre él cuando expongamos unos experimentos que hicimos buscando la solución de un caso particular.

Veamos primero cuáles han sido las soluciones hasta ahora propuestas para la primera cuestión que planteamos.

Miller, el primero en observar la acción germicida de los metales, del oro sobre todo (oro impuro), supuso que este metal condensaba oxígeno del aire en su superficie, oxígeno que al desprenderse en el medio de cultivo, destruía los gérmenes. Esta idea quedaba confirmada por la observación de que calentando el oro al rojo perdía su actividad.

v. Naegeli, Behring, Credé, etc., comprueban que el metal activante se disuelve en el medio activado y además que este se comporta igual que las soluciones muy diluídas de las sales de dicho metal. Admiten por supuesto, que la activación es consecuencia de la disolución del metal.

Saxl cree que la acción oligodinámica es debida a una forma especial de energía que actúa a distancia y a través de diversos medios. La solubilización del metal comprobada por diversos autores sería un fenómeno concomitante e independiente de la activación. Posteriormente todos los investigadores comprueban que en los casos de acción a distancia observados por Saxl hay transporte material de sustancia activante.

Spiro puede observar que las sustancias que favorecen la disolución de los metales aumenta su actividad germicida, y que las *antagónicas*, es decir, aquellas que dificultan su pasaje al estado de ión, la disminuyen.

Pfeiffer y Kadletz, utilizando su reactivo (de dudoso valor) encuentran que la acción oligodinámica es concomitante con la presencia del Cu disuelto. La influencia recíproca de los metales es explicable, por fenómenos eléctricos que como es sabido, pueden provocar o impedir su disolución.

Baumgarten y Luger llegan a la convicción de que la acción oligodinámica responde a un proceso de solubilización del metal, pues no han podido notar diferencia entre la manera de actuar del metal sólido, y de las soluciones diluídas de sus sales.

El aspecto de la zona estéril que se observa en el agar infectado, alrededor de un trozo metálico, es interpretado por Löhner, Luger, Seiffert, etc., como debido a la concentración decreciente que por difusión toma el metal a medida que se disuelve.

Salus y Messerschmidt admiten que el metal se incorpora al medio activado, en forma de *partículas sutiles* (Salus) o atacado por ácidos preexistentes o que se producen en el medio. Behring también atribuía a las sustancias producidas por los gérmenes, la solubilización de los metales y explicábase así, los distintos comportamientos observados según los metales y los gérmenes con que experimentaba.

Acél comprueba que la plata es inactiva en presencia del sulfuro de amonio que la insolubiliza, y Laubenheimer y Süpfle hacen igual observación con Cu y Hg. Recordemos que Naegeli, al encontrar que el caolín, el negro de humo, algunos coloides, etc., impedían la actividad oligodinámica, encontró una explicación en la adsorción. Estas sustancias pueden fijar la sustancia activa, la que desaparecería de la solución.

Citemos por último que Doerr encuentra que el agua activada por Ag, se comporta en muchos sentidos como una solución salina, y que Laubenheimer demuestra que el  $\text{Cl}^2\text{Hg}$  puede atravesar una membrana de goma, con lo que resulta innecesaria la interpretación de Saxl de una acción física ejercida a distancia para este caso por el observado (acción oligodinámica del  $\text{Cl}^2\text{Hg}$  a través de un dedo de guante de goma).

Es indudable que este cúmulo de observaciones lleva a la convicción de que la solubilización del metal produce la activación oligodinámica, pero debe reconocerse también que ningún hecho prueba que esta solubilización sea una condición necesaria.

El hecho de que agregando *precipitantes* se inactivan las soluciones no es un argumento convincente, pues sabemos que hay muchos cuerpos insolubles y activos, tales como  $\text{CuO}$ ,  $\text{Cu}^2\text{O}$ ,  $\text{HgO}$ ,  $\text{Ag}^2\text{O}$ , etc.

El  $\text{S}(\text{NH}^4)^2$  inhibe la propiedad activante de Ag, Cu, etc. Los sulfuros de estos metales, aunque insolubles podrían ser activos, y siempre podríamos explicar la inactividad observada, como causada por la intoxicación que aquel reactivo ejerce sobre el principio activante. Son muy conocidos en catálisis los fenómenos de esta naturaleza que bien pudieran presentarse también en los de oligodinamia.

Creemos por lo tanto que hace falta un argumento experimental que decida la cuestión. Si se demuestra que *cuando no hay solubilización del metal no hay activación oligodinámica*, tendremos la prueba decisiva para afianzar la teoría química.

Fué en ese sentido que orientamos nuestras investigaciones, iniciándolas con el estudio del Cu, al que seguirá el de la Ag.

El Cu es especialmente favorable para estos experimentos, por ser bien conocidas sus condiciones de solubilidad, y por contar con una buena serie de reacciones sensibilísimas que permitirán revelar su presencia en los medios que se ensayen.

Lo lógico es empezar por el estudio del caso menos complejo o dirigirse a este para buscar la explicación del fenómeno. El caso menos complejo de oligodinamia es el de la activación del agua destilada, y este caso es el que hemos investigado.

Llama la atención, revisando los trabajos hasta ahora realizados, que los investigadores se hayan colocado siempre ante casos tan complejos, como es el de una moneda en contacto con un medio de cultivo, y la falta de rigor que ponen en el análisis de los resultados.

Spiro es el primero, después de v. Naegeli, y quizás el único que aborda el problema en una forma racional y metódica, estableciendo las condiciones que favorecen o disminuyen la actividad oligodinámica. Sin embargo, Spiro experimenta con soluciones relativamente concentradas de metal (Cu) y no tiene en cuenta la atmósfera en que trabaja, y que como veremos, es un factor decisivo en ciertos casos.

Pfeiffer y Kadletz observan que en una atmósfera de nitrógeno libre de oxígeno, o fuera del contacto del aire, el Cu no actúa sobre la fucsina decolorada. Esto nada nos dice sobre la disolución del Cu, pues el reactivo sólo lo revela en presencia del oxígeno.

Las observaciones de Doerr son también muy deficientes, pues no se coloca en condiciones rigurosas de experimentación y llega a formular conclusiones que no resisten la crítica.

*Condiciones de solubilidad del Cu en agua.* — El Cu a la temperatura ambiente no es atacado por el agua destilada y es completamente insoluble en ella. En presencia de  $O^2$  se oxida gradualmente pero no entra en solución.

Los ácidos diluídos tampoco atacan al Cu y tampoco lo disuelven por lo tanto. Sólo las soluciones de  $SO^2$  lo disuelven lentamente con formación de ácido hidro-sulfuroso y de sulfito de cobre.

$Cu^2O$  y  $CuO$  son insolubles en agua pero bastan pequeñas cantidades de iones H para provocar su disolución. Estos iones H pueden ser producidos por cualquier ácido (incluso el  $CO^2$ ), sal ácida o sal hidrolizada en solución acuosa.

El cobre es soluble en los ácidos diluídos a la temperatura ambiente, en presencia de  $O^2$ , o de sustancias oxidantes.

*Vemos por lo tanto que el Cu sólo es soluble en agua en presencia de  $O^2$  (o sustancias oxidantes) y de iones H* (consultar al respecto las clásicas obras de Moissan (73) y Gmelin Kraut (74) y en particular los trabajos de Moritz Traube) (75).

*Reactivos sensibles del Cu.* — Muchos son los reactivos aconsejados para revelar pequeñas cantidades de cobre, basados en su propiedad de comportarse como una *oxidasa mineral*. Estas reacciones coloreadas se producen sólo en presencia de  $O^2$  y la más conocida es la de Röhmman Spitzer.

La de Pfeiffer y Kadletz que pertenece a la misma categoría tiene el grave inconveniente, de producirse en presencia de anhídrido carbónico (y ausencia de Cu) lo que ha conducido a sus autores a atribuirle mayor sensibilidad de la que realmente tiene. Podemos citar además las reacciones de Schönbein, Pagenstecher, Bourquelot, Denigés, etc.

Menos sensible pero más específicas son las reacciones de precipitación de Emich-Donau (76), (micro-reacción de precipitación del Cu sobre algodón pólvora impregnado de  $SZn$ ), de precipitación del Cu en medio amoniacal por el quinosol (77) y la de Baudisch (precipitación con cupferron o sea nitroso-fenilhidroxilamonio) (78).

Como nuestro interés estaba más en la sensibilidad que en la especificidad del reactivo, optamos por las reacciones coloreadas y entre ellas elegimos a la bien conocida de Röhmann-Spitzer ya usada entre nosotros por Damianovich (79).

Estudiamos por lo tanto la sensibilidad de esta reacción y comparándola con la de Pfeiffer-Kadletz obtuvimos los resultados que en seguida consignamos.

*Reacción Röhmann-Spitzer.* — El reactivo es una solución que contiene 1.5 grs. de parafenilediamina, 1.5 grs. de naftol y 1.5 grs. de NaOH en 100 cc. agua bidestilada. Se conserva muy bien fuera del contacto del aire. Usábamos su disolución 1 : 100.

A 3 cc. del líquido a ensayar agregamos  $\frac{1}{2}$  cc. del reactivo diluido y calentamos a  $100^{\circ}$  (baño-maría o ebullición directa). En presencia de Cu toma el líquido un color rojo violáceo de intensidad decreciente hasta la concentración de  $+ 0,00001$  Cu o/oo. Soluciones más diluidas dan también una coloración, pero su intensidad no es proporcional al contenido en Cu. Es así que obteníamos la misma coloración para concentraciones que variaban entre 0.00001 y 0.000 000 005 Cu o/oo. No hemos ensayado soluciones más diluidas. El agua bidestilada en recipientes de vidrio no da la reacción.

*Reacción de Pfeiffer-Kadletz.* — El reactivo se prepara agregando a un litro de agua bidestilada hirviendo 5 cc. de solución alcohólica saturada de fucsina básica y 25 cc. de una solución al 10 % de  $\text{SO}^3$  Na<sup>2</sup>. Por enfriamiento queda el reactivo débilmente rosado. En contacto con el aire se colorea de rojo rápidamente por acción del  $\text{CO}^2$  pero aún en ausencia de este y mucho más lentamente, se colorea en contacto del aire.

A 3 cc. de la solución, se agregan 0,3 cc. del reactivo. Tapamos el tubo de ensayo con un algodón enmebido en unas gotas de solución concentrada de NaOH. Calentamos en baño maría a más o menos 60 grados. En presencia de Cu, toma el líquido un intenso color rojo. La intensidad de esta coloración no es proporcional al contenido en Cu. Hemos observado iguales coloraciones en soluciones que contienen 0,001 Cu o/oo y cantidades menores hasta 0.00003 Cu o/oo.

Para esta última dilución se produce una caída repentina en la intensidad del color y ya en soluciones de 0.000 004 Cu o/oo la reacción que se observa es dudosa, comparándola con la debilísima coloración que siempre da el agua bidestilada. Según nuestras observaciones este reactivo no tiene la sensibilidad ( $10^{-15}$ ) que le atribuyen sus autores y es muy inferior al de Röhmann-Spitzer.



En el siguiente cuadro resumimos nuestras observaciones:

Concentración en Cu	grs. Cu por litro	Reactivo Röhmann Spitzer	Reactivo Pfeiffer Kadletz
$1 \times 10^{-6}$	0.001	+ + + + +	+ + + +
$3.3 \times 10^{-7}$	0.00033	+ + + +	+ + + +
$1.1 \times 10^{-7}$	0.00011	+ + +	+ + + +
$3.7 \times 10^{-8}$	0.000037	+ +	+ + + +
$1.2 \times 10^{-8}$	0.000012	+	+ +
$4.1 \times 10^{-9}$	0.0000041	+	
$1.4 \times 10^{-9}$	0.0000014	+	Reacción debilísima, dudosa, difícilmente diferenciable del tubo testigo con agua bidestilada.
$4.6 \times 10^{-10}$	0.00000046	+	
$1.5 \times 10^{-10}$	0.00000015	+	
$5.1 \times 10^{-11}$	0.000000051	+	
$1.7 \times 10^{-11}$	0.000000017	+	
$5.7 \times 10^{-12}$	0.0000000057	+	
0	Agua bidestilada	0	0

El número de cruces indica la intensidad relativa de las coloraciones, observadas directamente.

Las concentraciones que figuran en este cuadro fueron obtenidas por diluciones sucesivas en agua bidestilada, de una solución tipo que contenía 1 gr. Cu por litro. Los recipientes usados en todos estos experimentos (incluso tubos de ensayos) eran de vidrio Jena, lavados con mezcla sulfocrómica.

Debemos agregar que así como el anhídrido carbónico aún en pequeñas cantidades colorea el reactivo de Pfeiffer y Kadletz, este mismo gas, muy concentrado inhibe la reacción Röhmann-Spitzer. En las condiciones normales, el anhídrido carbónico del aire influye sobre el primer reactivo y no tiene acción sobre el segundo.

Con estos antecedentes nos planteamos la cuestión en esta forma: Poner agua destilada, en contacto con Cu puro, en distintas condiciones. Investigar cobre y actividad oligodinámica en el agua y observar si había concordancia entre solubilidad y actividad, y entre insolubilidad e inactividad.

El contacto Cu-H<sup>2</sup>O lo realizábamos en tubos de vidrio Jena, con una atmósfera gaseosa determinada y cerrados con el soplete. Usamos para nuestros experimentos Cu electrolítico químicamente puro de Kahlbaum y CuO en hilos, purísimos de Schuchardt.

Para preparar los tubos adoptamos el siguiente dispositivo: Estimamos tubos de ensayo de vidrio Jena de más o menos 25 mm. diámetro en la forma indicada en la figura 1 (a) para luego facilitar su cierre con el soplete. En la boca del tubo se adapta con un corcho un tubo en T (b) que deja paso a la alargadera (c) de vidrio resistente; (c) se adapta a un extremo estirado del tubo infusible (d), en cuyo otro extremo está fijado un tubo en Y (e). Las uniones de los tubos (b), (c), (d), están hechas por espesas membranas de goma adaptadas a las aberturas y con un pequeño agujero en su parte central. En esta forma el tubo puede introducirse más o menos en (b) sin que desaparezca el cierre hermético ni ofrezca gran resistencia al frotamiento, lo que no sucede usando tapones de corcho o goma. Además no influye en la eficacia del cierre la forma más o menos

cilíndrica del tubo (c). Lo mismo sucederá con la unión (c-d). Por otra parte teníamos dispuesto un aparato de destilación en la forma indicada en la figura 2. El refrigerante R-R y codo superior era un solo tubo de vidrio resistente y en su extremo inferior estirado, podía adaptarse la alargadera (c) ya descripta. Por el tubo (t) podía introducirse un gas para formar una atmósfera apropiada en el interior del destilador. El tubo a ampollas A evitaba el arrastre mecánico de gotas por los vapores, y aplicándole un algodón empapado en agua fría, permitía detener la destilación en el momento deseado, aunque siguiera circulando el gas introducido por (t).

Los tubos de vidrio Jena eran lavados con mezcla sulfocrómica hirviendo, luego con abundante agua corriente, agua bidestilada, finalmente mantenidos más o menos 20 minutos en corriente de vapor de agua hirviendo. Los conservábamos en soporte boca abajo.

Con todo esto dispuesto procedíamos de esta manera: colocábamos pequeños trozos de cobre en el tubo (d) (fig. 1) y adaptábamos los tubos (a-b-c). Por (c) introducíamos una corriente de  $H^2$  purificado a través de soluciones de nitrato de plata e hidrato de potasio y de cloruro de calcio seco y una vez purgado de aire el aparato, lo que se comprobaba ensayando el gas que salía de (f), se calentaba hasta el rojo el cobre. Al mismo tiempo calentábamos con un Bunsen el tubo (a) a fin de eliminar todo el aire absorbido en sus paredes. Dejábamos enfriar el aparato, e inclinando el tubo (d) se hacía caer el cobre en el interior de (a) manteniendo siempre la corriente de  $H^2$ .

Mientras tanto el destilador había sido puesto en marcha, introduciendo por el tubo (t) el gas en cuya atmósfera queríamos realizar el contacto sobre-agua. Separábamos la parte (a), (b), (c) de (d) y conectábamos rápidamente (c) con el refrigerante R. Introducíamos así en el tubo agua recientemente redestilada y una vez recogida cantidad suficiente, suspendimos la destilación sin interrumpir la corriente de gas. Haciendo deslizar la alargadera (c) a lo largo de (b), quedaba libre la estrangulación de (a) y podíamos cerrarlo con el soplete oxi-gas.

En los experimentos que usábamos óxido de cobre en vez de cobre, introducíamos el óxido de cobre en el tubo (d) (fig. 1), lo reducíamos con  $H^2$  y luego lo reoxidábamos en corriente  $O^2$  introducido por la segunda rama del tubo E. Con esta técnica operábamos con cobre libre de óxido y con óxido de cobre libre de anhídrido carbónico.

En algunos casos hemos debido modificar en parte esta técnica, según los materiales que empleábamos. Así por ejemplo, cuando agregábamos ácido sulfúrico al agua destilada, o cuando estudiábamos el contacto de  $Cu^2O$ , etc.

Al agua del destilador le agregamos  $CO^3HNa$ ,  $Ba(OH)^2$ ,  $Zn + NaOH$ , etc., según la atmósfera que deseábamos producir.

El anhídrido carbónico usado, es el comprimido en cilindros (Quilmes), lavado, secado en ácido sulfúrico, y privado de  $O^2$  haciéndolo pasar por un tubo de más o menos 30 centímetros con tela de cobre al rojo y finalmente al través de lana de vidrio.

El  $O^2$  lo sacábamos de tubos comprimidos (oxígeno puro medi-

cial) y lo purificábamos a través de potasa, cal sodada y ácido sulfúrico.

Preparados los tubos, lo dejábamos a la temperatura del laboratorio una temporada, agitando el contenido de vez en cuando. Oportunamente abríamos los tubos y decantábamos su contenido en vasos de vidrio Jena lavados con las mismas precauciones que los tubos. Tapábamos estos vasos con pequeñas cápsulas de vidrio. Sobre este líquido hacíamos las reacciones del cobre y determinábamos su actividad oligodinámica.

La acción bactericida de las soluciones se investigó sobre paratífus A., en la siguiente forma: 1 ansa normal de un cultivo en agar de 24 horas fué suspendida en 1 cc. de agua bidestilada. De esta suspensión madre se tomaba un ansa y se diluía en los tubos que contenían los líquidos que se debía investigar, esterilizados previamente por una corta ebullición. Se dejaron los tubos 24 horas a la temperatura ambiente en la obscuridad y con el contenido total se hacían placas con agar a 45°. Se contaban las colonias a las 24 y 48 horas. Hemos indicado con 0 la esterilidad y con  $\infty$  el número de gérmenes de la placa control y con varias cruces cuando el número de gérmenes era muy grande, pero inferior al del control. El recuento de gérmenes realizado en casi todas las ocasiones no ha permitido establecer una diferencia más importante que la indicada por estos signos.

Nº	Contenido	Contacto		en días Duración	Aspecto que adquiere el contenido	Reacción Rohmann- Spitzer	Actividad Oligodinámica
		Iniciado	Terminado				
6	Cu + H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub>	17 X 20	4 XI 20	18	no varía	0	∞
7	Cu + H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub>	27 X 20	28 X 20	1	no varía	0	∞
11	Cu + H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub>	2 XI 20	1 XII 20	29	no varía	0	∞
12	Cu + H <sub>2</sub> O + aire (*)	2 XI 20	4 XI 20	2	El metal se cubre de óxido	++++	0
16	Cu + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>	18 XI 20	1 XII 20	13	El metal se cubre de óxido	0	∞
17	Cu + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>	20 XI 20	4 I 21	45	El metal se cubre de óxido	0	∞
18	CuO + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>	9 XII 20	4 I 21	26	no varía	0	+++++
19	CuO + H <sub>2</sub> O + CO <sub>2</sub>	9 XII 20	4 I 21	26	El líq. toma un ligero tinte azul (***)	++++	0
20	Cu <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub>	15 XII 20	4 I 21	26	no varía	0	∞
22	Cu + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>	15 XII 20	4 I 21	62	El metal se recubre de óxido	0	+++++
23	CuO + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub>	12 I 21	15 III 21	62	no varía	0	+++++
28	Cu + SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> + O <sub>2</sub> (**)	13 I 21	15 III 21	61	El metal se recubre de óxido	++++	0
29	Cu + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	13 I 21	15 III 21	61	no varía	++++	0

(\*) Cu sin reducción previa en corriente de H<sub>2</sub>.

(\*\*) SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> agregado en cantidad calculada para que por adición del agua quedara una concentración  $\frac{N}{10.000}$ . Esta dilución tiene un valor de pH aproximadamente igual a la solución acuosa saturada de CO<sub>2</sub>; es decir pH = 5.

(\*\*\*) El líquido, en contacto con el aire, abandona un precipitado azulado, cristalino.

En este cuadro están resumidos los resultados obtenidos en nuestros experimentos y consignamos en él el número de tubo, su contenido, fecha en que lo preparamos, fecha en que lo abrimos para ensayar su contenido, días que duró el contacto de activación, observaciones sobre las variaciones de aspecto del contenido, y finalmente los resultados de la reacción de Röhmann-Spitzer y del ensayo de actividad oligodinámica.

Se ve inmediatamente el paralelismo existente entre disolución del cobre y activación oligodinámica. En los casos que no hay disolución del cobre, no se observa activación a pesar de que el contacto ha durado hasta más de dos meses.

En algunos experimentos, que por ahora no consignamos, obtuvimos resultados que aún no hemos podido interpretar en forma que nos satisfaga. Es probable que se trate de algún defecto experimental, por lo cual preferimos hacer un estudio más minucioso de estos casos, antes de emitir opiniones.

Sin embargo, los resultados más arriba expuestos nos permiten decir que:

1° El agua destilada, en contacto del cobre o sus óxidos, es activada siempre que las condiciones permitan una disolución del metal.

2° Cuando no hay disolución del metal no se produce la activación del agua.

3° El oxígeno es un elemento necesario para producir la activación del agua por el cobre, pero no es suficiente.

4° El cobre no activa el agua destilada en atmósfera de  $O^2$  o  $H^2$  ni aún después de 2 meses de contacto

5°  $CuO$  y  $Cu^2$  no activan el agua destilada, en atmósfera de  $O^2$  o  $H^2$ , ni aún después de un mes de contacto; en cambio en presencia de anhídrido carbónico la activación es muy enérgica.

Vemos que estos experimentos conducen a aceptar la teoría química de la activación oligodinámica, por lo menos en el caso del cobre.

El hecho de que el simple contacto no baste para activar el agua quita todo valor a las ideas de Löhner (47) que recurre a la teoría de Nernst (tensión de disolución de los iones) para explicar la solubilización del metal.

Habiendo en el aire los elementos ( $O^2$  y  $CO^2$ ) capaces de provocar la solubilización del cobre, se explica que en las condiciones que hasta ahora se ha experimentado — sin tener en cuenta la atmósfera — se observe siempre la activación del medio en contacto con el metal.

Tampoco creemos necesario recurrir a la acción de las substancias segregadas por los gérmenes (Behring (4), Messerschmidt (35)], ni a la acción del sudor, etc. (Messerschmidt (35)] para interpretar las zonas estériles sobre agar, la reducida flora microbiana de las monedas, etc.

Por otra parte, debemos admitir que el cobre forma verdaderas soluciones en los líquidos activados, y no que se halla al estado coloidal. Una prueba en este sentido son las mismas zonas estériles sobre agar, que implica una *difusión* del cobre, fenómeno que no podría verificarse tan rápida y netamente con soluciones coloidales.

Traube, Mengarini y Scala (80) han comprobado que en ciertas condiciones, plata, cobre y platino pueden pasar al estado coloidal, en contacto con el agua, y llegan a observar en las soluciones de cobre, partículas ultramicroscópicas.

Nosotros, en las condiciones que operábamos, no hemos podido observarlas en ningún caso, usando el condensador cardióide de Zeiss.

El cobre contenido en el agua destilada en recipientes de cobre, tiene un origen perfectamente explicable puesto que siempre hay suficiente aire (desprendido por el agua misma) en el interior del alambique.

Es interesante hacer notar con la rapidez que se produce la solubilización del cobre. Titoff (81) nota su acción oxidante sobre el sulfito de sodio en agua que ha estado unos segundos (más o menos 40'') en contacto con el cobre metálico. Damianovich (79) comprueba que basta tocar unos centímetros cúbicos de agua con un alambre de cobre, para que aquella actúa sobre el reactivo de Röhmann-Spitzer.

¿En qué proporciones se disuelve el cobre? Ya hemos visto nosotros la sensibilidad del reactivo de Röhmann-Spitzer superior a  $10^{-12}$  otros de la sensibilidad del reactivo de Röhmann-Spitzer superior a  $10^{-12}$  actúan todavía sobre el sulfito de sodio, sin que esto signifique un límite, pues no ha operado con diluciones mayores.

Nosotros, por nuestra parte, hemos comprobado que diluciones de sulfato de cobre conteniendo 1:3.000.000 de cobre metálico, destruyen totalmente en 24 horas unos 2.000 gérmenes de paratífus A suspendidos en 2 cc. de líquido. No hemos estudiado todavía mayores diluciones ni tiempos menores de acción. Ahora nos ocupamos en estudiar este límite, así como algunas particularidades que parece observarse en estas extremas diluciones.

Falta aún considerar la segunda cuestión que plantea el fenómeno de la oligodinamia: como explicar qué soluciones tan diluidas puedan actuar en la forma señalada.

Decíamos ya que esta misma pregunta debemos formularnosla cuando estudiamos los fenómenos catalíticos, las acciones diastásicas, la actividad de las toxinas microbianas, y en particular para nuestro caso cuando consideramos el problema de la desinfección en general.

Felizmente en los últimos años la físico-química se ha enriquecido con un nuevo capítulo que mucha ayuda puede prestarnos en la interpretación de estos fenómenos. Me refiero a la química capilar (Kapillarchemie), como la llama Freundlich o química coloidal (Kolloidchemie), según Ostwald o química de los dispersoides (Dispersoidchemie) de v. Weimarn, etc. Llaman así estos autores al estudio de los fenómenos que se producen en la superficie de contacto de dos fases o medios cualesquiera, con particular aplicación al estado coloidal de la materia. Los coloides tienen sólo una diferencia de grado con respecto a las emulsiones o suspensiones y es así que éstas han permitido un mejor conocimiento de aquéllas y que la experiencia adquirida con respecto a los coloides ha hecho posible conocer mejor ciertas suspensiones, tales como la de los microbios en sus medios de cultivo. El fenómeno de *adsorción* que tan importante papel desempeña en los sistemas dispersos, también debe concurrir a interpretar los fenómenos observados en las suspensiones bacterianas.

Si un bacterio introducido en una solución muy diluída, absorbe la sustancia disuelta, tendremos que al cabo de un cierto tiempo, se encontrará rodeado de una solución concentrada, en mayor o menor grado, según sea la intensidad de la absorción. La absorción en estos casos y análogos se ha comprobado en forma indirecta. El hecho de que la actividad oligodinámica sea limitada y se agote por siembras sucesivas de gérmenes, de que las algas se apoderen de todo el cobre disuelto (reacción de Bokorny para el cobre), en las soluciones diluídas, son pruebas en dicho sentido. Pero mucho más convincentes son las pruebas directas encontradas por Devaux (82). Este autor comprueba que plantas acuáticas como la *Elodea canadensis*, fijan en el tiempo de un minuto las cantidades pequeñísimas de plomo (2 o 3 décimos de milígramo por litro), contenidas en el agua en que se las sumerge. Igualmente observa que las paredes celulares fijan en pocos minutos K, Li, Na, Ca, Sr, Ba. El cobre diluído en la proporción de un gramo por metro cúbico de agua, el fierro diluído al diez millonésimo, etc., son fijados en proporciones notables.

Bechhold (83), admite que los desinfectantes actúan en dos fases: en la primera se produce la absorción del desinfectante por el germen, y en la segunda el desinfectante penetra en su interior. La primera parte del proceso no basta para producir la muerte, y siendo un fenómeno reversible, es posible hacerlo retroceder antes que se produzca la segunda parte, y en este caso no se produce la desinfección. Como en la absorción de una sustancia por otra desempeña un papel importante el medio dispersante, o sea el disolvente, podemos explicarnos por qué el mismo desinfectante tiene actividad diferente según el medio en que actúa. Es así que en general las soluciones acuosas son más activas que las soluciones alcohólicas, acetónicas, etc.

De acuerdo con estas ideas y con el comportamiento de las soluciones oligodinámicas con respecto a los gérmenes, resulta explicable como diluciones tan grandes de sustancia puede manifestar acción bactericida. Quedaría aún por resolver cómo actúan sobre los fermentos, toxinas, eritrocitos, etc.

Para el caso del cobre se nos ocurrió, que dado el carácter oxidante de estas soluciones, o mejor dicho, de comportarse como oxidadas, fuera posible que un proceso de esta naturaleza produjera la destrucción de los gérmenes. Realizamos algunos experimentos que nos demostraron que la acción bactericida de las soluciones diluídas de  $SO^4Cu$  se manifiesta perfectamente aún en un medio privado de oxígeno gaseoso o disuelto. Y notamos más aún, y es que en una atmósfera de oxígeno resistían mejor los gérmenes (*Paratífus A.*) que en una atmósfera de hidrógeno.

#### BIBLIOGRAFIA [1]

- (1) NAEGELI (1893), *Neue Denkschriften der allgemeinen Schweizerischen Gesellschaft für die gesamten Naturwissenschaften*, t. 33, Abt. I.
- (2) RICHEL (1883), *C. R.*, TG, pág. 1004.

[1] Los artículos señalados con (\*) los conocemos por citas o comentarios de otros autores, no habiéndonos sido posible leer los trabajos originales.

- (3) MILLER (1889), Conferencia dada en la Sociedad Odontológica Alemana el 18-XII-1889 (\*).
- (4) BEHRING (1890), *Zeitschrift für Hygiene*, t. 9, pág. 395.
- (5) SCHILL (1891-92), *Jahresb. d. Gessel für Natur u. Heilkunde-Dresden* (\*).
- (6) RICHTER (1892), *C. R.*, pág. 1494.
- (7) HÜNE (1909), *Centralblatt für Bakt.*, t. 48, II, pág. 135.
- (8) UFFELMANN (1892), *Berliner Klinische Wochenschrift*, N° 48 (\*).
- (9) VINCENT (1894), *Annales d'Hygiène publique*, pág. 383 (\*).
- (10) BOLTON (1894), *Transact. Americ. Ass. Physic* (\*).
- (11) CREDÉ y BEYER (1896), *Silber und Silbersalze als antiseptika*, Leipzig (\*).
- (12) FICKER (1898), *Zeitschrift für Hygiene*, t. 39, pág. 1.
- (13) THIELE y WOLF (1899), *Arch. für Hygiene*, t. 34 (\*).
- (14) v.ESMARCH (1901), *Hyg. Rundschau*, XI, pág. 49 (\*).
- (15) SCHENK (1901), *Osterr.-ung. Vierteljahrsschrift f. Zahnheilkunde* (\*).
- (16) HOFFMANN (1902), *Berliner Tierärztliche Wochenschrift* (&).
- (17) BOETZ (1904), *Tesis*, Giessen (\*).
- (18) MOORE y KELLERMAN (1905), Cit. Spitze, «Die Wasserversorgung» en *Handbuch der Hygiene de Rubner, Gruber y Ficker* (\*).
- (19) KELLERMANN y BECKWITH (1906), id. id. (\*).
- (20) BASSET SMITH (1905), *Cit. Gottschlich, Handbuch der Pathogene Mikroorganismen*, t. III, pág. 468 (\*).
- (21) FOWLER id. id. (\*).
- (22) CLARK y GAGE (1906), Cit. Spitze, *loc. cit.*, (\*).
- (23) PHELPS (1906), id. id. (\*).
- (24) KEMNA (1907), id. id. (\*).
- (25) GOODNOUGH, id. id. (\*).
- (26) KELLERMANN (1912), VIII Congr. Intern. Quím. Ap., Washington, vol XXVI.
- (27) BADO (1919), 1er. Congreso Nal. de Química, Buenos Aires, vol. IV, pág. 67.
- (28) KRAEMER (1906), *Amre. Journ. of Pharmacy*, t. 78, pág. 140 (\*).
- (29) HÜBENER (1909), *Tesis*, Berlín (\*).
- (30) CHRISTIAN (1911), *Desinfektion*, IV, pág. 217 (\*).
- (31) BITTER (1911), *Zeitschrift für Hygiene*, t. 69, pág. 483.
- (32) NATONEK y REITMANN (1915), *Zeitschrift für Hygiene*, t. 79, pág. 344.
- (33) SPIRO (1915), *Münchener Med. Wochenschrift*, n° 47.
- (34) SPIRO (1916), *Biochem. Zeitschrift*, n° 74.
- (35) MESSERSCHMIDT (1916), *Zeitschrift für Hygiene*, t. 82, pág. 289.
- (36) SAXL (1917), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 23, 39 y 45.
- (37) SAXL (1917), *Medizinische Klinik*, n° 28 y 46.
- (38) PFEIFFER y KADLETZ (1917), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 32.
- (39) PFEIFFER y KADLETZ (1917), id. id., n° 39.
- (40) WOLLMANN (1917), id. id., n° 35.
- (41) BAUMGARTEN y LUGER (1917), id. id., n° 39 y 40.
- (42) BAUMGARTEN y LUGER (1918), id. id., n° 7.
- (43) ERDSTEIN y FÜRTH (1921), *Biochemische Zeitschrift*, t. 118, pág. 256.
- (44) LANGER (1917), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 40.
- (45) MATSUNAGA (1918), *Bakteriol. Centralblatt*, l. 82, pág. 311.
- (46) BAIL (1919), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 29.
- (47) LÖHNER (1919), id. id., n° 37.
- (48) SAXL (1919), id. id., n° 40.
- (49) SAXL (1921), *Medizinische Klinik*, n° 43.
- (50) SALUS (1919), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 51.
- (51) STRECK (1919), *Hyg. Rundschau*, pág. 685 (\*).
- (52) SPAT (1920), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 29.
- (53) SÜPFLE (1920), *Münchener Medizinische Wochenschrift*, n° 41.
- (54) WELTMANN (1920), *Wiener Klinische Wochenschrift*, n° 49.
- (55) LUGER (1920), id. id., n° 38.
- (56) OLGA v. PLOTHO (1920), *Biochemische Zeitschrift*, l. 110, pág. 62.
- (57) ACÉL (1920), *Biochemische Zeitschrift*, t. 112, pág. 23.
- (58) DOERR (1920), id. id., n° 106, pág. 110.
- (59) DOERR (1920), id. id., n° 107, pág. 207.
- (60) DOERR (1921), id. id., n° 113, pág. 58.



metal depende de los gases en cuya presencia se realiza el contacto cobre-agua.

Estas mismas conclusiones son válidas para la activación del agua destilada por contacto con los óxidos cúprico y cuproso.

#### CONCLUSIONS

Le contact du cuivre métallique avec l'eau distillée, même pendant des mois, ne lui confère point des propriétés oligodynamiques.

Dans des conditions qui permettent la dissolution du cuivre, l'eau acquiert rapidement l'activité oligodynamique.

L'activité oligodynamique de l'eau distillée est due aux quantités infimes de cuivre qu'elle contient. La solubilisation de ce métal dépend des gas en présence desquels a lieu le contact cuivre-eau.

Ces mêmes causes interviennent pour que l'eau distillée devienne active au contact des oxides cupriques et cupreux.

---