

8. Franco SCANGA e Massimo DE CARO. — L'azione ritardante della novocaina sull'assorbimento della penicillina.

Riassunto. — Gli AA. — dopo aver accennato all'azione ritardatrice determinata dalla pectina sull'assorbimento della penicillina, — prendono in considerazione le possibilità di utilizzare allo stesso scopo la soluzione di novocaina. Tale impiego viene suggerito dall'osservazione che la novocaina forma con la penicillina un sale insolubile il quale, iniettato come tale nei tessuti, cede lentamente l'antibiotico.

Le ricerche sono condotte adoperando una soluzione di novocaina sia da sola che in associazione con la pectina. I risultati migliori sia per la durata che per la costanza dell'azione ritardatrice, si ottengono inoculando il complesso penicillina-novocaina non dopo che si è determinata la fase di cristallizzazione macroscopica, ma prima di tale fase, cioè nei primi 6-8 minuti dal momento dell'allestimento della soluzione. Si fa rilevare che l'azione ritardatrice, se pure migliore di quella che si ottiene con la semplice pectina, è però sempre *limitata* e per nulla paragonabile alle penicilline-ritardo di produzione americana.

Una serie di fotografie illustra e documenta l'intero processo di cristallizzazione, dall'inizio, in cui sono rilevabili solo microscopicamente piccolissimi cristalli, alla fine, in cui si osservano dei macrocristalli che danno alla soluzione un particolare aspetto lattescente.

Résumé. — Après avoir brièvement parlé de l'action retardatrice que la pectine exerce sur l'absorption de la pénicilline, les AA. envisagent la possibilité d'utiliser pour ce même but une solution de novocaïne. L'emploi de cette substance est suggérée par l'observation déjà faite que la novocaïne forme avec la pénicilline un sel insoluble qui, injecté tel quel dans les tissus, cède lentement l'antibiotique.

Pour ces recherches on utilise une solution de novocaïne, soit à elle seule, soit associée à la pectine. Les meilleurs résultats, au double point de vue de la durée et de la constance de l'action retardatrice, sont obtenus si le complexe pénicilline-novocaïne n'est pas inoculé après que la phase de cristallisation macroscopique s'est manifestée, mais avant cette phase, c'est-à-dire dans les premières 6-8 minutes après le moment où la solution a été apprêtée. Il faut remarquer ici que l'action retardatrice ainsi déterminée, tout en étant meilleure que celle obtenue par la simple pectine, est cependant toujours limitée et ne peut être nullement comparée à celle des pénicillines-retard de production américaine.

Une série de photographies illustre et documente le processus de cristallisation tout entier, dès le commencement, alors qu'on ne peut observer que

de très petits cristaux à l'aide du microscope, jusqu'à la fin, lorsque des macrocristaux sont visibles, qui donnent à la solution un aspect lactescent particulier.

Summary. — The authors have prepared the procaine salt of penicillin by precipitating the commercial alkali salts from aqueous solution with a 1 per cent solution of procaine hydrochloride. The procaine salt starts immediately to precipitate first in microcrystalline form and, towards the end of the crystallisation in macrocrystalline form. Photographs of the different crystals during the stages of crystallisation have been made.

The authors have investigated the absorption of procaine penicillin prepared in this manner by measuring the blood level in two hourly intervals for 24 hrs. The absorption is slower than that of alkali salts a blood level being maintained for about 12 hrs, but the retarding effect is less pronounced than that of commercial American procaine penicillin preparations.

Zusammenfassung. — Nachdem die VV. die verzögernde Wirkung des Pectins auf die Penicillinabsorption angedeutet haben, ziehen sie die Möglichkeit der Anwendung einer Novokainlösung zum gleichen Zweck, in Betracht. Diese Anwendung wird durch die Beobachtung veranlasst, dass das Novokain mit Penicillin ein unlösliches Salz bildet, welches, in das Gewebe eingespritzt, langsam das Antibioticum abgibt.

Zu den Untersuchungen wurden Novokainlösungen allein oder Novokainlösungen in Assoziation mit Pectin verwendet. Die besten Ergebnisse, sei es was die Dauer, sei es was die Konstanz der Wirkung betrifft, erhält man, wenn man das Komplex Penicillin-Novokain nicht erst nach der Phase der makroskopischen Kristallisation, sondern gleich in den ersten 6-8 Minuten nach der Zubereitung der Lösung, einspritzt. Man macht darauf aufmerksam, dass die verzögernde Wirkung, wenn sie schon besser als jene des einfachen Pectins ist, noch immer begrenzt ist und mit dem « Verzögerung-Penicillin » amerikanischer Herkunft nicht zu vergleichen ist.

Eine Reihe photographischer Aufnahmen erläutert und beweist den gesamten Kristallisationsprozess vom Beginn, wo nur mit Hilfe des Mikroskops wenige Kristalle wahrnehmbar sind, bis zum Ende, wo Makrokristalle erscheinen, die der Lösung ein eigenartiges milchiges Aussehen geben.

Precedentemente uno di noi (1), occupandosi dell'azione ritardatrice esplicata da varie sostanze sull'assorbimento della penicillina, ha studiato, mediante una serie di prove sperimentali in vivo (2), la possibile utilizzazione della pectina, arrivando alle seguenti conclusioni:

1) la pectina esercita effettivamente un'azione ritardante sull'assorbimento della penicillina; tale ritardo è però limitato ed assume una certa importanza solo se rapportato alla corrispondente durata del livello ematico ottenuto con una identica quantità di penicillina in soluzione acquosa;

2) nessun raffronto o paragone può farsi sia con la penicillina in mestruo cereo oleoso, sia con la penicillina procaina in veicolo oleoso con monostearato di alluminio. Soltanto con questi due tipi di penicillina può effettivamente parlarsi di azione ritardante fino a 24-48 ore;

3) le ricerche sperimentali sugli animali inducono a ritenere che, adoperata in clinica umana, la pectina consente una diminuzione nel numero delle iniezioni da praticarsi giornalmente, senza però che si arrivi all'affermazione che basti una sola iniezione ogni 24 h. poichè è provato che anche dosaggi massivi (100.000 U. per Kg. 1,5 nel coniglio) danno un livello ematico accertabile in vitro mai fino alla 12^a ora;

4) la pectina pertanto non può nè deve sostituire la penicillina cereo oleosa o la penicillina procaina che rimangono il mezzo ritardante di scelta, ove però possibile attuarlo: l'impiego della pectina può e dovrebbe semplicemente sostituire la soluzione fisiologica o l'acqua bidistillata comunemente impiegata per sciogliere la penicillina del commercio (sale di sodio, di potassio o solfato);

5) ricerche compiute in clinica umana potrebbero stabilire con maggiore precisione dosaggio e numero di iniezioni necessarie nelle 24 ore;

6) quanto alla tollerabilità la soluzione di pectina, purchè sufficientemente purificata, non determina alcun fenomeno reattivo apprezzabile sia locale (infiltrato) sia generale; anche se inoculata per via endovenosa ha dimostrato di non dare alcun inconveniente. Nelle nostre prove siamo arrivati ad inoculare fino a 9 cc. di pectina per diversi giorni in conigli di peso medio di Kg. 1,5, senza rilevare alcun disturbo;

7) la praticità dell'impiego della pectina è evidente: la soluzione dell'antibiotico viene allestita nell'identica maniera che adoperando soluzione fisiologica o acqua bidistillata. Tanto il sale sodico che gli altri sali di penicillina si sciolgono rapidamente nella soluzione di pectina, che rimane sufficientemente fluida così da poter essere facilmente iniettata.

Tutti questi requisiti, unitamente alla considerazione che una fiala di pectina viene a costare poco più di una fiala di soluzione fisiologica, ci inducono ad ammettere l'utilità dell'impiego di questa sostanza quale mezzo ritardante l'assorbimento della penicillina, con quelle restrizioni e quelle limitazioni da noi chiaramente e ripetutamente espresse.

Recentemente l'attenzione dei ricercatori si è rivolta al sale che la penicillina forma con un'ammina, la procaina, sale che si è rivelato quasi del

tutto insolubile. Trattasi di un composto chimico ben definito, contenente rispettivamente una molecola di penicillina ed una di procaina.

Tale sale, sospeso in olio vegetale, rivelò un effetto ritardante sull'assorbimento dell'antibiotico anche superiore a quello ottenuto con la penicillina in olio e cera: il 95% di una serie di pazienti trattati con 300.000 U. di penicillina-procaina sospesa semplicemente in 1 cc. di olio vegetale, mostrò un livello ematico terapeutico anche per più di 24 ore. E che l'azione ritardante sia dovuta esclusivamente all'insolubilità del sale è provata dal fatto che iniettando la stessa quantità di penicillina (300.000 U.) sotto forma di un'altro sale *solubile*, sospesa in 1 cc. di olio vegetale, si riscontra un livello ematico terapeutico per non più di 8-10 ore.

Successivamente si è anche constatato che il ritardo nell'assorbimento della penicillina-procaina nei tessuti si ottiene anche iniettando una sospensione di detto sale in semplice acqua distillata anziché in olio. Ed infatti, dopo l'inoculazione di 300.000 U. di penicillina G-procaina, sospesa in 1 cc. di acqua distillata, si sono riscontrati dei livelli ematici batteriostatici per 24 ore nel 95% dei pazienti e per circa 36 ore nel 50%.

In conseguenza di questi brillanti risultati si è iniziata in America la produzione, su scala commerciale, di questo nuovo sale di penicillina. Ciascuna boccetta contiene un determinato quantitativo di sostanza in polvere che non è più il solito sale sodico o calcico o potassico: è la penicillina G-procaina con l'aggiunta di una piccola quantità (circa 1% in peso) di altre sostanze, completamente innocue, adatte a facilitare ed a stabilizzare la successiva sospensione. Allo stato secco, tale sale conserva invariata la sua attività, anche a temperatura ambiente, per 12 mesi.

In queste boccette, con la tecnica comunemente in uso fino ad ora, si introdurrà l'acqua distillata o la soluzione fisiologica, per ottenere la sospensione acquosa del sale procainico. Tale sospensione sembra che si possa conservare a temperatura ambiente per 7 giorni, senza alcuna diminuzione del titolo. Prima dell'uso il liquido contenuto nella boccetta dovrà essere agitato, onde essere sicuri di avere una completa ed omogenea dispersione dei cristalli di penicillina-procaina.

Partendo da queste premesse abbiamo ritenuto utile studiare sperimentalmente se fosse anzitutto possibile ottenere con le comuni penicilline del commercio (sale sodico e potassico) un'azione ritardatrice, adoperando come solvente una soluzione di novocaina. Tale sostanza infatti, venendo a contatto con la penicillina darebbe luogo alla formazione del sale penicillina-novocaina che, essendo insolubile, esplicherebbe la nota azione ritardatrice. Abbiamo perciò preparato sei soluzioni di novocaina a differenti concentrazioni (0,5 - 0,75 - 1 - 1,25 - 2,50 e 5%) ed abbiamo messo a contatto 3 cc. di ciascuna soluzione con 200.000 U. di penicillina, avendo cura di adoperare per ogni prova sali identici di antibiotico di un'unica casa produttrice

(penicillina G. potassica della Ditta Bristol). I risultati ottenuti, riportati nella tabella n. 1, mostrano che, mentre con concentrazioni di novocaina al 0,5% la cristallizzazione è assente e con concentrazioni al 0,75% la cristallizzazione è scarsa e molto lenta, con la concentrazione all'1% si ottiene all'ottavo minuto l'inizio della cristallizzazione la quale diventa quasi completa dopo 15 minuti; con la concentrazione all'1,25% la cristallizzazione diventa molto più rapida tanto da essere totale al quindicesimo minuto; concentrazioni superiori danno una cristallizzazione massimale sin dai primi minuti. Riteniamo pertanto sufficiente adoperare, per le prove sugli animali, la soluzione all'1,25%, inoculando la sospensione penicillina-novocaina dopo 20 minuti dalla preparazione, quando cioè, secondo le prove sul

TAB. I

Concentr. novocaina ‰	Tempo di cristallizzazione					Osservazioni
	4'	6'	8'	15'	30'	
0,5	—	—	—	—	—	Soltanto dopo alcune ore presenza di qualche cristallino.
0,75	—	—	—	+	++	La formazione di cristalli non raggiunge il massimo; il liquido rimane limpido.
1,00	—	—	+	++	+++	La cristallizzazione è notevole; il liquido appare parzialmente lattescente.
1,25	±	++	++	++++	++++	Cristallizzazione iniziale precoce; liquido parzialmente lattescente.
2,50	++	++++	++++	++++	++++	Cristallizzazione immediata.
5,00	+++	++++	++++	++++	++++	Cristallizzazione immediata.

tempo di cristallizzazione, la formazione dei cristalli avrà raggiunto il massimo.

Contemporaneamente abbiamo ritenuto utile osservare se fosse possibile aumentare o migliorare tale azione ritardatrice mediante l'aggiunta alla novocaina della soluzione di pectina al 2%, cioè abbiamo voluto vedere se fosse possibile una sommazione dell'azione ritardatrice delle due sostanze.

Sono stati pertanto inoculati due gruppi di otto conigli con penicillina in soluzione di novocaina all'1,25% e con penicillina in soluzione di novocaina all'1,25% e pectina al 2%. La penicillina veniva disciolta mediante il solvente nella proporzione di tre cc. di solvente per ogni 100.000 U.O.

Tale quantitativo veniva poi inoculato sottocute a ciascun coniglio 20 minuti dopo la preparazione; la boccetta in cui avveniva la soluzione era convenientemente agitata e la soluzione era poi aspirata con siringa montante un ago di dimensioni piuttosto notevoli (1). Successivamente, ad intervalli regolari di tempo, iniziando dall'ottava ora in base ai precedenti risultati (2) si praticava il salasso mediante puntato cardiaco; il sangue prelevato (circa 2-3 cc.) si poneva in provette e si lasciava coagulare. Si preparava intanto una serie di piastre di agar germi; piastre di 12 cc. di diametro, agar a pH 7,2 fluidificato e quindi portato a 45° C. All'agar così disciolto si aggiungeva, mescolando opportunamente, cc. 0,5 di brodo-cultura di 24 ore di stafilococco aureo per ogni 100 cc. di agar. In ciascuna piastra si versavano cc. 15 di agar germi, si lasciava solidificare e si poneva in ghiacciaia per 24 ore. Dopo di che si praticavano nell'agar 6 fori per ciascuna piastra servendosi di un foratappi di 8 millimetri ed asportando poi con una lancetta da vaccinazione infilata in un comune portapenne i dischetti di agar delimitati dal foratappi. Si ottenevano così 6 pozzetti per ogni piastra: in 4 pozzetti di ciascuna piastra si versavano cc. 0,05 di siero in esame; nel quinto e sesto pozzetto cc. 0,05 di due soluzioni di penicillina contenenti rispettivamente 0,05 e 0,025 U. per cc. Le piastre così preparate, poste in termostato, venivano osservate dopo 24 ore misurando il diametro dell'alone d'inibizione ottenuto per ogni siero e per le due soluzioni controllo. Nella tabella sono indicati i risultati trascrivendo per ogni siero il valore medio di due misurazioni e tenendo presente che nei pozzetti controllo si ottiene un'alone d'inibizione di cm. 1,4-1,3 per la soluzione di penicillina con 0,05 U. per cc. e cm 1,2-1,1 per la soluzione di penicillina con 0,025 U. per cc. Per la durata del livello ematico adoperando penicillina in soluzione acquosa e penicillina in semplice soluzione di pectina al 2% rimandiamo al lavoro di uno di noi (2) riportandone nella tabella i risultati ottenuti per maggior chiarimento.

In base a tali risultati (tabella II e III) constatiamo che con l'impiego della sola novocaina, mentre riusciamo ad ottenere un livello ematico controllabile ($> 0,025$ U. per cc.) nella totalità degli animali fino all'ottava ora, non si riesce invece ad ottenere alcun ritardo nelle ore successive in sette animali su otto; in un solo coniglio si riesce a rilevare penicillina nel sangue fino alla 14^a ora: probabilmente questo eccezionale prolungamento dell'azione ritardatrice è legato alla particolare fase di cristallizzazione in cui è avvenuta l'inoculazione in quell'animale. Adoperando novocaina e pectina insieme, i risultati non cambiano sostanzialmente: tutti gli animali rivelano livello ematico positivo fino all'8^a ora; nessuno dopo tale periodo di tempo.

Confrontando tali risultati con quelli ottenuti precedentemente da uno di noi con l'impiego della sola pectina, si nota che in tal caso la pectina

riesce a mantenere un livello ematico positivo all'8^a ora nell'83% deg*'*i animali, invece che nel 100% ; d'altra parte però si osserva che alla 10^a ora si ottiene ancora un livello ematico positivo nel 33% degli animali. Si avrebbe pertanto adoperando novocaina da sola o con pectina, un regresso dell'azione ritardatrice.

Per spiegare tali risultati noi abbiamo pensato che si debbano prendere in considerazione le seguenti possibilità. Anzitutto bisogna convenire che,

TAB. II.

Iniezione sottocutanea di 100.000 U.	Salasso compiuto dopo							
	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	24 h
Penicillina in soluzione acquosa (animali tratta- ti n. 6)	1,1	—	—	—	—	—	—	—
	1,4	—	—	—	—	—	—	—
	1,1	—	—	—	—	—	—	—
	1,6	1,1	—	—	—	—	—	—
	2	1,2	1,1	—	—	—	—	—
	1,4	—	—	—	—	—	—	—
Penicillina pectina 2 % (animali trattati n. 12)	1,3	1,1	—	—	—	—	—	—
	1,5	1,2	1,1	—	—	—	—	—
	1,5	1,2	1,2	1,1	—	—	—	—
	1,6	1,1	—	—	—	—	—	—
	1,4	1,3	1,2	1,1	—	—	—	—
	1,3	1,1	1,1	—	—	—	—	—
	1,5	1,3	1,2	1,1	—	—	—	—
	1,2	1,1	1,1	—	—	—	—	—
	2,4	1,4	1,3	1,2	—	—	—	—
	1,2	1,1	1,1	—	—	—	—	—
	1,3	1,2	1,1	—	—	—	—	—
	1,2	1,2	1,1	—	—	—	—	—
Penicill. novocaina 1,25% (animali trattati n. 8)			1,3	—	—	—	—	—
			1,2	—	—	—	—	—
			2,4	1,6	1,6	1,3	—	—
			1,6	—	—	—	—	—
			1,4	—	—	—	—	—
			1,5	—	—	—	—	—
			1,2	—	—	—	—	—
			1,6	—	—	—	—	—
Penicill. novocaina 1,25% Pectina 2% (animali trattati n. 8)			2,8	—	—	—	—	—
			1,7	—	—	—	—	—
			1,8	—	—	—	—	—
			1,9	—	—	—	—	—
			1,4	—	—	—	—	—
			1,7	—	—	—	—	—
			1,2	—	—	—	—	—
			1,2	—	—	—	—	—

dopo l'aspirazione della sospensione cristallina, per quanto il liquido prima dell'aspirazione stessa fosse stato ben agitato, una parte più o meno notevole di cristallini rimane aderente alla superficie interna della boccetta di penicillina. Inoltre la permanenza dei cristalli all'interno della boccetta è

TAB. III.

Penicillina 100.000 U.	Numero di animali con livello ematico ancora dosabile dopo le seguenti ore dall'inoculazione								
		4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	24 h
Novocaina 1,25%	animali trattati 8	8	8	8	1	1	1	0	0
	Percentuale	100%	100%	100%	12,5%	12,5%	12,5%	0%	0%
Novocaina 1,25% Pectina 2%	animali trattati 8	8	8	8	0	0	0	0	0
	Percentuale	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
Pectina 2%	animali trattati 12	12	12	10	4	0	0	0	0
	Percentuale	100%	100%	83%	33%	0%	0%	0%	0%
Penicillina in soluzione acquosa	animali trattati 6	6		1	0	0	0	0	0
	Percentuale	100%		16%	0	0	0	0	0

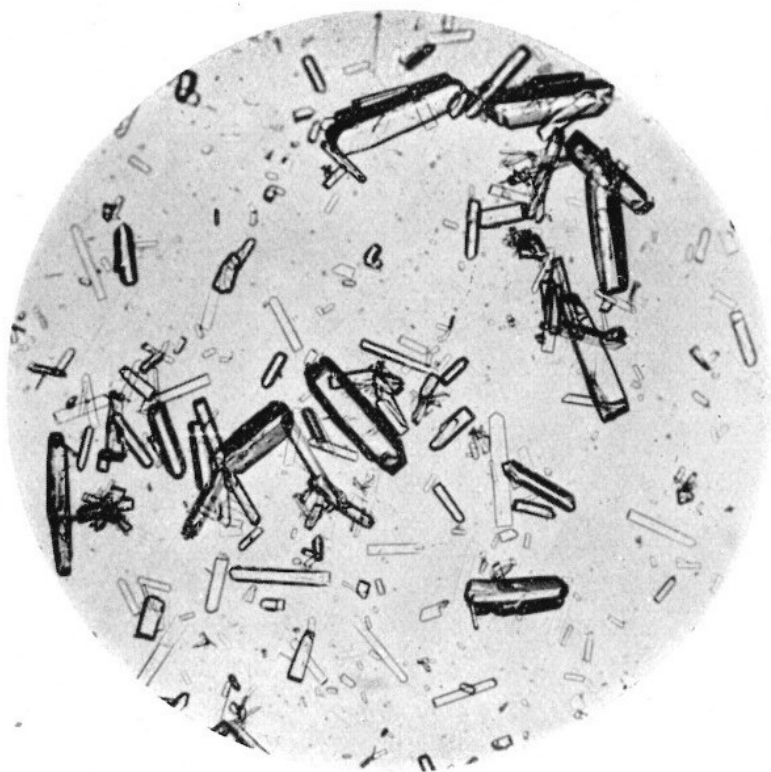
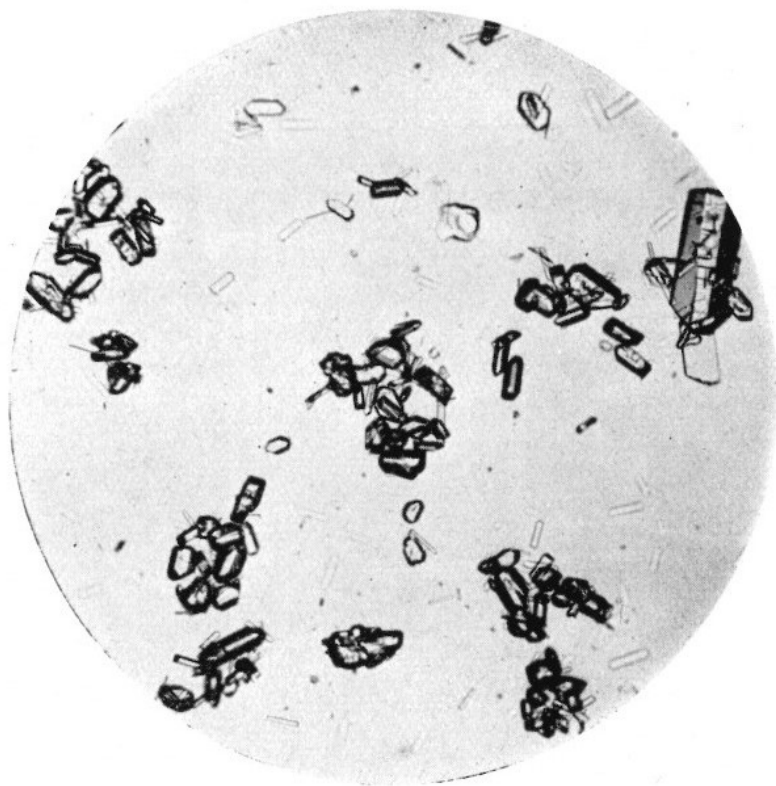


Fig. 1-2. — Cristalli di novocaina-penicillina aspirati mediante siringa montante un ago N. 1.



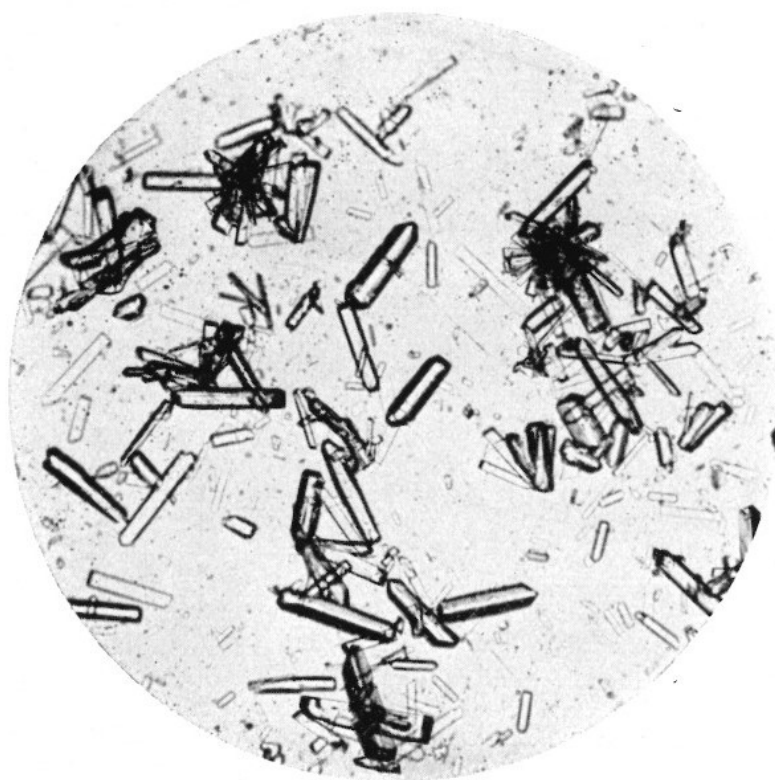


Fig. 3-4. — Cristalli di novocaina-penicillina aspirati mediante pipetta Pasteur a punta grossa.

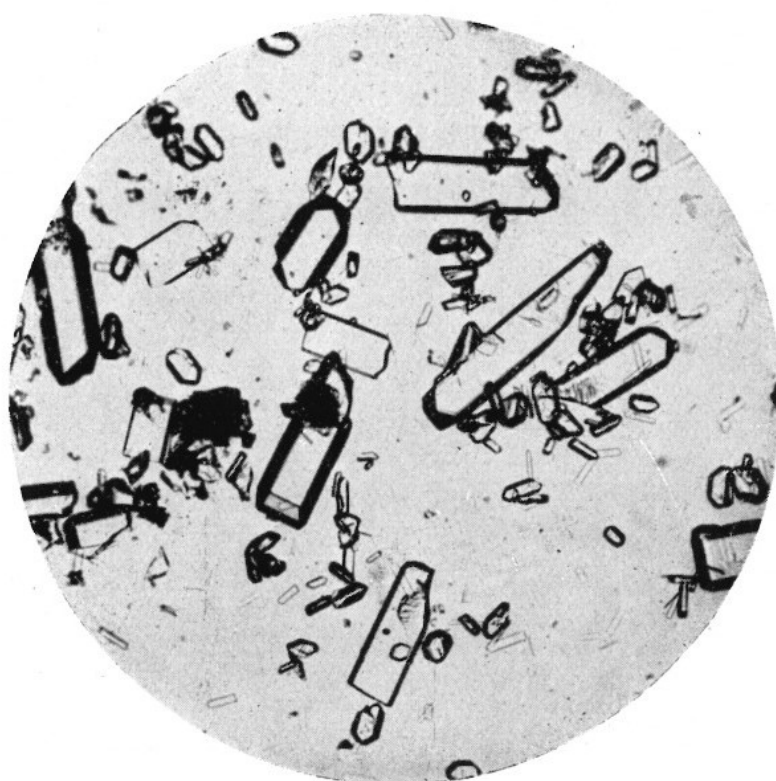
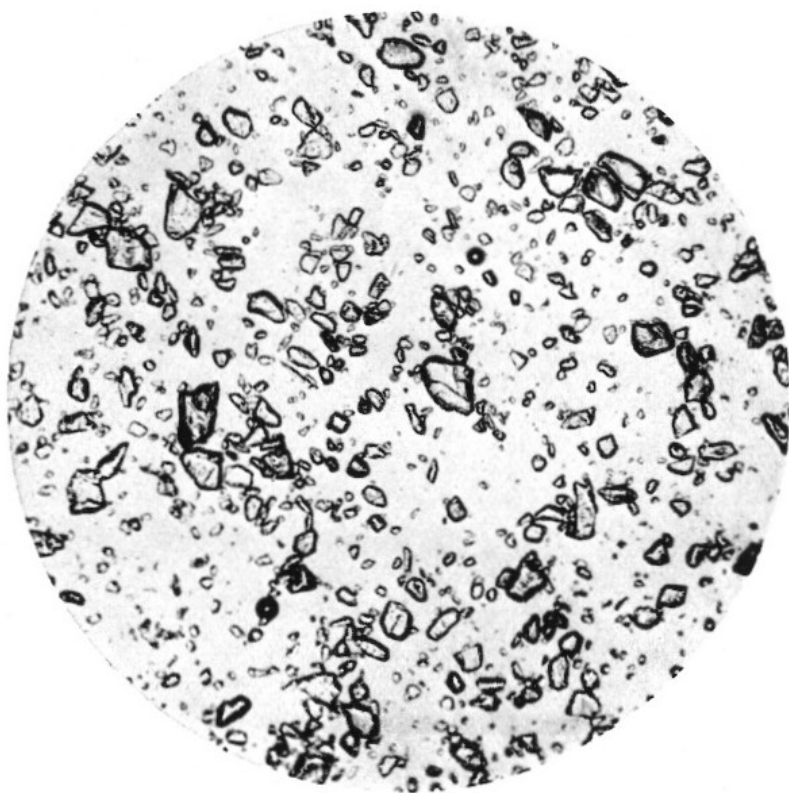




Fig. 5-6. — Cristalli di procaina-penicillina americana aspirati con siringa (fig. 5) e con pipetta Pasteur (fig. 6): non si rileva alcuna apprezzabile differenza.



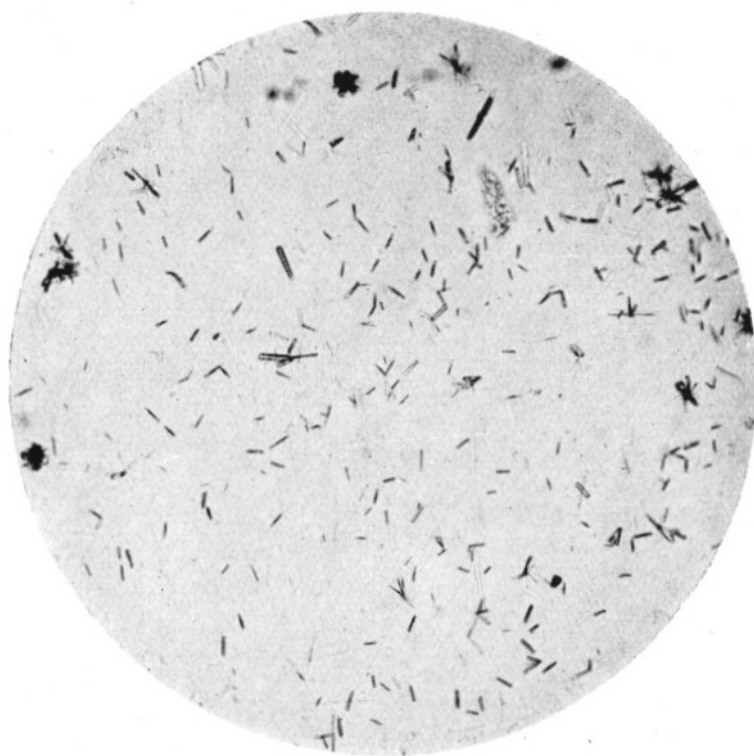


Fig. 7. — Osservazione microscopica della formazione progressiva dei cristalli di novocaina-penicillina: fase iniziale macroscopicamente non visibile (dopo 2 minuti dalla preparazione).



Fig. 8. — Microcristalli ancora non visibili ad occhio nudo (dopo 4 minuti).

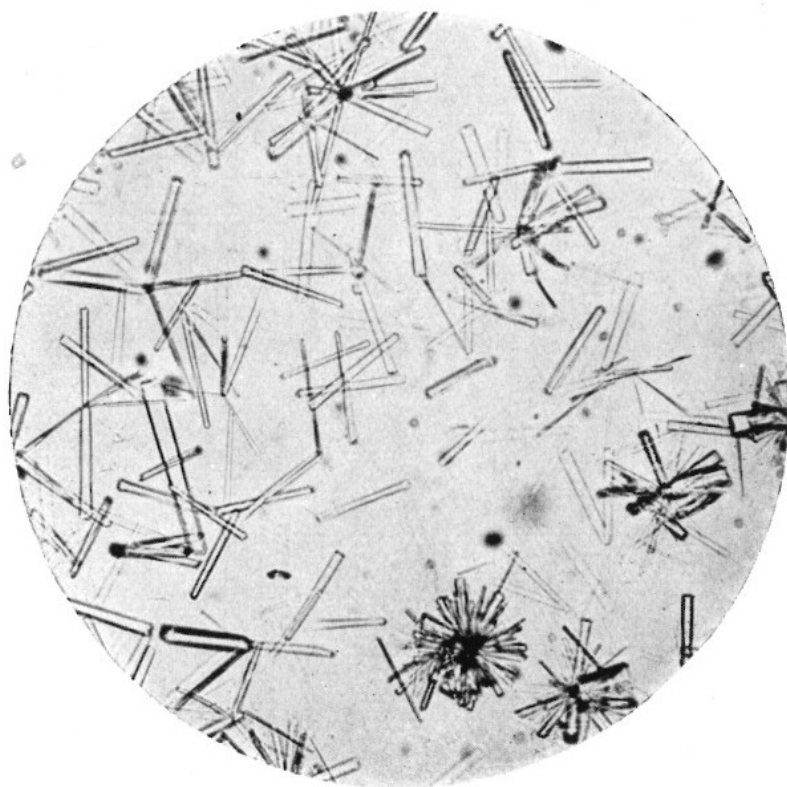


Fig. 9. — Cristalli visibili anche macroscopicamente (dopo 10 minuti).

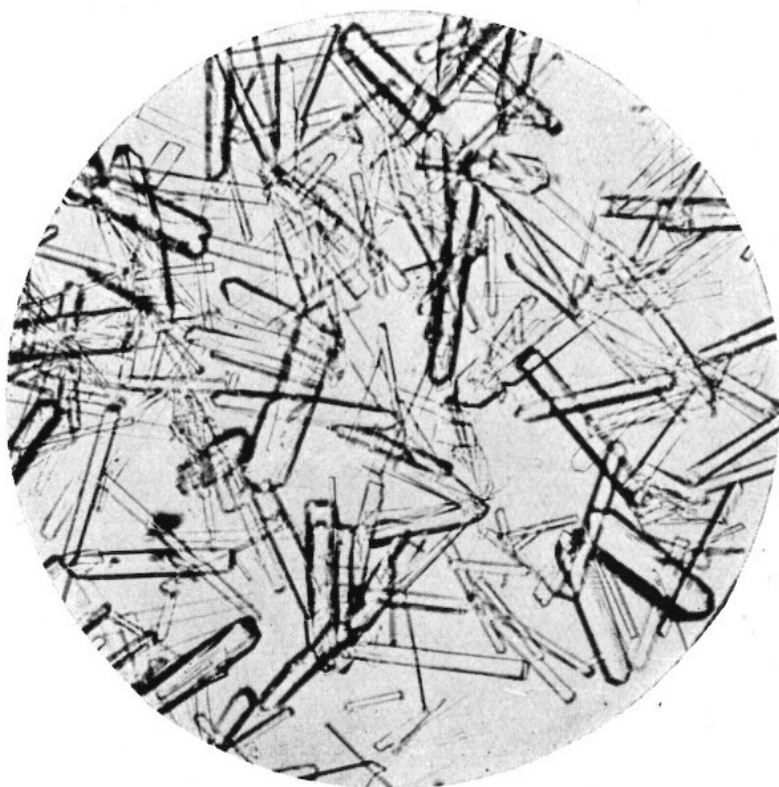


Fig. 10. — Processo di cristallizzazione quasi completo (dopo 20 minuti).

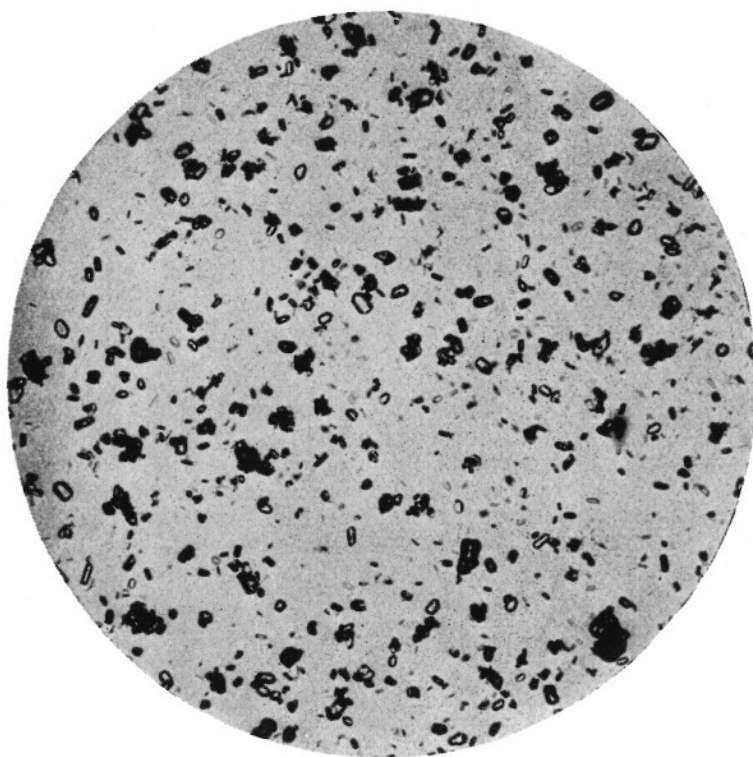
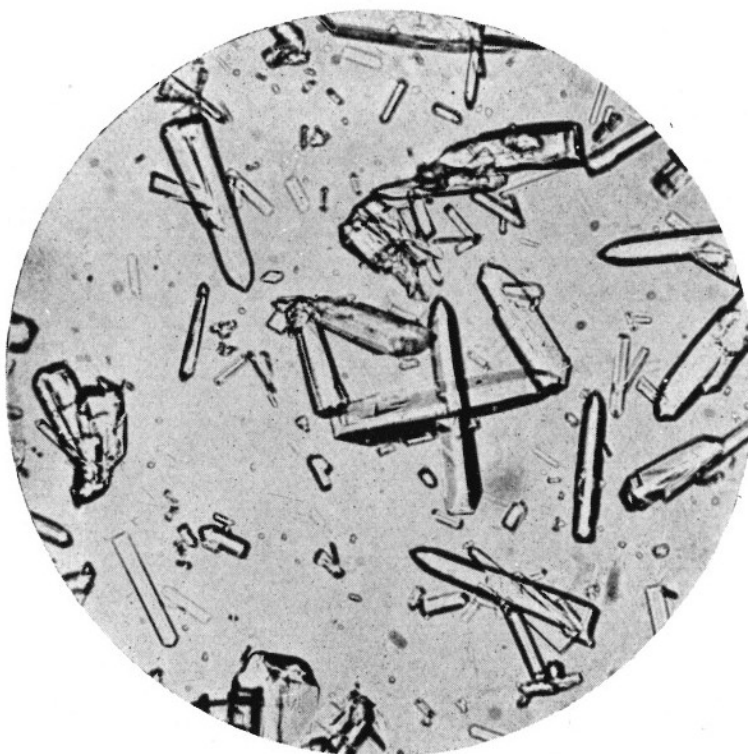


Fig. 11-12. — Processo di micro e macro-cristallizzazione ottenuto usando un altro tipo di penicillina.



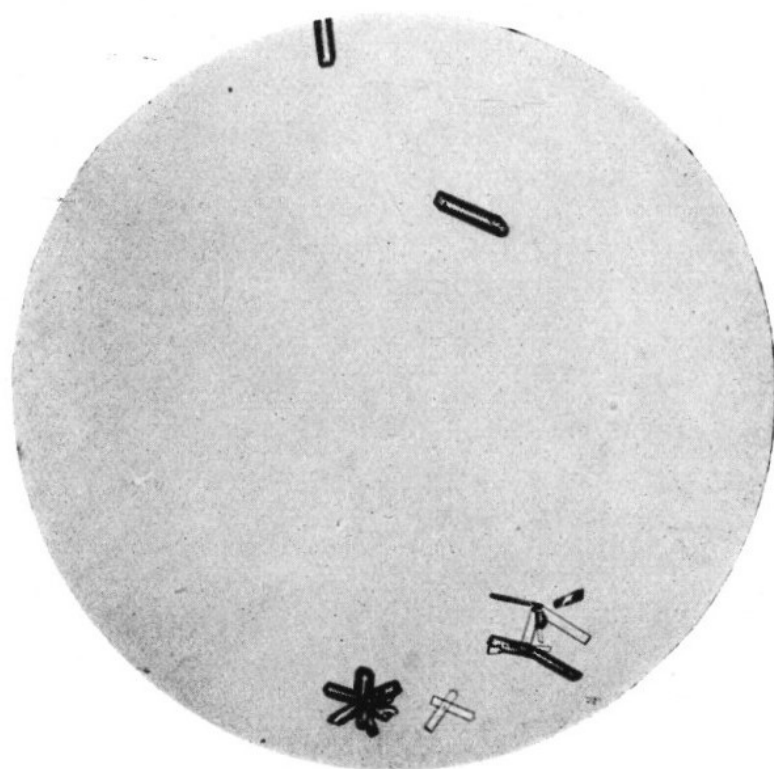
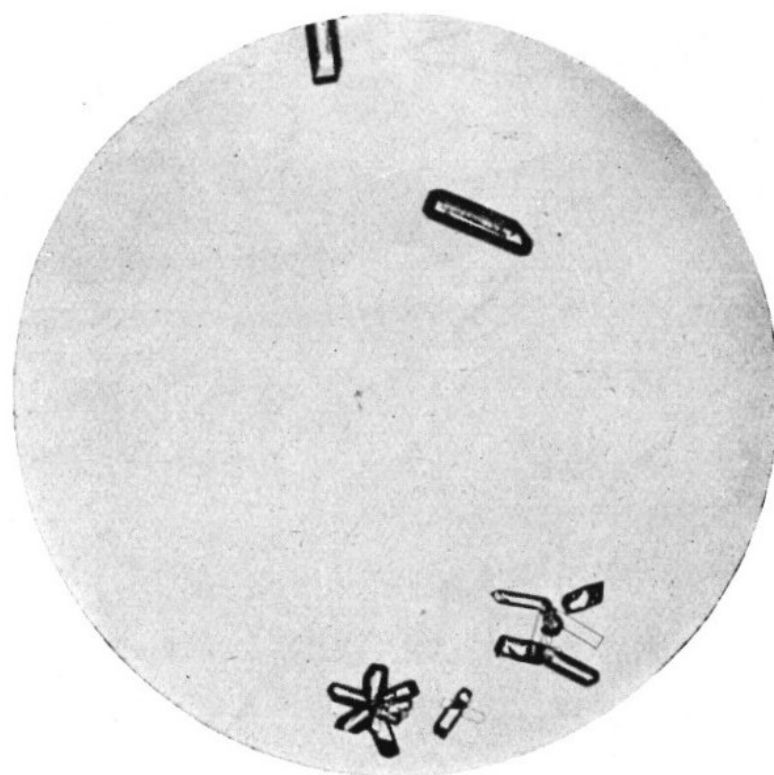


Fig. 13-14. — Aumento progressivo delle dimensioni dei cristalli fotografati mantenendo invariato il campo di osservazione.



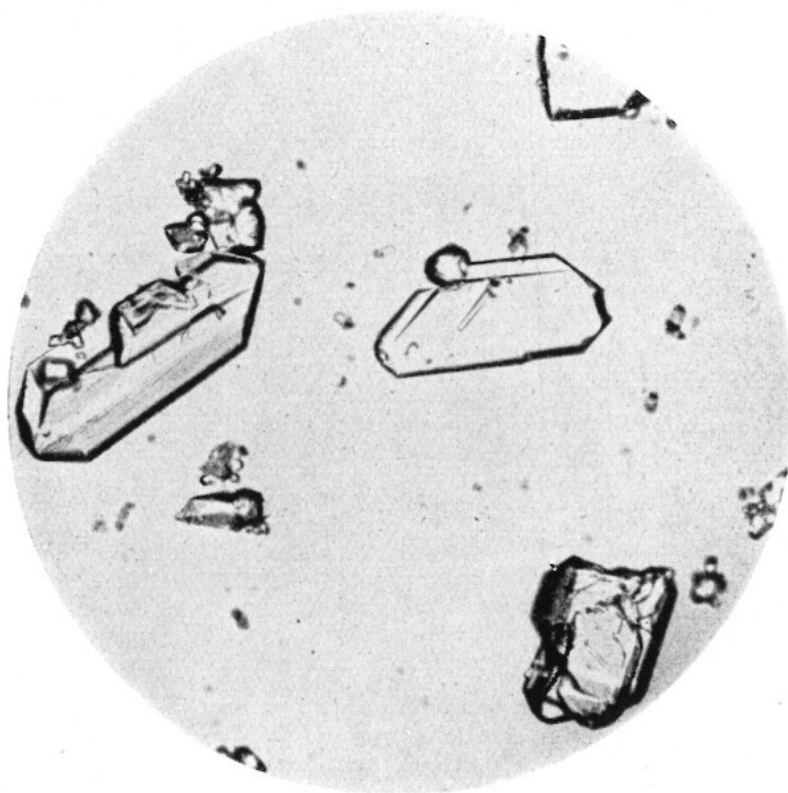


Fig. 15. — Grossi cristalli ottenuti con un sale potassico di penicillina.

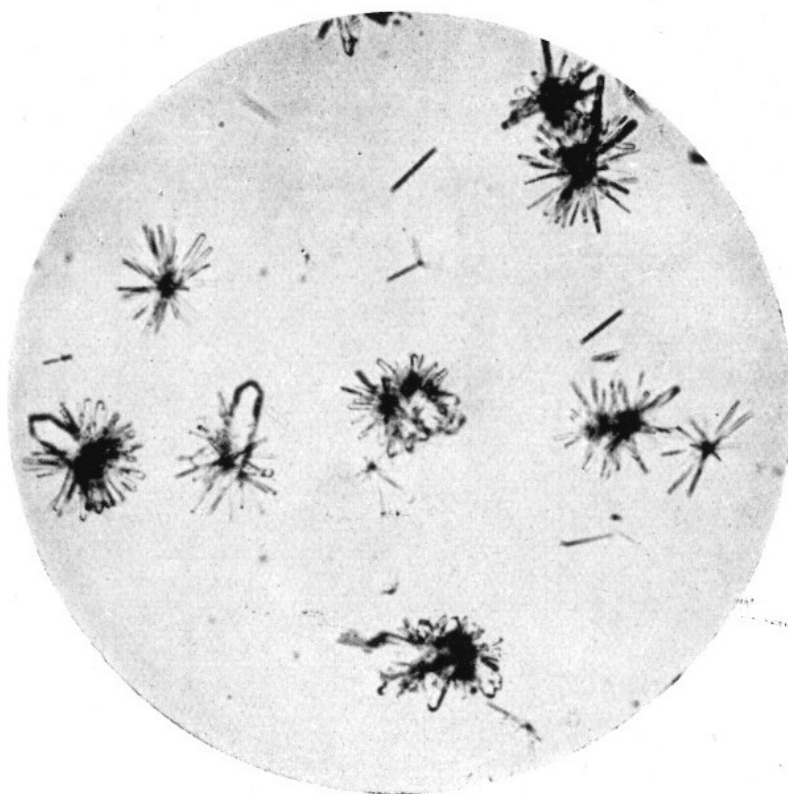


Fig. 16. — Cristalli ottenuti con la penicillina sodica della Ditta F.



Fig. 17. — Cristalli ottenuti con la penicillina sodica della Ditta A.

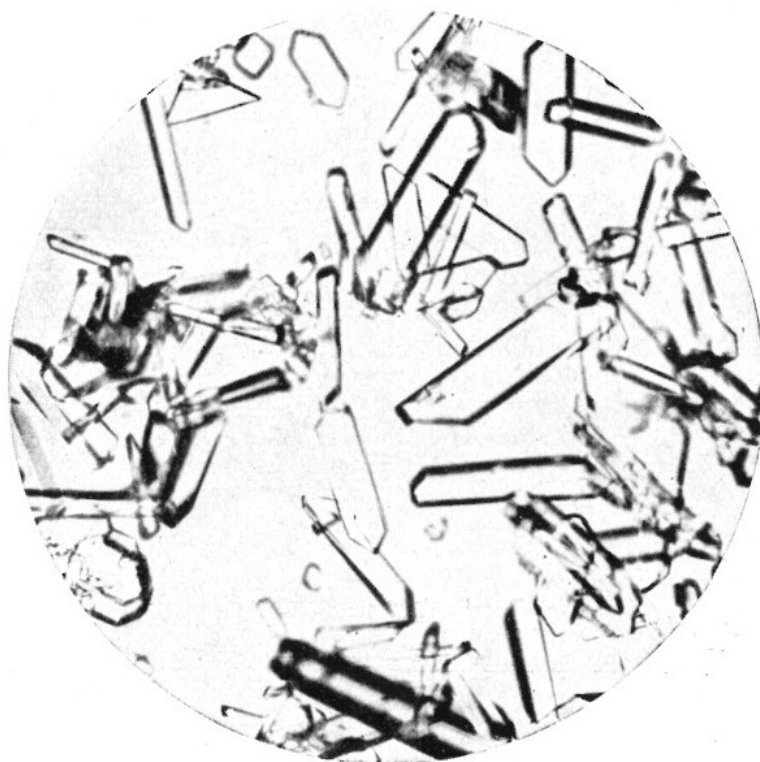


Fig. 18. — Cristalli ottenuti con penicillina sodica della Ditta S.

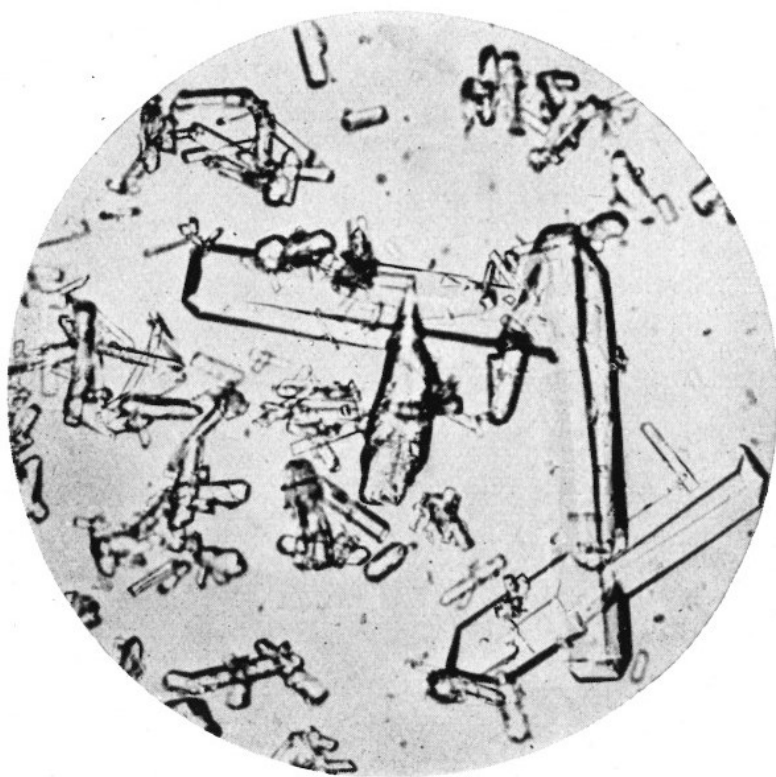


Fig. 19. — Cristalli ottenuti con la penicillina potassica della Ditta B.

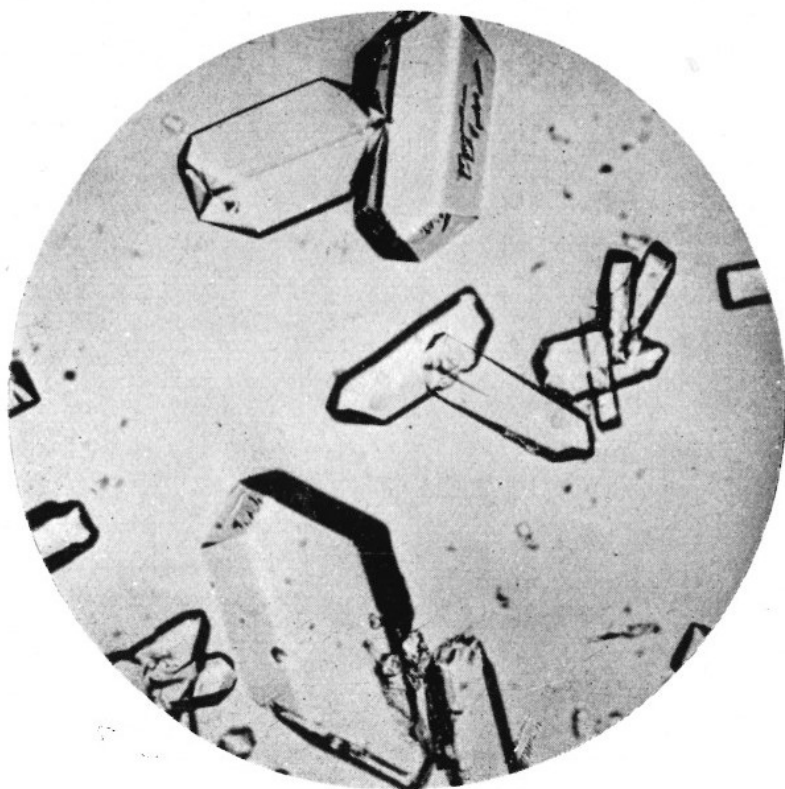


Fig. 20. — Grossi cristalli di penicillina sodica, dopo 24 ore dalla preparazione.

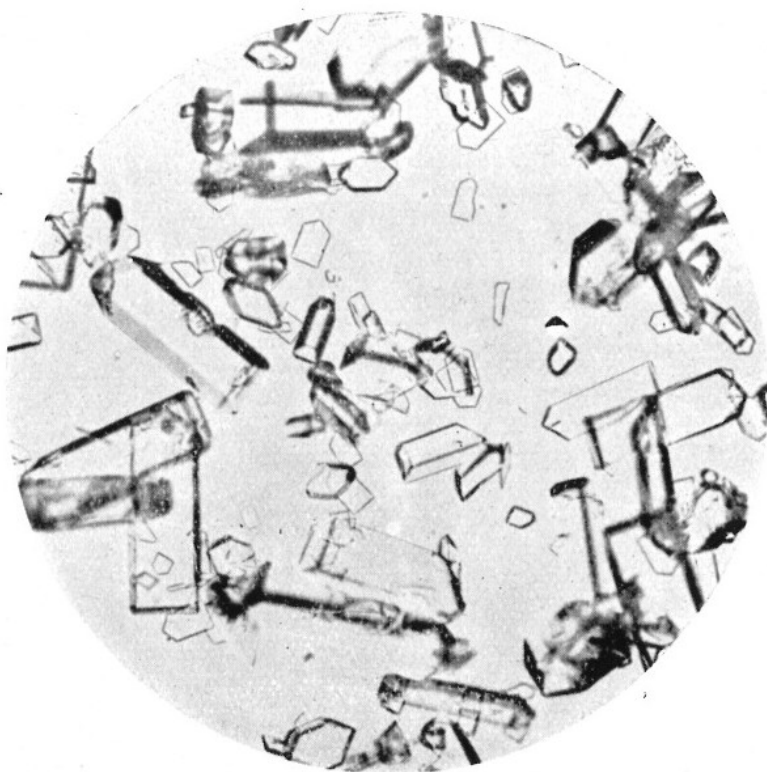


Fig. 21. — Cristalli ottenuti con penicillina potassica della Ditta H.

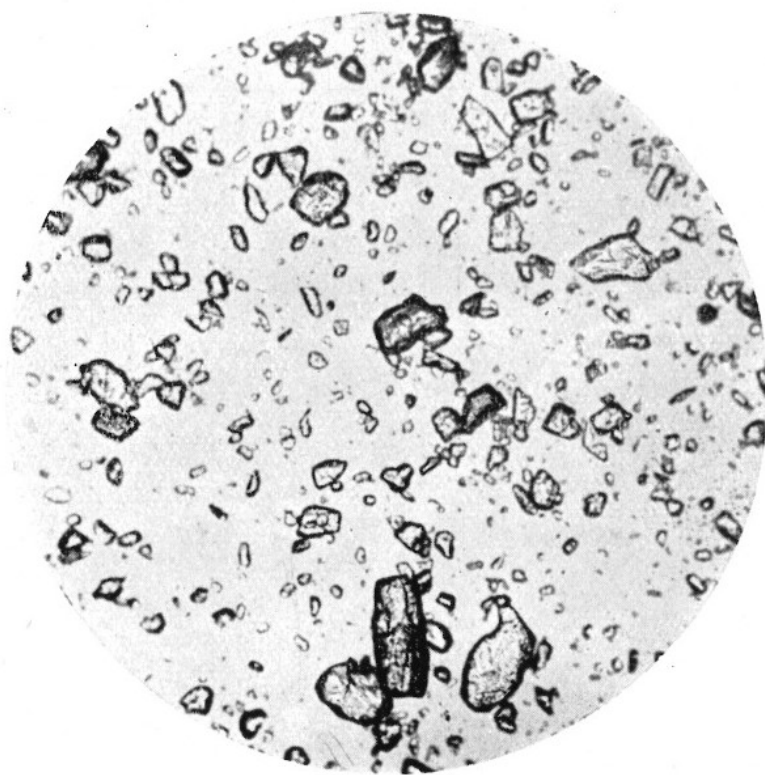


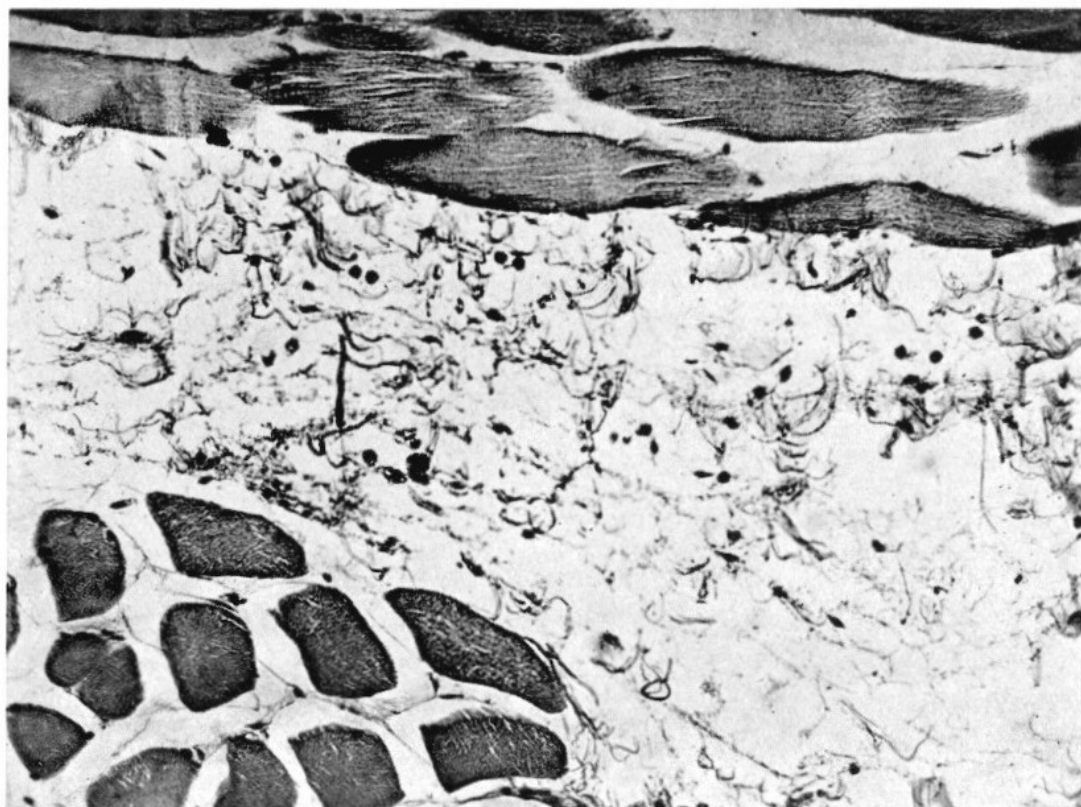
Fig. 22. — Cristalli di penicillina-procaina americana; si rilevi la mancanza di una qualsiasi forma di cristallizzazione.



Fig. 23. — Cristalli ottenuti con penicillina sodica, dopo prolungata frantumazione in mortaio di porcellana.



Fig. 24-25. — Preparati istologici di tessuto sottocutaneo di cavia, dopo 30 minuti dall'inoculazione di una soluzione di novocaina-penicillina.



determinata, oltre che dalla adesione alla parete interna della boccetta stessa, anche dal fatto che una parte di cristalli non riesce a passare attraverso l'ago della siringa anche se di dimensioni notevoli. Infatti noi abbiamo controllato sperimentalmente tale possibilità con le seguenti prove.

Abbiamo anzitutto fotografato il deposito cristallino che si ottiene su di un vetrino, deponendovi una goccia della sospensione di penicillina-novocaina aspirata con una pipetta Pasteur a punta grossa ed il deposito che si ottiene nell'identica maniera aspirando però la sospensione mediante una siringa montante un ago n. 1.

Come può desumersi dalle figure 1, 2, 3 e 4, la differenza appare evidente: risulta cioè che la quantità di cristalli che dal liquido contenuto nella boccetta passa nella siringa e da questa sul vetrino è molto minore della quantità che invece passa attraverso una pipetta a punta grossa. Nella nostra prova ci siamo serviti di un ago n. 1, di dimensioni cioè piuttosto grandi, ritenendo non consigliabile, per la pratica medica, adoperare aghi di dimensioni maggiori, anche perchè aumentando tali dimensioni, la quantità di cristalli che passa non è sensibilmente maggiore.

La stessa prova è stata da noi ripetuta servendoci di una sospensione acquosa di penicillina-novocaina di produzione americana: in tal caso (figura 5-6) non è stata da noi riscontrata un'apprezzabile differenza tra goccia proveniente dalla pipetta e goccia proveniente dall'ago. Successivamente abbiamo voluto ricercare la quantità di penicillina contenuta nella sospensione cristallina, dopo averla aspirata mediante siringa e travasata in altro recipiente: ridisciogliendo tale sospensione e controllando il numero delle U. O. in essa contenute, abbiamo trovato in confronto al titolo iniziale dichiarato sulla boccetta una riduzione complessiva che in qualche caso è arrivata fino ad $1/4$ ed $1/3$ del titolo iniziale.

Da quanto sopra possiamo trarre una prima conclusione e cioè che la quantità complessiva di penicillina che noi inoculiamo ad un animale, quando l'aspirazione del liquido avviene a cristalli già formati, è sensibilmente minore di quella che si avrebbe se l'aspirazione fosse fatta prima della formazione dei macrocristalli. A conferma di ciò noi abbiamo visto che, prendendo un cc. di una soluzione di penicillina-novocaina entro 5' minuti (cioè senza macrocristalli) e dopo 30 minuti dal momento della preparazione (cioè con presenza di macrocristalli) servendoci rispettivamente sia nel primo che nel secondo caso di una pipetta e di una siringa, il contenuto di U.O./cc., mentre rimane praticamente immutato sia dopo 5 che dopo 30 minuti nei casi in cui abbiamo adoperato la pipetta, mostra invece, adoperando la siringa, una diminuzione del contenuto di penicillina solo quando l'aspirazione è fatta dopo 30 minuti, cioè dopo la formazione dei cristalli.

Indiscutibilmente questa duplice causa, cioè l'adesione dei cristalli alla

parete interna della boccetta di penicillina ed il passaggio parziale dei cristalli attraverso l'ago, è sufficiente a spiegare la minore durata del livello ematico nel coniglio in confronto all'impiego della semplice soluzione di pectina. Onde eliminare queste cause, abbiamo ritenuto opportuno ripetere la stessa prova sugli animali inoculando le soluzioni di penicillina subito appena preparate, prima cioè della formazione dei macrocristalli, visibili ad occhio nudo. Siamo stati indotti a compiere questa ricerca dal fatto che, se pure occorrono diversi minuti prima che si abbia la formazione di cristalli macroscopicamente visibili, il processo di cristallizzazione ha inizio subito, appena preparata la soluzione, soprattutto se si adopera la novocaina insieme con la pectina: inizialmente però trattasi di cristalli piccolissimi (microcristalli) i quali non sono ancora visibili ad occhio nudo, mentre già appaiono ben evidenti all'osservazione microscopica.

A documentazione di ciò riproduciamo una serie di fotografie (fig. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14) dimostranti la progressiva formazione dei cristalli. Dopo aver preparata la soluzione di penicillina-novocaina 1 % + pectina, abbiamo aspirato il liquido a vari intervalli di tempo con una pipetta Pasteur, e depostane una goccia su di un vetrino porta oggetti ricoprendolo con un copri oggetti, abbiamo fotografato al microscopio i cristalli osservati. La fig. 7 mostra la soluzione di penicillina-novocaina-pectina due minuti dopo la preparazione; la fig. 8 mostra lo stesso campo microscopico 4 minuti dopo la preparazione: è nettamente visibile il progressivo aumento di dimensioni dei cristalli. Siamo però ancora nella fase in cui la soluzione si mantiene perfettamente limpida, senza intorbidamento per la presenza di macro-cristalli ed in cui ancora ad occhio nudo non è dimostrabile alcun inizio di cristallizzazione. La fig. 9 mostra la soluzione dopo 10 minuti dalla preparazione; la fig. 10 mostra il processo di cristallizzazione quasi completo (dopo 20 minuti): si notano infatti numerosi ammassi cristallini di dimensioni notevoli che occupano l'intero campo di osservazione. Le figure 11 e 12 mostrano lo stesso processo di micro e macrocristallizzazione che si ottiene adoperando un altro sale di penicillina. Le fig. 13 e 14 rivelano, come le figg. 7 ed 8, l'aumento progressivo delle dimensioni dei cristalli, mantenendo invariato il campo di osservazione.

In genere la forma dei cristalli che si ottengono sembra non essere uniforme, ma variabile in rapporto non solo al tipo di penicillina adoperata (sale di sodio o di potassio), ma anche, a parità di tipo, in rapporto alla diversità della ditta di produzione. (Bristol, C.S.C., Squibb. ecc.).

La presenza della pectina non sembra che modifichi la forma dei cristalli; determina solo una leggera accelerazione del processo di cristallizzazione. I risultati da noi ottenuti, riportati nelle fotografie 15, 16, 17, 18, 19, 20, e 21 meriterebbero uno studio cristallografico e chimico che esula dalla nostra competenza. Appare comunque subito evidente la fondamentale dif-

ferenza esistente fra i cristalli ottenuti estemporaneamente, mettendo a contatto una soluzione di novocaina o di novocaina-pectina, con un sale di penicillina ed i cristalli di penicillina-procaina di produzione americana. Mentre nel primo caso è sempre dimostrabile una *particolare forma dei cristalli*, nel secondo caso (fig 5, 6, 22) manca una qualsiasi forma, come se i cristalli di penicillina-procaina avessero subito dopo la cristallizzazione un particolare trattamento di spezzettamento, di frantumazione o di altro, sì da far acquisir loro quelle caratteristiche dimensioni, ritenute necessarie ai fini della migliore azione ritardatrice.

A noi sfugge quale sia questo particolare trattamento, probabilmente legato a segreti di carattere commerciale; certo è però che esso giuoca un ruolo importantissimo nella eliminazione per lo meno di una parte degli inconvenienti da noi lamentati. Vano è risultato il nostro tentativo di ottenere una omogenea frantumazione dei macrocristalli mediante *prolungato* pestamento in un mortaio di porcellana. La fotografia 23 mostra infatti come accanto a cristalli piccolissimi, ridotti quasi ad una fine polvere, si trovino ancora cristalli di dimensioni e di forma quasi regolari. Nè migliori risultati abbiamo ottenuto facendo avvenire la cristallizzazione agitando fortemente e continuamente la soluzione di penicillina-novocaina.

Non è perciò da escludere che a questa particolare forma dei cristalli sia legata la notevole azione ritardatrice che si ha con la penicillina-procaina di produzione americana, cosa che invece non si ottiene con la nostra preparazione estemporanea poichè, in questo caso, i cristalli aventi quella determinata forma e quelle determinate dimensioni non sono preformati ma si formano al momento stesso della preparazione della soluzione e pertanto sia la forma che le dimensioni risultano necessariamente legate al tipo di penicillina impiegato ed al momento di utilizzazione della sospensione stessa.

Perciò, in base a questi risultati ed in base alle precedenti considerazioni, abbiamo trattato due gruppi di 8 conigli ciascuno inoculando loro, secondo la tecnica e con le modalità precedentemente descritte, le soluzioni di penicillina-novocaina e di penicillina-novocaina-pectina subito appena allestite, prima cioè della formazione dei macrocristalli. Poichè, in base alle prove di cristallizzazione (Tab. I), qualora noi adoperassimo la soluzione di novocaina all'1,25% il tempo disponibile prima del verificarsi della macrocristallizzazione sarebbe piuttosto esiguo, abbiamo ritenuto preferibile adoperare la soluzione di novocaina all'1%. Tale concentrazione infatti (tabella I) ci consente un sufficiente margine di tempo, prima dell'inizio della macrocristallizzazione, qualunque sia il tipo di penicillina adoperato e la ditta produttrice (tab. IV). I risultati ottenuti, inoculando gli animali subito dopo l'allestimento della soluzione, sono riportati nella tabella V e mostrano che, inoculando la soluzione di penicillina-novocaina e di penicillina-novocaina-pectina, si ottiene un'azione ritardatrice nel 100% degli

TAB. IV.

N. campione	Solvente: nov. 10/n pect. 20/n	Tipo di penicillina adoperata	Cristallizzazione dopo					Osservazioni
			4'	6'	8'	15'	30'	
1	"	Penicill. G so- dica Squibb	—	—	++	+++	+++	Presenza di microcri- stalli ben visibili già all'8'. Scarsa aderen- za dei cristalli alle pareti della boccetta. Agitato, il liquido ap- pare lattescente.
2	"	Penicill. G so- dica Specia	—	—	—	—	++	Assenza completa di cristallizzazione dopo 20'; quindi, dopo 30' formazione di grossi cristalli quasi intera- mente aderenti al fondo della boccetta. Liquido limpido.
3	"	Penicill. G so- dica Fallek	--	—	—	—	++	Formazione di ammas- si cristallini aderenti al fondo della boccetta. Liquido limpido.
4	"	Penicill. G so- dica Heyden	—	—	±	++	+++	Cristallizzazione visi- bile dopo 8', completa dopo 15'. I cristalli aderiscono in parte al- la parete interna della boccetta. Aspetto lat- tescente del liquido.
5	"	Penicill. G po- tassica Bri- stol	—	—	+	++	+++	Formazione notevole di cristalli dall'8', a- derenza parziale alla parete interna della boccetta. Aspetto lat- tescente del liquido.
6	"	Penicill. G po- tassica C.S.C.	—	±	+	++	+++	Rapida formazione di grossi cristalli in pre- valenza aderenti al fondo della boccetta. Liquido quasi limpido.
7	"	Penicill. G po- tassica Abbot	—	—	+	++	+++	Formazione rapida di cristalli; aderenza par- ziale alla parete inter- na della boccetta. Li- quido non molto latte- scente.

animali sia all'ottava che alla decima ora dalla inoculazione. Non si rileva in alcun caso livello ematico positivo ($> 0,25$ U. O. cc.) alla dodicesima ora. Si conclude pertanto che la novocaina, sia da sola che in associazione con la pectina, riesce, *in queste condizioni*, a determinare in maniera uniforme un'azione ritardatrice che è limitata poichè non arriva mai alla dodicesima ora, ma che è *costante* in quanto si manifesta sempre in tutti gli animali trattati.

E' verosimile che i migliori risultati che si ottengono con l'impiego della soluzione di novocaina, prima dell'inizio della fase di macrocristallizza-

TAB. V.

Inoculazione sottocutanea di 100.000 U.	Salasso compiuto dopo					
	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	24 b
Penicillina + novocaina 1%	1,4	1,2	—	—	—	—
	1,4	1,1	—	—	—	—
	1,3	1,3	—	—	—	—
	1,3	1,1	—	—	—	—
	1,3	1,2	—	—	—	—
	1,4	1,3	—	—	—	—
	1,4	1,2	—	—	—	—
	1,2	1,2	—	—	—	—
Penicillina + novocaina 1% + pectina 2%	1,4	1,1	—	—	—	—
	1,2	1,1	—	—	—	—
	1,3	1,2	—	—	—	—
	1,4	1,2	—	—	—	—
	1,3	1,1	—	—	—	—
	1,4	1,2	—	—	—	—
	1,2	1,2	—	—	—	—
	1,4	1,3	—	—	—	—

zione, siano in parte dipendenti dal fatto che, in tal maniera, si riesce ad iniettare l'intera quantità di penicillina contenuta nella boccetta, mancando la inevitabile perdita imputabile sia alla adesione dei macrocristalli alla parete interna della boccetta stessa, sia all'incompleto passaggio dei grossi cristalli attraverso l'ago della siringa. D'altra parte abbiamo già avuto modo di rilevare come, anche inoculando la soluzione di penicillina-novocaina subito dopo il suo allestimento, noi iniettiamo nei tessuti non già una vera soluzione ma una fine ed omogenea sospensione dei microcristalli ai quali non è improbabile sia devoluta, per le loro dimensioni, l'azione ritardatrice più uniforme e costante.

La dimostrazione sperimentale se la formazione di cristalli potesse aver luogo o proseguire in seno ai tessuti dell'animale, inoculato con la soluzione penicillina-novocaina, non ha finora dato un esito positivo nelle nostre condizioni di esperimento. Noi infatti abbiamo inoculato nel tessuto sottocutaneo

di alcune cavie, una soluzione di penicillina-novocaina appena allestita e quindi, dopo 20 o 30 minuti dal momento dell'inoculazione, abbiamo sacrificato l'animale, prelevando la parte di tessuto nella quale era stata praticata l'iniezione per allestire dei preparati istologici.

Nelle figure 24 e 25 si rileva un aspetto notevolmente dissociato del connettivo, con fibre spezzate e disposte disordinatamente. Esistono pochi elementi rotondeggianti con nucleo fortemente colorato e scarso citoplasma presenti nella zona di osservazione. Risulta però negativa all'esame microscopico la ricerca di forme cristalline.

Comunque, allo stato attuale dei fatti, noi constatiamo che l'inoculazione di 100.000 U.O. di penicillina, sotto forma di soluzione di novocaina con o senza pectina, determina nel 100% degli animali un livello ematico $>$ di 0,025 U. O. c.c. *fino alla decima ora*, mentre, impiegando la stessa sospensione dopo avvenuta però la formazione dei macrocristalli, si ottiene lo stesso livello ematico nel 100% degli animali soltanto *sino all'ottava ora*. Con l'impiego della sola pectina, senza novocaina, l'azione ritardatrice si esplica nel 100% degli animali, soltanto fino alla sesta ora, mentre con la soluzione acquosa, si arriva appena alla 4^a ora.

Ecco pertanto stabilita una progressione nella durata del livello ematico: l'impiego della novocaina contribuisce a migliorare l'azione ritardatrice e soprattutto a renderla molto più costante ed uniforme. Unica condizione per il suo uso rimane che la soluzione che si ottiene venga adoperata entro i primi 8 minuti dalla sua preparazione, prima cioè che si determini la formazione di macrocristalli, poichè, inoculando la sospensione cristallina dopo tale formazione, l'azione ritardatrice risulta minore e non costante. L'impiego di soluzioni di novocaina superiori all'1% diminuisce l'intervallo di tempo disponibile prima dell'inizio della macrocristallizzazione e pertanto è assolutamente sconsigliabile.

Come già detto a proposito della pectina, l'impiego della soluzione di novocaina determina un ritardo nell'assorbimento della penicillina che riveste una notevole importanza solo se rapportato alla corrispondente durata del livello ematico ottenuto con una identica quantità di penicillina in soluzione acquosa.

Tale effetto ritardante, nelle condizioni da noi raccomandate, pur essendo costante, è però *limitato* e non è in alcun modo paragonabile alla azione ritardante della penicillina-procaina di produzione americana. Pur trattandosi forse dello stesso composto chimico, nella preparazione americana del prodotto debbono necessariamente intervenire fattori a noi non noti che modificano notevolmente il prodotto finale ottenuto, permettendo così di arrivare alla nota azione ritardatrice che si estende fino a 24-48 ore ed oltre.

L'uso della soluzione di novocaina comporta una riduzione delle iniezioni da praticarsi giornalmente, maggiore di quella che si ottiene con il

semplice impiego di pectina; in confronto di quest'ultima ha però lo svantaggio che la soluzione di penicillina-novocaina deve essere iniettata tutta appena preparata, essendo sconsigliabile per i motivi precedentemente esposti utilizzarla dopo avvenuta la formazione dei macrocristalli.

Quanto alla tollerabilità noi non abbiamo dovuto mai constatare alcun fenomeno reattivo sia locale che generale.

L'impiego pertanto della soluzione di novocaina da sola o in associazione con la pectina, quale solvente della penicillina cristallizzata del commercio è consigliabile perchè comporta una notevole diminuzione nel numero delle iniezioni da praticarsi giornalmente. Ma è bene intendersi sul fatto che l'azione ritardatrice determinata dalla novocaina è *costante*, ma *limitata*; ciò comporta perciò la *necessità* che il dosaggio di penicillina per ogni singola iniezione e l'intervallo fra una iniezione e l'altra, sia attentamente valutato per non incorrere nell'inconveniente, purtroppo oggi non infrequente, di lasciare il paziente per diverse ore senza un sufficiente livello ematico per aver creduto bastevole l'inoculazione di sole 200.000 U.O. una o due volte nelle 24 ore.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia - Giugno 1949.

BIBLIOGRAFIA

(1) SCANGA F., Penicillina ritardo, sui mezzi impiegati per ritardare l'eliminazione o prolungare l'assorbimento della penicillina, osservazioni e ricerche. *Recenti Progr. in Med.* 5, 366, 1948.

(2) SCANGA F., Sulla possibile utilizzazione della pectina, quale mezzo ritardante l'assorbimento della penicillina. *Athena*, 15, 34, 1949.

(3) PONTECORVO M., Preparati di penicillina ad assorbimento ritardato. *Minerva Med.* 40, 3, 1949.

(4) HOBBY G. L., BROWN E., and PATELSKI R. A., The biological activity of crystalline procaine penicillin in vitro and in vivo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1948, 67, 6.

(5) SALIVAR C. I., HEDGER F. H., and BROWN E., Crystalline procaine penicillin. *J.A.C.S.* 1948, 70, 1287.

(6) HERRELL W. E., NICOLE D. R., and HEILMAN F. H., Procaine penicillin G. A new salt of penicillin which prolongs the action penicillin. *Proc. of the Staff Meet. of the Mayo Clinic*, 1947, 22 (25), 567.

(7) SULLIVAN N. P., SYMMENS A. T., MILLER H. C., and RHODEHANEL H. W. JR., A new penicillin for prolonged blood levels. *Science*, 1948, 107, 169.

(8) THOMAS E. W., LYONS R. H., ROMANSKY M. J., REIN C. R., and KITCHEN D. K., Newer repository Penicillin products. *J.A.M.A.* 1948, 137, (17), 1517.