

46. Massimo DE CARO — Sulla stabilità della penicillina bruta a diverse temperature e con differenti pH.

L'uso della penicillina « bruta » ossia della penicillina insieme con il terreno di coltura che è servito per produrla, era già stato utilizzato da Fleming (1) nel 1929-30 per la cura delle ferite infette. Ed effettivamente, quando ci troviamo di fronte ad una infezione strettamente localizzata e che offra la possibilità di poter essere messa *direttamente* a contatto con la penicillina (per es. ferite, scottature, piodermiti, ascessi aperti etc.) è possibile e anzi è consigliabile impiegare questo antibiotico solo per applicazione locale. Questo sistema di cura, oltre che comportare una notevole economia del medicamento e conseguentemente la possibilità di un suo impiego più diffuso, permette di ottenere in corrispondenza delle superfici infette, vale a dire a stretto contatto con i germi infettanti, una concentrazione massiva del medicamento, molto maggiore di quella che si avrebbe con il solo trattamento generale con penicillina purificata.

Infatti l'uso della penicillina pura per applicazioni locali, sotto forma di soluzione di un sale sodico o calcico contenente da 200 a 1000 U. O. per cc. è stato consigliato da Florey (2-3) Garrod (4), Keefer (5) e molti altri (6, 7, 8, 9). Ma, accanto a questo impiego di penicillina purificata, non mancò anche l'utilizzazione di penicillina bruta variamente preparata: Allston (10), Hobson (11), Fisher (12) consigliano di filtrare per Seitz il liquido bruto di cultura, Hobson e Galloway (13) indicano la così detta « home made penicillin », Enoch e Wallersteiner (14) e Babudieri (15) usano la « vivicillina », Scanga (16) il liquido di cultura in toto, senza alcuna preparazione o filtrazione.

Secondo questi autori il vantaggio dell'impiego di penicillina bruta in luogo di quella purificata sarebbe costituito dal fatto che nel liquido di cultura, oltre alla penicillina propriamente detta sono presenti anche altri metaboliti, anche essi ad azione antibiotica, i quali però sono distrutti durante il processo di purificazione ed estrazione della penicillina (17, 18, 19). Questo spiegherebbe infatti perchè un liquido che contenga poche U. O. per cc, come è nel caso della penicillina bruta, possa dare risultati uguali se non

superiori a quelli che si ottengono con soluzioni di penicillina pura contenenti 500-1000 U. O. per cc. Pertanto è da ritenere che, anche con una maggiore disponibilità di penicillina pura, tale da soddisfare tutto il fabbisogno nazionale, l'impiego della penicillina bruta per uso locale continuerà ad essere utilizzato. Ora una delle difficoltà che si incontra nella utilizzazione pratica della penicillina bruta è la sua instabilità. E' risaputo infatti che per rendere il più che sia possibile stabile questo antibiotico è necessario estrarlo sotto forma di un sale il più che sia possibile puro e seccarlo. Invece nel liquido di cultura, la penicillina è libera ed in soluzione; inoltre la reazione del mezzo è spesso notevolmente alcalina, la qual cosa contribuisce enormemente a distruggere la penicillina presente.

Abbiamo perciò voluto ricercare quale fosse per la penicillina bruta l'optimum di pH a tre differenti temperature. Per queste prove ci siamo serviti di un terreno di cultura all'infuso di mais nel quale abbiamo seminato il *Penicillium notatum* e dopo permanenza in termostato a 24° per 8 giorni dosato la quantità di penicillina contenuta in un cc. La penicillina bruta impiegata nelle nostre ricerche è risultata contenere 30 U. O. per cc. (titolazione col metodo delle brodo diluizioni).

Terreno al mais di Raper e Cochil

Nitrato di Sodio	gr. 3
Solfato di Magnesio 7H ₂ O	» 0,25
Fosfato acido di Potassio	» 0,50
Solfato di Zinco 7H ₂ O	» 0,044
Solfato di Manganese 4H ₂ O	» 0,004
Lattosio	» 40
Liquore di mais Standard	cc. 100
Acqua di fonte q. z. fino a	» 1000

Per le singole prove è stato egualmente adoperato il metodo delle brodo diluizioni scalari in maniera da avere in ogni provetta il seguente contenuto in U. O./cc.

Provette	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Contenuto U.O./cc.	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30

Le differenti temperature, nella scala dei vari pH, da noi studiate sono state fissate in termini precisi: volendo cioè sperimentare le variazioni di attività della penicillina a temperatura ambiente, dato che questo valore sarebbe stato diverso in conseguenza delle variazioni stagionali, abbiamo scelto due valori fissi: 24° e 37°. Per ottenere tali temperature ci siamo serviti di due comuni termostati. Per gli esperimenti a +5° abbiamo adoperato un frigorifero. I vari pH sono stati preparati con l'impiego della soluzione tampone di fosfati.

Risultati con la temperatura di 24°: la penicillina veniva distrutta rapidamente con i valori di pH estremi per la acidità e per l'alcalinità. Si aveva infatti distruzione completa della penicillina in seconda giornata con pH di 4,2 in quarta giornata con pH di 9,3. I valori intermedi di pH distruggevano meno rapidamente la penicillina: occorreano infatti rispettivamente 10 giorni e 13 giorni con pH 5,30 e pH di 8,00. La maggiore resistenza della penicillina si aveva con i valori compresi tra pH 6,2 e pH 7: l'optimum di pH era dato dal pH 7. Infatti mentre in quindicesima giornata la penicillina era distrutta con pH 6,2 nella misura dell'86%, si aveva in quindicesima giornata con pH 7 una distruzione di circa il 60%.

Si conclude pertanto che a temperatura di 24° l'optimum del pH corrisponde al valore di 7.

Risultati con la temperatura di 37°: la distruzione rapida della penicillina verificatasi alla temperatura di 24° coi pH massimi di acidità e di alcalinità ci ha indotto a ridurre in questa prova la scala dei pH da sperimentare. Abbiamo pertanto praticato le prove con pH da 5,30 a 8,00. I risultati sono stati concordi con i precedenti nel senso che anche in questa prova il pH più favorevole per la maggiore resistenza della penicillina si è confermato nei valori intermedi. Si è infatti avuta distruzione della penicillina in quarta giornata con pH 5,30 e di 8,00, distruzione in sesta giornata con pH 6,2, in decima giornata con pH 7. Se questa prova ha confermato che l'optimum di pH è 7, ha messo altresì in evidenza una minore resistenza della penicillina alla temperatura di 37° rispetto a quella di 24°.

TEMPERATURA 24° C.

Giorni			1	2	3	4	5	7	9	11	13	15
pH	PENICILLINA U.O./c.c.											
4,2		30	2	0								
5,30		30	26	18	14	14	8	2	2	0		
6,2		30	30	28	28	26	26	20	16	10	6	4
7		30	28	26	20	20	18	16	16	14	14	12
8,00		30	26	20	18	16	14	10	4	2	1	0
9,3		30	18	14	2	0						

TEMPERATURA 37° C.

Giorni			1	2	3	4	5	7	9	11	13	15
pH	PENICILLINA U.O./cc.											
5,30		30	20	10	2	0						
6,2		30	20	16	8	4	2	0				
7		30	22	16	8	2	2	1	1	0		
8,00		30	16	6	2	0						

TEMPERATURA +5 C.

Giorni			5	8	11	14	17	20		
pH	PENICILLINA U.O./c.c.									
4,2		30	0							
5,30		30	20	10	10	6	4	2		
6,2		30	26	20	14	10	8	8		
7		30	26	24	20	12	10	10		
8,00		30	20	10	4	2	2	1		
9,3		30	0							

Risultati con la temperatura di +5°: risulta anche da questa prova la rapidità di distruzione della penicillina determinata dai valori estremi di acidità e di alcalinità; distruzione completa della penicillina in quinta giornata con pH 4,2 e 9,3. Si è poi avuta una distruzione quasi completa in ventesima giornata con pH 5,30 e 8,00. Distruzione di circa il 75% in ventesima giornata con pH 6,2 e di circa il 66% con pH 7. A questa temperatura alla quale la penicillina resiste maggiormente i risultati sono stati concordi con i precedenti: l'optimum di pH si è mostrato, nelle tre prove, costantemente corrispondente a 7; subito dopo questo valore abbiamo ottenuto buoni risultati con pH 6,2 mentre in tutte le prove si è avuta distruzione più o meno rapida e completa della penicillina man mano che ci siamo allontanati da questi valori verso i due massimi di acidità e di alcalinità da noi usati.

In base ai risultati ottenuti nelle prove di stabilità della penicillina bruta a differenti temperature e pH da noi compiute possiamo trarre le seguenti conclusioni:

1) E' risultato anzitutto in modo chiaro e concorde che esiste un optimum di pH per la resistenza della penicillina alle diverse temperature e che questo optimum coincide col pH 7.

2) Che i valori estremi di pH specialmente quelli acidi sono dannosi per la stabilità della penicillina provocando una distruzione rapida e completa dell'antibiotico.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia

RIASSUNTO

L'A. ha studiato la stabilità della penicillina bruta a diverse temperature e con differenti pH mettendone in evidenza le variazioni. E' risultato che, coi valori estremi di acidità e di alcalinità adoperati, la penicillina bruta viene rapidamente distrutta e che l'optimum di pH nelle varie temperature studiate corrisponde al pH 7.

RESUMÉ

L'Auteur a étudié la stabilité de la pénicilline brute à diverses températures et avec pH différents, et il en rapporte les variations observées. Il en est résulté que la pénicilline brute soumise aux valeurs extrêmes employées d'acidité et d'alcalinité est rapidement détruite, alors que l'optimum de pH aux diverses températures étudiées correspond à pH 7.

SUMMARY

The Author has studied the stability of crude penicillin at various temperatures and different pH and reports the variations consequent thereon.

At the outermost values applied of acidity and alkalinity, crude penicillin has resulted to be quickly brought to destruction, whereas the optimum value of pH at any of the temperatures used has resulted to be pH 7.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser hat die Stabilität des ungereinigten (das i. vom Nährboden nicht getrenntes) Penicillins bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen pH erforscht und die Änderungen hervorgehoben. Es hat sich ergeben, dass bei den äussersten Werten der angewandten Acidität und Alkalinität da ungereinigtes Penicillin schnell zerstört wird und das Optimum des pH bei den verschiedenen erprobten Temperaturen bei pH 7 liegt.

BIBLIOGRAFIA

- 1) FLEMING A., *On antibacterial actions of the Cultures of Penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influence.* « Brit. I. Exp. Path. », 10, 226, 1929.
- 2) FLOREY M. E. a; FLOREY H. W., *General and local administration of Penicillin.* « Lancet » 1, 387, 1943.
- 3) FLOREY H. W., *Penicillin in War wounds. A reports from the Mediterranean.* « Lancet », 2, 742, 1944.

- 4) GARROD L. P., *The treatment of war wounds with Penicillin*. « Var Med. », 4, 319, 1944.
- 5) KEEFER C. S., BAKE F. G., MARSHALL E. K., LOCKWOOD I. S., a; WOOD W. B. Jr., *Penicillin in the treatment of infections, a repote of 500 cases*. « I.A.M.A. », 122, 1217, 1943.
- 6) FRASER J., THOMAS I. a. PIRIE A., *The treatment of chronically septic war wounds with Penicillin*. « War Off. Pubbl. », 7, 90, 1943.
- 7) FRASER J., JEFFREY I. S., MCLENNAU I. D. a. THOMSON S., *Prevention of wound sepsis by penicillin*. « War Off. Pubbl. », 7, 90, 1943.
- 8) JEFFREY I. S., *Application of Penicillin to war wounds*. « Brit. I. off. Surg. - Special Issue », 124, 1945.
- 9) BARRON I. N. a; MANSFIELD O. T., *The local application of Penicillin in Softe tissue lesions*. « Brit. M. I. », 1, 521, 1944.
- 10) ALLSTON I. M., *Use of crude Penicillium filtrata for local treatment*. « Brit. Med. I. », 1, 654, 1944.
- 11) HOBSON A. I., *Crude Penicillin*. « Lancet », 1, 614, 1944.
- 12) FISHER H. M., *The antibacterial properties of crude Penicillin*. « Bull. Johns. Hopkins. Hosp. », 73, 343, 1943.
- 13) HOBSON A. I., a. GALLOWAY L. D., *Home made Penicillin*. « Lancet », 1, 164, 230, 1944.
- 14) ENOCH H. E. a. WALLERSTEINER W. K. S., *A stendardized antibacterial Progen - frech metabolite preparation containg living Penicillium Notatum*. « Nature », 153, 380, 1944.
- 15) BABUDIERI B., *La vivicillina*. « Clinica Nuova », 1, 150, 1944.
- 16) SCANGA F., *Il controllo della sensibilità dei germi nella terapia penicillina. Un metodo di ricerca semplice e di pratica applicazione*. Rendiconti Ist. Sup. di Sanità, 1945.
- 17) ATKINSON N., *Antibacterial substances produced by molds Penicidin a product of the growth of a penicillium*. « Ausrt J. Exp. Biol. a. Med. », 20, 287, 1942.
- 18) KOCHOLATY W., *Purification and properties of the secoud antibacterial-substance produced by Penicillium Notatum*. « Science », 97, 186, 1943.
- 19) FISHER A. M., *The antibacterial properties of crude Penicillin*. « Bull. J. Hopkins Hosp. », 73, 343, 1943.