

A T T I
DELLA
SOCIETÀ PELORITANA
DI
SCIENZE FISICHE MATEMATICHE E NATURALI

PUBBLICAZIONE TRIMESTRALE

Comitato di Consulenza: Prof.ri Alibianchi Antonino, Aragona Giovanni, Barbaro d'Agostino Ada, Basile Francesco, Bionda Giacomo, Calapso Renato, Cortini Giulio, Dulzetto Filippo, Lampariello Giovanni, Landogna Francesco, Liberti Arnaldo, Messeri Albina, Monforte Francesco, Pata Oreste, Pieruccini Renzo, Polara Virgilio, Ricca Bruno, Teti Mario, Vendramini Renzo.

Comitato di Redazione: Baldanza Bartolo, Bolognari Arturo, Carini Giovanni, Cavallaro Carmelo, Cuzzocrea Giovanni, D'Amore Giovanni, Faraone Giovanni, Feneci Giovanna, Gandolfo Salvatore, Ginatempo Nicola, Imbesi Maria, Jannelli Santi, Mancuso Benedetta, Schipani Rosa, Stagno d'Alcontres Guglielmo.



GRAFICHE
"LA SICILIA"
MESSINA
1957

SUI PRINCIPI ATTIVI DELLO ÑOPO

RIASSUNTO — *E' stato condotto uno studio preliminare tendente a chiarire la natura di una droga (ñoop) in uso presso alcune tribù di indios del Sud America, che la ottengono dai semi di Piptadenia peregrina Benth.*

E', anzitutto, descritta la separazione delle basi ternarie e quaternarie, costituenti i principi attivi dello ñopo. La scarsa disponibilità di materiale ha permesso solo l'esame elettroforetico, spettrofotometrico e cromatografico. I dati di quest'ultimo permettono di osservare la presenza di almeno quattro componenti ternari e quattro quaternari; in base anche allo spettro di assorbimento nell'U. V., gli AA. ritengono si possa fare l'ipotesi che le quattro basi quaternarie siano identificabili con il C-alcaloide D, la C-calebassina (o il C-alcaloide I), la C-curarina e la C-calebassinina.

Gli AA. preannunziano la continuazione delle ricerche non appena in possesso di una adeguata quantità di droga.

INTRODUZIONE

Dai semi della *Piptadenia peregrina* Benth, una Mimosacea che cresce rigogliosa nel Sud America, gli indigeni — in particolare gli Otomacos, i Guahibos, i Galibas, gli Achaguas, i Paruros — preparano ancor oggi una polvere sottilissima che aspirano per le narici allo scopo di ottenere un'ebbrezza passeggera.

Storia

Le proprietà della *Piptadenia peregrina* (o ñopo o yopo) erano conosciute dagli aborigeni del Venezuela già prima della scoperta del

Nuovo Mondo e l'uso di essa da parte dei primi abitanti di quelle regioni sembra perdersi nella notte dei tempi.

Padre Joseph Gumilla (1) per primo diede notizie sull'uso e sulle modalità di preparazione della droga. Descrizioni successive si debbono a Ramòn Bueno (2), al Padre Juan Rivero (3), ad Alexander von Humboldt (4), a Lisandro Alvarado (5).

Numerosi sono i sinonimi, che variano da *niopo* (Pittier, 6) nel sud Venezuela, a *yopo* nell'alto Orinoco, a *cojoba* nel nord Venezuela e ad Haiti.

Studio botanico e tassonomico

Lo studio botanico della pianta fu condotto da Willdenow (7), che la classificò come una Jnga e successivamente da Humboldt (4), che la descrisse invece come una Acacia; come tale si trova indicata nell'opera « Sinopsis Plantarum Aequinoctialium Orbis Novi » di Kunth (8).

Il nome scientifico di *Piptadenia peregrina* Benth Hook, assegnato alla pianta, è riportato con una buona descrizione botanica da Pittier (6) e da Williams (9).

E' un albero di 12 m o più di altezza, con chioma a rami allargati; il tronco è usualmente inclinato, con diametro di circa 35 cm e libero di rami per metà dell'altezza. La corteccia è dura e rugosa, le foglioline (a gruppi da 30 a 80) sono minutissime, lineari, i fiori bianchi; i baccelli sono lunghi fino a 16 cm e larghi da 1,5 a 2 cm, molto duri, oscuri, formati da fibre intricatissime e ricchi di materie taniche.

Preparazione del tossico e modo di usarlo

Nel 1948, per incarico dell'Officina Sanitaria Panamericana, Granier-Doyeux (10) stese una relazione sull'uso del tossico; successivamente lo stesso ricercatore (11) condusse uno studio farmacodinamico e tossicologico dando una descrizione del metodo di preparazione e degli effetti principali del *niopo*.

Il procedimento di preparazione è il seguente: gli indios macinano finemente i semi secchi della *Piptadenia peregrina*, mescolando poi questa polvere con quella ottenuta tritutando il guscio di una Ampu-

laria. Vi aggiungono poi farina di yucca o di banana e pongono a cuocere su un fuoco molto intenso.

Si ottiene così una massa che, triturrata in un piatto speciale con pestello « ad hoc » dà una polvere sottilissima, rossiccia, spessa, irritante.

L'inalazione è effettuata dagli indigeni per mezzo di un osso biforcuto di uccello: l'estremità inferiore si immerge nella polvere mentre le due estremità superiori, coperte da due frutti secchi perforati, si applicano alle narici.

Studio farmacodinamico e tossicologico

L'etiologia della tossicomania può farsi risalire, secondo i vari Autori, alle seguenti tre cause: *a*) uso come eccitante in casi di guerra (limitato ad alcune tribù guerriere); *b*) uso come materiale di invocazione sacra; *c*) uso come stupefacente.

L'ipotesi di Humboldt (4) che l'effetto stimolante sia dovuto alla calce che si forma durante la cottura è discussa da Granier-Doyeux (11), essendo l'effetto del *ñopo* molto differente da una semplice azione stimolante la secrezione.

L'azione del *ñopo* sull'Uomo sembra, secondo Granier-Doyeux, possa qualificarsi come difasica: in effetti, durante un primo periodo, o prima fase, si ha un effetto stimolante con grande esaltazione del paziente e apparizione di deliri allucinatori. Questa prima fase presenta delle variazioni secondo la personalità del soggetto; non vi è dubbio comunque che questo tossico si comporti analogamente ad altri, come l'alcool, la marihuana, ecc.

La seconda fase sarebbe caratterizzata da una tendenza al sonno, seguita, secondo la maggior parte degli osservatori, da uno stato di netta ipnosi. Un fatto ben stabilito è che la droga produce, nei tossicomani che la usano, uno stato di ebbrezza particolare, con perdita della facoltà di ragionare, seguita da una perdita della coscienza che permane durante tutto il periodo dell'ipnosi.

E' interessante rilevare che una tribù, primitiva e barbara, come quella degli Otomacos guerrieri, usava il *ñopo* per eccitarsi prima del combattimento, mentre altre pacifiche come quella di Guahibos, praticava il vizio con altre finalità.

L'insieme di queste osservazioni sull'Uomo fa prospettare a Gra-

nier-Doyeux l'ipotesi che la droga possa essere farmacologicamente interessante come il peyotl o mescal, rilevandosi così utile nelle mani degli psichiatri.

L'inalazione al Ratto provoca, sempre secondo Granier-Doyeux, prurito alle narici. Verso il 5° minuto compare aritmia respiratoria molto apprezzabile, mentre verso il 10° l'animale comincia ad apparire ubriaco; contemporaneamente compare prurito diffuso per tutto il corpo. Dopo 15-20 minuti l'animale presenta il quadro tipico dell'ebbrezza da alcool e successivamente appaiono movimenti convulsivi. Gli animali si alzano sul treno posteriore e scuotono il corpo; il capo si agita come una campana. Dopo 35-40 minuti cessano questi sintomi e rimane solo lo stato di ebbrezza. In capo ad un'ora gli animali cominciano a ritornare alla normalità e tendono ad addormentarsi.

Interessante è l'osservazione che durante tutto questo periodo l'animale non reagisce a nessuno stimolo esterno nè mostra alcun aumento della aggressività.

Nel concludere la sua nota il Granier-Doyeux dice, fra l'altro: « Si è considerato interessante il presentare questa comunicazione preliminare per le seguenti ragioni:

a) risvegliare l'interesse dei chimici per lo studio della possibilità di separare principi attivi interessanti dalla *Piptadenia peregrina*, campo, questo, totalmente vergine fino ad oggi;

b) richiamare l'attenzione dei farmacologi e tossicologi sull'interesse dello studio sperimentale dei detti principi attivi ».

Avendo potuto, per la cortesia del Dott. Manuel Granier-Doyeux, Direttore dell'Institut de Medicina Experimental de la Universidad Central de Venezuela, disporre di una piccola quantità della droga, abbiamo condotto delle ricerche allo scopo di portare un contributo che consenta di chiarire la natura dei principi attivi del *ñopo*.

Sui risultati di essa riferiamo in questa nota, mentre i dati farmacologici e tossicologici formeranno l'oggetto di una ulteriore comunicazione.

PARTE SPERIMENTALE

Prove preliminari

g 0,492 di sostanza sono stati estratti con 50 cc di H₂O per percolazione.

La soluzione dà con idrato di bario e con acetato di piombo precip. bianco fioccoso; con CuSO₄ e con fenilidrazina nessun precipitato; riduce il cloruro ferrico e il nitrato d'argento ammoniacale; con acqua di bromo si ha un precipitato amorfo biancastro; con molibdato di ammonio precipitato biancastro; con solfato cerico colorazione rossa fugace che passa all'arancio e poi al giallo. L'estratto ctereo della soluzione non lascia residuo apprezzabile all'evaporazione. La soluzione è saggiata sulla Cavia, il Ratto, il Cane, il Colombo, rivelandosi tossica.

Lo spettro U. V. della soluzione acquosa presenta tre massimi a 290 m μ , 260 m μ e 210 m μ : il dializzato (contro acqua distillata) (tossico per il Ratto) ha spettro U. V. con massimi a 280 e 208 m μ .

Un percolato alcoolico della droga è portato a secco e ripreso con HCl diluito; si estrae con cloroformio, per eliminare i lipidi e i pigmenti. La soluzione cloridrica è alcalinizzata ed estratta ancora con cloroformio. La soluzione cloroformica è neutralizzata, portata a piccolo volume e filtrata dopo trattamento con carbone animale.

Per evaporazione del CHCl₃ e dissoluzione in HCl dil., si osserva nell'U. V. un massimo a 272 m μ .

La soluzione così decolorata è impiegata per la cromatografia ascendente su carta W 1, per 17 ore, solvente butanolo (100 p), HCl 22 Bè (20 p), acqua (fino ad intorbidamento persistente).

In luce U. V. si osservano quattro macchie a R_f 0,25; 0,38; 0,71 0,84 che, eluite con HCl dil., hanno presentato massimi rispettivamente a 260, 250, 250 e 270 m μ .

Una cromatografia nelle stesse condizioni con acetato di etilpiridina-acqua (26:20:9) permette di rilevare, con vapori di J₂, quattro macchie a R_f 0,05; 0,09; 0,13; 0,50.

Confermata l'azione tossica dell'estratto acquoso e constatato che la soluzione presenta le reazioni e lo spettro di assorbimento caratteristici degli alcaloidi del gruppo del curaro, abbiamo proceduto alla separazione delle basi ternarie dalle quaternarie ed agli esami spettrofotometrico, elettroforetico e cromatografico delle due frazioni.

Separazione delle basi ternarie dalle quaternarie

g. 1,6 di droga finemente triturati vengono trattati con 20 ml di una soluzione all'1 % di acido tartarico e lasciati a sè per qualche ora (12) (13). La polvere umida viene posta in un percolatore ed addizionata di tanta soluzione all'1 % di acido tartarico fino a comparsa delle prime gocce intensamente colorate. Si lascia a riposo per 24 h, quindi si inizia una percolazione ad una velocità di 20-25 gocce al minuto. Quando sono passati circa 80 ml di soluzione, il liquido non dà più il precipitato con il reattivo di Tanret nè dà reazione con una soluzione di solfato serico.

Il percolato, al fine di allontanare i tartrati di calcio e potassio, viene concentrato sotto vuoto fino a 10 ml; si neutralizza con potassa e si filtra ulteriormente per eliminare il tartrato di potassio nuovamente formatosi.

Il liquido filtrato viene portato a pH 8 e quindi estratto con cloroformio. Gli estratti cloroformici riuniti e seccati su Na_2SO_4 anidro lasciano, dopo distillazione del cloroformio, un residuo costituito da un olietto giallo-marrone dotato di odore aromatico.

Si ottengono in tal modo 7,5 mg di alcaloidi ternari.

La soluzione acquosa, contenente gli alcaloidi quaternari, viene portata a pH 2 con HCl e trattata, secondo Panouse (14), con 5 g di sale di Reinecke sciolto in 33 ml di acido acetico e 66 ml di acqua. Dopo qualche tempo si filtra e nel filtrato si ripete la precipitazione come già detto.

Il sale di Reinecke così ottenuto, asciugato su piatto, si presenta come una polvere microcristallina di color marroncino. Si ottengono circa g 1,35 di prodotto secco. Il sale di Reinecke viene trattato secondo Kapfhammer e Bischof (15): g 1 sciolti in 30 ml di H_2O vengono addizionati di una soluzione al 6^o/₁₀₀ di solfato d'argento fino a completa precipitazione del sale di Reinecke d'argento. Si filtra ed il filtrato limpido si addiziona di una soluzione di cloruro di bario (2,5626 g di $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 250 ml di acqua). Si allontana filtrando il BaSO_4 formatosi ed il filtrato, che non dà più la reazione del Ba^{++} nè dell' SO_4^{--} , viene concentrato sotto vuoto a b. m. fino a secchezza.

I cloruri degli alcaloidi quaternari così ottenuti vengono ripresi con alcool e fatti passare su colonna di allumina seccata a 100° C e previamente trattata con HCl. La colonna si lava con alcool al 50 % fino a che l'eluato non dia più reazione con solfato cerico. Si otten-

nero 88,5 mg di cloruri degli alcaloidi quaternari che sono stati separati, per successive concentrazioni, dall'abbondante NaCl presente.

Gli alcaloidi ternari e quaternari sono stati disciolti in acqua, leggermente acidulata per HCl. E' positiva la reazione con $Ce(SO_4)_2$.

Spettro di assorbimento nell' U. V.

Delle due soluzioni, contenenti 1 mg di principi attivi in 0,1 ml, sono stati determinati gli spettri di assorbimento prima e dopo decolorazione della soluzione con carbone attivo. La soluzione degli alcaloidi ternari presenta, in entrambi i casi, un massimo a 246 m μ . quella degli alcaloidi quaternari un massimo a 240 m μ ed uno a 280 m μ .

Elettroforesi su carta

Entrambe le soluzioni sono state sottoposte ad elettroforesi su carta W 31 bis, impiegando una soluzione di acido acetico al 25 % (pH = 2,5) ed operando su 1 mg di principi attivi.

La differenza di potenziale applicato agli elettrodi era di 300 V, la corrente 1,5 m A.

La localizzazione delle bande era effettuata per mezzo di una lampada U. V. Hanau, $\lambda = 366$ m μ .

I risultati sono stati i seguenti:

- a) alcaloidi ternari: si osservano, dopo elettroforesi per 2, 4, 7 ore, due larghe bande che hanno comportamento cationico e che in U. V. presentano una fluorescenza brillante.

Le mobilità (calcolate per il centro delle bande) sono rispettivamente

$$\mu_1 = 8,7 \times 10^{-7} \quad \text{cm/V/sec.}$$

$$\mu_2 = 5,0 \times 10^{-7} \quad \text{cm/V/sec.}$$

Solo la prima banda (mobilità $\mu = 8,7 \times 10^{-7}$), dà, debolissime, le reazioni con $Ce(SO_4)_2$ (colorazione rossa fugace che passa poi a gialla) con HNO_3 (giallo persistente) e con J_2 , (giallo pallido su fondo bruno).

- b) alcaloidi quaternari: si osservano anche qui, dopo 2 e 4 ore, due larghe bande, a comportamento cationico; in U. V. la prima, a mobilità

$$\mu_3 = 21,5 \times 10^{-7} \quad \text{cm/V/sec. ,}$$

presenta fluorescenza brillante, mentre la seconda, a mobilità

$$\mu_4 = 4,2 \times 10^{-7} \quad \text{cm/V/sec. ,}$$

presenta una fluorescenza meno intensa. Nessuna delle due bande dà le reazioni con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, con HNO_3 , e con J_2 .

Col metodo elettroforetico è quindi possibile rilevare la presenza, negli estratti di *ñopo*, di almeno quattro frazioni aventi in acido acetico al 25% le seguenti mobilità elettroforetiche su carta in cm/V/sec.:

4,2 $\times 10^{-7}$	(quatern.)
5,0 $\times 10^{-7}$	(terziaria)
8,7 $\times 10^{-7}$	(terziaria)
21,5 $\times 10^{-7}$	(quatern.)

Cromatografie

E' stata impiegata la tecnica di cromatografia su disco, poichè la piccola quantità di materiale a nostra disposizione non ci avrebbe permesso la cromatografia bidimensionale. D'altra parte le caratteristiche cromatografiche delle sostanze da separare non avrebbero permesso l'ottenimento di buoni risultati con la classica cromatografia monodimensionale.

Il continuo apporto di solvente dal basso era assicurato mediante pipetta capillare.

Si è impiegata carta W 1, in dischi del diametro di 22 cm; solvente metiletichetone saturo di acqua + 3 % di alcool metilico.

Si è applicato ogni volta 1 mg di sostanza. La rivelazione è stata effettuata con lampada U. V. ($\lambda = 366 \text{ m}\mu$) con i seguenti risultati (*):

(*) Trattandosi di cromatografia circolare, gli R_f sono ottenuti dividendo il quadrato della distanza dell'anello dall'origine per il quadrato della distanza del fronte dall'origine.

I valori sono così comparabili a quelli della cromatografia classica.

Gli R_e sono successivamente ottenuti rapportando gli R_f trovati a quello della curarina, posto = 1.

a) alcaloidi terziari

fluorescenza a R_c	=	0,02
assorbimento bruno a R_c	=	0,06
fluorescenza a R_c	=	0,12
fluorescenza a R_c	=	2,30

b) alcaloidi quaternari

fluorescenza leggera a R_c	=	0,33
» brillante a R_c	=	0,84
» leggera a R_c	=	1,00
» leggera a R_c	=	1,56

Nessuno degli anelli osservati ha dato le reazioni con $Ce(SO_4)_2$, con HNO_3 e con J_2 .

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

La piccola quantità di materiale a nostra disposizione non ci ha permesso di ampliare le ricerche nel senso da noi desiderato, il che ci avrebbe, forse, permesso l'identificazione di tutti i principi attivi presenti nella droga.

Ci sembra tuttavia che i dati ottenuti nei nostri esperimenti ci possano consentire di trarre utili considerazioni sulla natura e sulle proprietà delle sostanze ritrovabili nel *πoπo*.

Nella letteratura in nostro possesso, non è possibile riscontrare sufficienti dati relativi agli alcaloidi terziari, mentre abbastanza numerose sono le ricerche attorno agli alcaloidi quaternari del gruppo del curaro.

I nostri dati (R_c in metiletilchetone e spettro di assorbimento nell'U. V. delle soluzioni acquose), confrontati con quelli riportati da Schmidt, Kebrle e Karrer (16) per la cromatografia e da Kebrle, Schmidt, Waser e Karrer (17) per lo spettro di assorbimento, ci permettono di prospettare l'ipotesi che nelle quattro frazioni quaternarie da noi osservate possano identificarsi i seguenti alcaloidi: C-alcaloide D, C-calebassina (o C-alcaloide I), C-curarina, C-calebassinina.

Che sia presente il C-alcaloide D può anche supporre per la comparsa della colorazione rossa, che passa successivamente a gialla, per

trattamento della soluzione con solfato cerico. Tale colore potrebbe, inoltre, aver mascherato quelli caratteristici degli altri alcaloidi presenti.

La presenza, tra le basi terziarie, di una sostanza ad elevato R_e (2,3) può fare supporre che essa si sia formata (Wieland e Pistor, 18) per perdita di acqua da una base quaternaria, durante l'evaporazione.

* * *

Essendoci note le difficoltà incontrate da tutti i ricercatori nei tentativi di identificazione degli alcaloidi del curaro, non possiamo ritenere ineccepibili le considerazioni sopra riportate. Riteniamo ad ogni modo di avere indicato una possibile via da seguire in ricerche più approfondite, che contiamo di intraprendere non appena saremo venuti in possesso di più grandi quantità di droga, che ci sono già state promesse.

BIBLIOGRAFIA

- (1) GUMILLA, J. - El Orinoco ilustrado (1741).
- (2) BUENO, R. - (cit. da ALVARADO, 5).
- (3) RIVERO, J. - Historia de las Misiones de los Llanos de Casanare.
- (4) VON HUMBOLDT, A. - Viaje a la Regiones Equinocciales del Nuevo Continente.
- (5) ALVARADO, L. - Datos etnográficos de Venezuela.
- (6) PITTIER, H. - Manual de Plantas usuales de Venezuela. Lit. y tip. del Comercio, Caracas (1926).
- (7) WILDENOW, A. - Sp. pl. 4, 1027, pl. II.
- (8) KUNTH, C. S. - Sinopsis Plantarum Aequinoctialium Orbi Novi.
- (9) WILLIAMS, L. - Exploraciones Botánicas en la Guyana Venezolana (1939).
- (10) GRANIER-DOYEUX, M. - Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana, 27, 156 (1948).
- (11) GRANIER-DOYEU, M. - Gaceta Médica de Caracas, 56, 1 (1948).
- (12) KING, H. - J. Chem. Soc., 956, 3263 (1949).
- (13) ADANK, K., BOVET, D., DUCKE, A., MARINI BETTOLO, G. B. - Gazz. Chim. Ital., 83, 966 (1953).
- (14) PANOUSE, J. J. - Bull. Chem. Soc. 16, 594 (1949).
- (15) KAPFFHAMMER, J. e BISCHOF, C. - Z. physiol. chem., 191, 182 (1932).
- (16) SCHMIDT, H., KEBRLE, J. e KARRER, P. - Helv. Chim. Acta, 35, 1864 (1952).
- (17) KEBRLE, J., SCHMIDT, H., WASER, P. e KARRER, P. - Helv. Chim. Acta, 36, 103 (1953).
- (18) WIELAND, H. e PISTOR, H. J. - Annalen der Chemie, 532, 68 (1938).