

# G.B. MARINI BETTOLO E IL CURARO

Corrado Galeffi

già *Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## INTRODUZIONE

A conferma dell'esistenza degli antipodi sulla terra e quindi della sua sfericità, negata dai filosofi aristotelici nel Medioevo, ci fu prima l'avventura dei fratelli Niccolò e Matteo Polo, commercianti veneziani, verso il Catai nel 1255 e, oltre due secoli dopo, quella di Cristoforo Colombo per raggiungere lo stesso Oriente (il Cipango di Marco Polo) da Occidente con le caravelle della corte di Spagna. Avventura con conquista, questa seconda, se già due anni dopo il fatidico 1492 (quando in Italia erano scomparsi Lorenzo dei Medici ed il papa Innocenzo VIII) il papa spagnolo Alessandro VI, il padre di Cesare Borgia, doveva con il Trattato di Tordesillas definire tra Spagna e Portogallo il confine (*raya*) delle zone di reciproca influenza nel Nuovo Mondo. Dopo la scoperta, quindi, la conquista [1a, 1b] condotta con pesanti armi da fuoco che, contemporaneamente e per la prima volta, doveva sperimentare anche l'Italia con l'invasione di Carlo VIII. Per difendersi dai Conquistadores gli Amerindi avevano, al massimo della loro tecnica, le frecce ("di cui sono morti tanti Spagnoli" dirà Cienza de León) con sostanze irritanti o veleni, e tra questi il curaro oggetto di questa nota. Maraviglie naturali inimmaginabili "mai vedute prima d'ora da li christiani", animali strani come pappagalli, manatee, iguana, piante gigantesche come sequoie, o strane come i cactus, nuove piante alimentari (arachidi, mais, pomodoro, patata, girasole, cacao), l'uso del fumare, la gomma, il magnifico cotone, tanto stupirono gli Europei che Filippo II mandò il suo medico Francisco Hernández. Il suo voluminoso rapporto, *Novae Hispaniae Thesaurum*, raggiunse il Regno di Napoli per esser poi pubblicato per iniziale interessamento di Federico Cesi dall'Accademia Nazionale dei Lincei e ristampato nel

1992 sempre dai Lincei [2] con lo studio introduttivo di Giovanni Battista Marini Bettolo del quale vogliamo qui ricordare in particolare il contributo nello studio del curaro.

## STORIOGRAFIA DEL CURARO

Il curaro è un veleno di origine vegetale elaborato dagli Indi del Sud America (Figura 1) applicato o su piccole frecce (*dart, flecha*) da lanciare con lunghe cerbottane (Figura 2) o su dardi (*arrow, dardo*) da lanciare con archi, veleno utilizzato pure in trappole per la caccia, ma anche in conflitti e per recinzioni, che uccide per paralisi respiratoria e degli arti. L'inattività per via orale permette l'utilizzazione della selvaggina per l'alimentazione.

Graffiti con scene venatorie si sono trovati in gran numero in America ed anche nel bacino del Rio delle Amazzoni; essi sono contemporanei alle testimonianze dei famosi arcieri Sumeri ed Accadi della Mesopotamia. La storia precolombiana del curaro è però per lo più basata, almeno sinora, più che su reperti archeologici, su documenti scritti, alcuni dei quali ancora non considerati. La prima citazione è quella di un lombardo, Pietro Martire di Angera, che



Figura 1. - Indio Yanomami che sbriciola materiale vegetale secco per la preparazione del curaro.

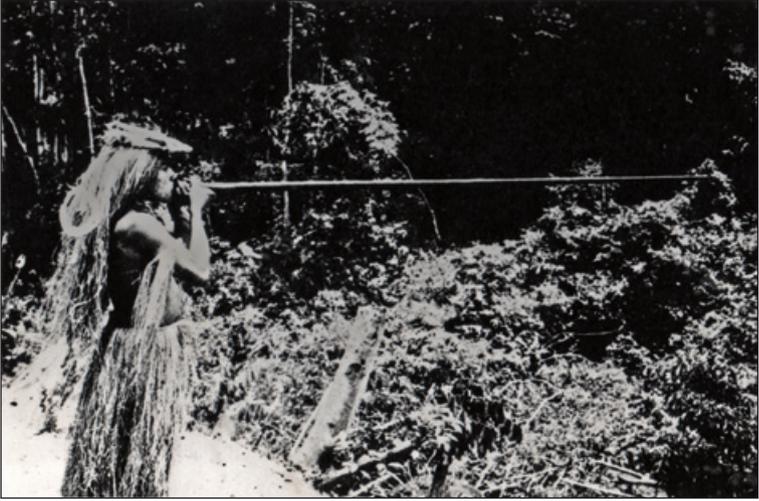


Figura 2. - Indio Yanomami che tira una piccola freccia per la caccia con la cerbottana.

nel 1516 scrisse a Papa Leone X di erbe velenose utilizzate per un veleno per frecce fatto da donne “che muoiono a seguito della preparazione” e pubblicò i risultati delle sue osservazioni nel 1530 col titolo *De orbe novo*. Nelle successive informazioni in lingua spagnola sulle frecce *herboladas* si devono distinguere, come stabilito successivamente, quelle con veleni a base di piante delle famiglie delle Apocynaceae ed Asclepiadaceae, contenenti sostanze ad attività cardiocinetica, e quelle a base di lattice irritante di Euphorbiaceae, contenente esteri del forbolo, sperimentate dai conquistatori e che uccidevano *rablando*. Seguono ben presto numerose altre testimonianze sul curaro, prima quella di Alonso Pérez de Tolosa nel 1548 presso il lago Maracaibo (Venezuela), poi quella del sopramenzionato cronista Cienza de León nella *Crónica del Perú* del 1553 e contemporaneamente quella del sacerdote Lopez de Gómara che seppur mai stato nel Nuovo Mondo scrisse una *Historia general de las Indias*. Tutti riferivano della morte delle donne che preparavano il curaro mentre la testimonianza di un secolo fa dell'etnologo francese Jean Vellard parlava invece di preparazione del curaro lontano dagli sguardi femminili. È del 1577 l'osservazione da parte di Diego de Ortegón nella regione dell'alto Rio Napo del bacino dell'Amazzonia, denominata Montaña, di cerbottane e frecce intrise con erbe

che “entrate nel sangue uccidono rapidamente” ma è solo della fine del secolo, 1596, da parte di Lawrence Keymis a capo di una spedizione nella Guyana la prima citazione del termine *ourari* (o *k-urary* “dove viene si muore”) di origine caribi come il termine cannibalismo (deformazione di caribi), pratica descritta da Padre Gumilla.

Il francescano Fray Pedro de Aguado, antropologo di ampia formazione, a seguito del suo viaggio nel 1608 presso i Pijados del Venezuela nelle sue *Noticias historiales* parlerà di “piccole graffiature senza rimedio perché il veleno condotto nel sangue giunge al cuore in ventiquattro ore provocando tremore e perdita della ragione fino a far dire frasi atroci e disperate”.

Tra i missionari gesuiti che almeno fino alla loro cacciata dal Sud America nel 1768 svolsero opera di penetrazione tra le popolazioni indigene, promovendo l'uso ed il commercio del curaro con baratto di machete, arpioni ed asce, particolare citazione merita Padre José Gumilla (1686-1750), un precursore di Jean Jacques Rousseau nell'apprezzamento della naturalezza primigenia. Nella sua *Historia natural del Orinoco* riporta alcuni aspetti della preparazione del curaro, quali macerazione di un solo vegetale con acqua, concentrazione della soluzione ottenuta, segretezza nella preparazione, inattività per via orale al punto che una volta spalmato sulle punte delle frecce, queste vengono scaldate con le mani e ruotate in bocca prima dell'uso. Egli ne sottolinea inoltre la rapidità ed efficacia scrivendo che “basta una graffiatura per l'uomo colpito che il sangue si coagula e quello muore tanto rapidamente che può appena dire tre volte il nome di Gesù”.

Nel Settecento l'interesse per il curaro assunse l'aspetto scientifico. Nel 1735 Charles Marie de La Condamine, inviato dall'Accademia di Francia in Ecuador per misurare il meridiano terrestre, riporta tra gli ingredienti del curaro Ticuna (liquido nero) della Montaña il succo di liana di ambihuasca, pianta denominata Abuta (oggi identificata con una Menispermacea, il *Chondodendron tomentosum* Ruiz et Pavon; χόνδρος granulo, δένδρον legno) in associazione con corteccia di una Loganiacea identificata solo nel 1847 come *Strychnos castelnaeana* Baill. da F. de Castelnau e Weddel. Per un curaro della Guyana l'ingrediente attivo è risultato invece la corteccia della liana di mavacure (poi identificata come *Strychnos guianensis* [Aubl.] Mart.). Di questo secondo, detto curaro di Esme-

ralda, sarà descritto in dettaglio il metodo di preparazione, sulla scia di quanto riportato precedentemente da Padre Gumilla, dal grande naturalista Alexandr von Humboldt, accompagnato in zone infestate da insetti dal botanico francese A.J.A. Bonpland sofferente di malaria (Humboldt, 1814-1819, *Voyage aux régions équinoxiales*, VII e VIII, Paris).

## STUDI FARMACOLOGICI E CHIMICI

Il curaro, il cui commercio promosso, come per l'olio di copaive ed il cacao, dai Gesuiti era praticato dai meticci (Figura 3) – un vasetto d'una oncia costava 4 patacones, cioè 4 pesos – raggiunse anche l'Europa ed un campione Ticuna, assieme alla freccia (Figura 4), fu inviato dalla Società Reale di Londra a Felice Fontana, protomedico di Pietro Leopoldo, Granduca di Toscana, che per i suoi esperimenti oltre gli animali dell'aia, quali polli, piccioni, conigli, usò per la prima volta un animale d'origine amazzonica, il porcellino d'India. Nella sua relazione (*Sui veleni della vipera e sui veleni americani*, III, 24, 1787) riporta che il veleno introdotto nel sangue uccide all'istante, il corpo non manifesta nessun segno di respirazione, è abbattuto e rilassato in tutte le sue parti molto più di quanto si osservi negli animali morti da lungo tempo.

Il primo esame diciamo chimico del curaro di *Strychnos guianensis* raccolto da Humboldt fu effettuato a Bogotà nel 1827 da F.D. Roulin e J.B. Boussaingault su incarico di Simon Bolivar, El Li-

bertador. Essi, oltre ad elaborarne un "principio amaro", esclusero assolutamente nel curaro la presenza della stricnina isolata invece nel 1818 dai semi di *Strychnos asiatiche*, *S. nux vomica* L. e *S. ignatii* Berg, da J. Pelletier e J.B. Caventou, ai quali si



Figura 3. - Vasetto di terracotta e bottiglietta usati come contenitori per il curaro.



Figura 4. - Tubo di bambù contenente piccole frecce della tribù Guaiacas dell'Alto Orinoco e panetto di curaro avvolto con foglie.

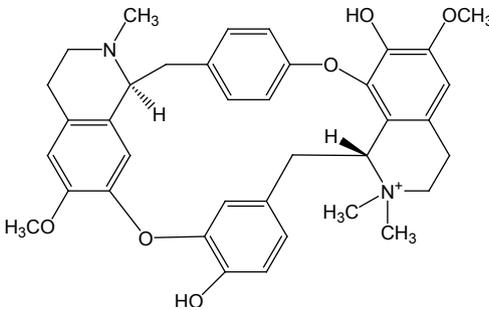
deve, con un accorto uso di solventi, anche l'isolamento dell'emetina, della chinina e della caffeina. La stricnina, a differenza del curaro, non è solubile in acqua, provoca

morte per via orale con vertigini, rigidità muscolare e scosse tetaniche. La frazione solubile in acqua del curaro, invece, come mostrò Claud Bernard con i suoi brillanti esperimenti presentati al College de France e descritti in *Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses*, Paris, 238, 1857, produce il blocco delle trasmissioni neuromuscolari (se ne pensò poi anche l'uso nello shock tetanico) senza azione sul sistema nervoso centrale e sulla diretta eccitabilità. Al curaro, o meglio ai vari curari, egli profetizzò l'avvenire come farmaco solo dopo la conoscenza della composizione. A questo riguardo, sulla base delle informazioni precedenti, il farmacologo tedesco Rudolf Boehm (*Abhandl. Kgl. sächs. Ges. Wissensch.* 1895, 22, 203) fece una classificazione di tipo etnografico distinguendo i curari sulla base del loro contenitore mentre alcuni decenni dopo l'etnologo francese Jean Vellard nella sua nota dal titolo "Le curare des indiens Nambikwara" (*Comptes Rendus* 208, 2104, 1938) associò quella classificazione a diverse zone del bacino amazzonico. Fu così che si iniziò a parlare di curaro di calebassa (zucca) tipico della Guyana e del basso bacino amazzonico, curaro in tubo (tra due nodi della canna di bambù) della zona subandina orientale (Marañon e alto Rio Napo fino a Uaupés) e curaro in vaso di terracotta (*pot*) della zona intermedia della *hyleia* amazzonica tra Rio Negro e Rio Javari.

La natura salina e quindi solubile solo in acqua ritardò l'isolamento in forma pura dei costituenti attivi dei curari. Solo nel 1935 H. King, direttore del dipartimento di Chimica dell'Istituto di ricerche mediche di Gran Bretagna, ottenne in forma cristallina, accanto ad alcaloidi terziari privi di attività curarizzante, l'unico alcaloide qua-

ternario presente, la *d*-tubocurarina (H. King, *J. Chem.Soc.* 1935, 1381). Ad essa egli attribuì la struttura bisbenzilisoquinolinica bisquaternaria (corretta nel 1970 in monoquaternaria (1)). La stessa fu isolata quattro anni dopo da O. Wintersteiner e J.D.D. Dutcher dalla pianta corrispondente, il *Chondodendron tomentosum*.

Poco dopo, nel 1942, a Montreal, a cento anni esatti dalla prima utilizzazione dell'etere in anestesia, H.R. Griffith e E. Johnson uti-

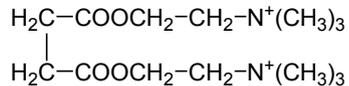


(1) *d*-tubocurarina

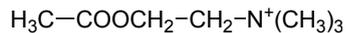
lizzeranno in anestesia chirurgica un preparato a base di *d*-tubocurarina standardizzato col test *head drop* del coniglio. Questa pratica innovatrice, pubblicata su *Anesthesiology* (H.R. Griffith, J.R. Goodall, 1942, 3, 227), in associazione

con l'intubazione tracheale e la ventilazione polmonare, utilizzata con profitto già sul finire del secondo conflitto mondiale, non troverà subito buona accoglienza: il presidente della Società francese di Anestesiologia la bollò come un atto sacrilego affermando che "Dio ha dato all'uomo il respiro e solo Dio ha il diritto di toglierglielo".

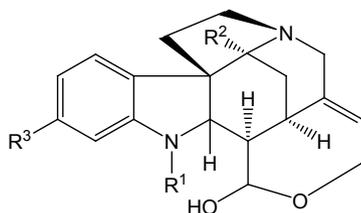
La struttura bisquaternaria assegnata erroneamente alla *d*-tubocurarina servirà come modello secondo l'idea iniziale di Daniel Bovet (1946) per progettare agenti curarizzanti di sintesi quali gallamina [3], decametonio [4] ed il più attivo suxametonio (succinilcolina) (2) [5]. La distanza di 12-14 °A tra i due gruppi ammonici quaternari, oltre ad un fattore sterico, fu considerata determinante, nella relazione attività/struttura, per spostare, a livello delle sinapsi, l'acetilcolina (3) nell'antagonismo competitivo a livello del recettore, depolarizza-



(2) succinilcolina



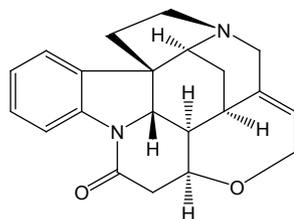
(3) acetilcolina



|                         | R <sup>1</sup>    | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup>   |
|-------------------------|-------------------|----------------|------------------|
| (4) diabolina           | COCH <sub>3</sub> | H              | H                |
| (5) desacetildiabolina  | H                 | H              | H                |
| (8) 11-metossidiabolina | COCH <sub>3</sub> | H              | OCH <sub>3</sub> |
| (9) 3-idrossidiabolina  | COCH <sub>3</sub> | OH             | H                |

in Svizzera a H. Schmid e P. Karrer [8] di risolvere le complesse miscele di alcaloidi curarizzanti bisindolici e, questi sì, bisquaternari, dei curari di calebassa a base di *Strychnos* e di identificare strutturalmente, il primo, tra l'altro, i monomeri diabolina (4) e desacetildiabolina (aldeide di Wieland-Gumlich) (5), i

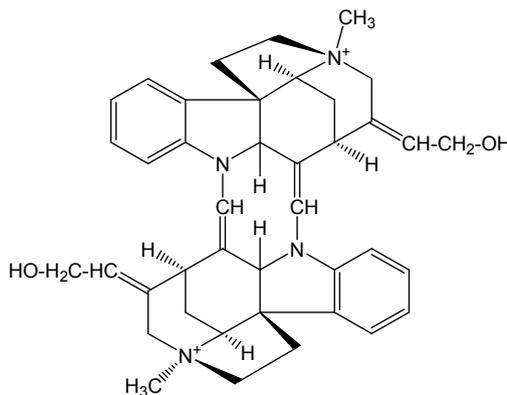
secondi i dimeri quaternari C-tossiferina (6), C-curarina, C-calebassina, C-diidrotossiferina, C-alcaloidi A, D, E, F, G e H.



(7) stricnina

re la membrana, impedire lo scambio ionico e bloccare così la trasmissione neuromuscolare, come poi interpretato a livello molecolare da Del Castillo [6].

Solo l'utilizzazione della cromatografia su cellulosa sia a livello analitico che preparativo permetterà negli anni '50 prima al tedesco H. Wieland [7] e poi



(6) C-tossiferina

A differenza della *d*-tubocurarina (1), per la quale la sintesi chimica era relativamente difficile (ed appunto per questo si era fatto ricorso a modelli molecolari grossolanamente simili per curarizzanti di sintesi), per gli alcaloidi

di calebassa la struttura dimera simmetrica suggerì una sintesi biomimetica a partire dalla desacetildiabolina (5) chimicamente ottenibile dalla stricnina (7), alcaloide assente nelle *Strychnos* americane ma disponibile come si è detto in abbondanza a partire da quelle asiatiche. Fu così che si ottenne la C-tossiferina (6) e si progettò l'alcuronio per utilizzazione in anestesia chirurgica.

## ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ: G.B. MARINI BETTOLO

Contemporaneamente agli studi in Svizzera sugli alcaloidi di calebassa iniziò in Italia all'Istituto Superiore di Sanità, di cui era direttore Domenico Marotta, l'esame chimico e farmacologico delle *Strychnos* sudamericane da parte di Daniel Bovet, direttore del Laboratorio di Chimica Terapeutica (futuro premio Nobel) e di Giovanni Battista Marini Bettolo, responsabile della sezione chimica, dopo i loro studi sui simpaticolitici della serie dell'ergotamina. La ricerca contò sulla collaborazione del Conselho Nacional de Pesquisas e dell'Istituto Agronomico do Norte (Belém, Brasile) nelle persone di A. Ducke e K. Adank e quindi sulla disponibilità di numerose specie botaniche del genere *Strychnos*.

Fu grazie a questo che nel 1953 uscì la prima pubblicazione di G. B. Marini Bettolo sulla *S. trinervis* (Vell.) Mart. [9] con la valutazione dell'attività curarizzante degli alcaloidi quaternari – isolati come reineckati e convertiti poi in cloruri con  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  e  $\text{BaCl}_2$  – sul *rectus abdominis* del rospo ed con il test *head drop* sul coniglio. Per il loro isolamento ed identificazione cromatografica Marini Bettolo si avvale dell'esperienza precedentemente acquisita nel campo della cromatografia su carta con l'uso di diversi metodi di rivelazione chimica e di fluorescenza e dell'elettroforesi anche in collaborazione con M. Lederer [10] futuro editor del *Journal of Chromatography*.

In seguito, tramite i contatti che aveva stabilito durante la precedente esperienza sudamericana, Marini Bettolo organizzò nel 1954 in collaborazione con C. Chagas (direttore del Instituto de Biofisica da Universidade do Brasil) una missione nell'Amazzonia finanziata dall'UNESCO e i risultati degli studi multidisciplinari di etnografi, naturalisti, fisiologi, farmacologi, botanici e chimici furono presentati in un Convegno di Rio de Janeiro del 1957 [11].

La ricerca fitochimica e farmacologica di Marini Bettolo e Bovet riguardò poi gli alcaloidi quaternari di 13 specie di *Strychnos* brasiliane [12] ed ancora 18 [13] e continuerà in collaborazione con altri ricercatori sudamericani, quali A. Pimenta, E. Caggiano, J.A. Coch-Frugoni, I. Gonzales Huerta, E.G. Montalvo, ed italiani come S. Chiavarelli, M.A. Iorio. C.G. Casinovi, M.A. Ciasca, A. Carpi.

Due dei molti articoli sui risultati conseguiti, sempre su *Strychnos* e curari, saranno presentati sul primo volume di *J. Chromatog.* [14] del cui Advisory Board Marini Bettolo sarà per vari anni membro. Divenuto Capo dei Laboratori di Chimica Biologica nel 1960 continuerà lo studio fitochimico degli alcaloidi di *Strychnos* utilizzando pure la tecnica di cromatografia su strato sottile e con N. G. Bisset (Faculty of Pharmacy, Chelsea College, Londra) condurrà anche un esame comparativo delle specie di *Strychnos* sudamericane, africane ed asiatiche [15] suggerendo che non la stricnina (7), assente nelle *Strychnos* del Sud America – i semi di *S. panamensis* Seem saranno l'unica eccezione [16] – ma la diabolina (4), presente nei tre continenti e di struttura strettamente correlata alla stricnina, sia attraverso la desacetildiabolina (5) il precursore degli alcaloidi indolici dimeri terziari e quaternari (solo questi ultimi curarizzanti) tipici del Sud America.

La collaborazione di Marini Bettolo con Ettore Biocca, parasitologo dell'Università di Roma, protagonista di molte spedizioni a partire dal 1947 in Sud America, porterà notevoli risultati nel campo della conoscenza dei curari. Biocca documenterà prima la preparazione del curaro Makù dell'Alto Rio Negro [17] e darà testimonianza della incredibile avventura di Helena Valero, rapita da ragazzina dagli Indi Yanomami e della sua sofferta successiva vita tra due mondi ed etnie. I viaggi di Biocca porteranno anche alla disponibilità, e quindi all'identificazione, dei costituenti attivi di due preparati allucinogeni usati dai *pagè* (shamani) per inalazione, il Paricà (confluenza tra Rio Uaupés e Rio Negro) a base di armina ottenuto da liana di *Banisteria caapi* Spruce ex Griseb. e l'Epenà degli Yanomami dell'alto Orinoco ottenuto da semi di *Piptadenia peregrina* L. (Benth.) e di *Mimosa acacioides* Benth. e dalla corteccia di *Virola* sp. a base di N, N-dimetiltriptamina [18]. Nel viaggio del 1964 organizzato dal Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Biocca [19] sarà testimone della preparazione di un nuovo curaro “di torrefazione e percolazione”, quindi senza ebollizione, da parte degli Yanomami dell'Alto Orinoco

e del medio bacino del Rio Negro, conservato sulle punte delle frecce, pure osservato dal missionario J. Barker [20], curaro che quindi non rientrava nella classificazione etnografica di Boehm basata sui contenitori. Campioni di questo curaro hanno dimostrato [21] spiccata attività ( $c = 1 \text{ mg/kg}$ ) sul coniglio con atonia muscolare a partire dal *head drop* e morte per paralisi respiratoria. Come osservato anche sull'animale in narcosi all'uretano ed in respirazione artificiale, la variazione delle contrazioni ritmiche del muscolo gastrocnemio provocate dalla stimolazione del nervo sciatico procedeva senza alterazioni cardiovascolari come dimostrato dall'andamento della pressione arteriosa. L'esame cromatografico degli alcaloidi quaternari di questo curaro rileverà la presenza della C-curarina da *Strychnos* e della *d*-tubocurarina da *Chondodendron*.

L'ipotesi formulata in tempi diversi da tre etnologi, lo stesso Biocca, Lazzarini-Peckolt [22] e Bauer [23] che solo certi curari come il Makù subissero un considerevole aumento di attività nella miscelazione e preparazione dalle corrispondenti piante ha trovato conferma sperimentale. Paragonando infatti [24] l'attività curarizzante sul topo albino degli alcaloidi quaternari dei curari Yanomami e Makù con quella degli alcaloidi ottenuti dalle corrispondenti piante, *Strychnos* sp. e *Chondodendron Bioccai*, si è osservato solo per questa ultima un aumento considerevole dell'attività per metilazione all'azoto con ioduro di metile suggerendo così che qualcosa del genere avvenisse anche nel complicato processo di preparazione effettuato dagli indi per alcuni curari.

L'enorme progresso delle tecniche strumentali ed analitiche darà un notevole contributo alla ricerca fitochimica. Presso il Laboratorio di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità sarà disponibile un prototipo di spettrometro di massa e un apparecchio di dispersione ottica rotatoria per risolvere con l'effetto Cotton problemi di configurazione assoluta e stereochimica e successivamente per lo stesso scopo un apparecchio di dicroismo circolare. Ma sarà la risonanza magnetica nucleare, prima dell'idrogeno e poi del  $^{13}\text{C}$ , a costituire una svolta fondamentale. E sarà proprio per iniziativa di Marini Bettolo che nel 1961 si renderà disponibile presso il Laboratorio di Chimica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore (UCSC) in Roma uno dei primi apparecchi di RMN (Varian T 60) che permetterà di chiarire la struttura delle numerose sostanze isolate da piante della

flora sudamericana all'Istituto Superiore di Sanità (del quale Marini Bettolo diventerà direttore nel 1964) nei Laboratori di Chimica Biologica (dopo il 1976 Chimica del Farmaco) e al Centro di studio del CNR per la chimica dei recettori e delle molecole biologicamente attive presso la stessa UCSC.

L'interesse per piante contenenti alcaloidi, indolici da *Strychnos* (Loganiaceae) e benzilisoquinilici (da Menispermaceae ed Annonaceae), delle quali si poteva presumere l'utilizzazione per la preparazione dei curari, conterà sulla collaborazione stabilita con un botanico russo, B.A. Krukoff, curatore della sezione amazzonica del New York Botanical Garden. A lui, sulla scia di R.E. Schultes, il padre dell'etnobotanica per le ricerche sulle fonti del curaro in Amazzonia, si deve la sistematizzazione delle varie centinaia di *Strychnos* sudamericane [25] accoppiando sinonimi malgrado la difficile identificazione di campioni sterili d'erbario senza frutti e semi, costituiti spesso solo da foglie la cui forma varia molto con l'età.

L'isolamento degli alcaloidi – in quanto sostanze basiche – sarà molto facilitato all'Istituto Superiore di Sanità dalla utilizzazione di un apparecchio di Craig (successivamente di due) per ripartizione in controcorrente a gradiente utilizzando la tecnica di discontinua decrescita del pH di una soluzione acquosa contro una fase stazionaria organica, procedimento analogo alla cromatografia a fase inversa e a gradiente ma senza adsorbente. Di essa e dei risultati conseguiti Marini Bettolo darà in seguito ampia documentazione al simposio onorario per A.J.P. Martin a Urbino [26]. Così si inizierà isolando dai semi di *Strychnos nux vomica* oltre i 9 alcaloidi noti, 4 nuovi: 3-idrossi- $\alpha$ -colubrina, 3-idrossi- $\beta$ -colubrina [27], isostricnina [28] e 15-idrossi-*stricnina* [29], dopo il lontano isolamento della stricnina all'inizio dell'Ottocento.

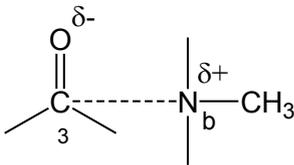
## **NUOVI ALCALOIDI DA STRYCHNOS FORNITE O IDENTIFICATE DA KRUKOFF**

I risultati conseguiti dall'esame fitochimico delle *Strychnos* hanno permesso di fare le seguenti considerazioni di ordine generale in relazione al curaro e suoi alcaloidi attivi.

Come la diabolina (4) è stata considerata il precursore degli alcaloidi dimeri terziari e quaternari (solo questi ultimi curarizzanti)

del Sud America, lo stesso si potrebbe dire della 11-metossidiabolina (8) da noi isolata per la prima volta, potenziale precursore di una nuova serie di curarizzanti metossilati. Essa è presente come unico alcaloide (elemento da sottolineare, 0,2%) nella corteccia di una *Strychnos* brasilina (Itacarè, Bahia), la *S. romeu-belenii* Krukoff e Barneby [30], nella corteccia della radice della *S. medeola* Sagot ex Progel (Parà, Brasile) [31] assieme a un alcaloide  $\beta$ -carbolinico terziario, la *nor*-macusina B, nella corteccia di radici di *S. rubiginosa* A.D.C. (Bahia, Brasile) [32] ancora assieme alla *nor*-macusina B ed un nuovo alcaloide  $\beta$ -carbolinico, la stricnorubigina, nella corteccia di radici di *S. amazonica* Krukoff (Rio Jari, Parà, Brasile) [33] assieme alla macusina B, monomero quaternario, ed infine nella corteccia di liana della *S. brachiata* Ruiz e Pavon (S. Martino, Perù) assieme alla desacetildiabolina (5).

L'assenza invece di alcaloidi quaternari in numerose specie di *Strychnos* sudamericane è da correlare alla funzionalizzazione con ossigeno della posizione 3 dei monomeri (struttura tautomera della *seco* chetoamminica, serie detta *pseudo*, e struttura *seco* cheto-N<sub>b</sub>-metil, detta *N-metil pseudo*. Questo porta alla impossibilità di quaternarizzazione dell'azoto con un



ulteriore metile data l'interazione amidica transanulare tra CO in posizione 3 e N<sub>b</sub> con cessione del doppietto elettronico di quest'ultimo (*vedi accanto*).

Questo vale per tabascanina, acetiltabascanina, 10-metossistricnobrasilina, O-metil-N-acetilstricnosplendina e la nota stricnobrasilina isolate dalla corteccia delle radici di *S. tabascanana* Sprague e Sandwith del Guatemala e Costa Rica [34], per gli alcaloidi della corteccia del fusto di *S. fendleri* Sprague e Sandwith di Roraima, Brasile [35] (stricnofendlerina, 11-metossistricnofendlerina, 12-idrossi-11-metossistricnofendlerina, N<sub>a</sub>-acetilstricnosplendina e 12-idrossi-11-metossi-N<sub>a</sub>-acetilstricnosplendina), per l'alvimina isolata, oltre altri noti, da *Strychnos alvimiana* Krukoff e Barneby dello Stato di Bahia, Brasile [36], ed infine per la 3-idrossidiabolina, (9) isolata insieme alla ormai ben nota diabolina dalla parte superiore del fusto della *S. castelnaeana* Baill. (Rio Solimões, Igarapè, Brasile) [37], ingrediente per il curaro Ticuna. In accordo

con quanto sopra detto la suddetta 3-idrossidiabolina nella forma tautomera chetoamminica ha dato per metilazione con ioduro di metile l'alcaloide corrispondente della serie *seco* cheto-N<sub>b</sub>-metil senza possibilità di successiva ulteriore metilazione.

I nuovi alcaloidi β-carbolinici della corteccia di *S. hirsuta* Spruce ex Bentham (Nord Brasile) [38], stricnoirsutina e tetraidrostricnoirsutina, non avrebbero possibilità di dimerizzazione perché N<sub>a</sub> è impegnato in un anello piridinico.

Infine il rinvenimento per la prima volta in *Strychnos* sudamericana (*S. gardneri* A.D.C., *S. jobertiana* Baillon e *S. parvifolia* A. D.C. [39]) dell'alcaloide akagerina rinvenuto finora solo in *Strychnos* africana (tra queste da noi in *S. spinosa* Lam. e *S. nigritana* Baker) suggerisce, come per la diabolina, il suo coinvolgimento nella biogenesi degli alcaloidi monomeri dell'Africa e monomeri e dimeri dell'America.

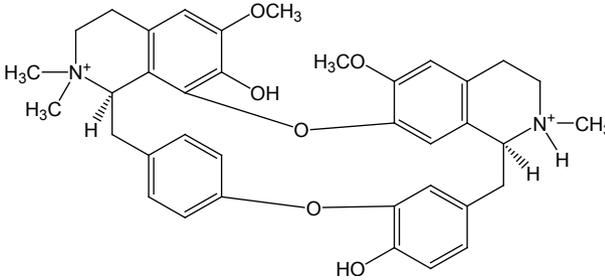
## NUOVI ALCALOIDI BENZILISCHINOLINICI DA MENISPERMACEAE E ANNONACEE

Interessanti in relazione al rapporto con la *d*-tubocurarina (**1**) furono i risultati conseguiti da Marini Bettolo in questo campo. Nel 1970 a questo primo alcaloide curarizzante isolato nel 1935, al quale era stata attribuita la struttura bisbenzilisochinolinica bisquaternaria, e da tempo largamente impiegato in medicina, fu assegnata la struttura monoquaternaria [40] in base alla RMN ed alla triplicata attività curarizzante osservata dopo metilazione con ioduro di metile.

Dalla *Gutteria megalophylla* Diels [41], una Annonacea dell'Amazonia brasiliana, furono isolati due alcaloidi terziari con la stessa giunzione della *d*-tubocurarina tra le due unità benzilisochinoliche, ma di essa diastereoisomeri, la (*R,R*) 12'-*O*-metilcurina e (*R,R*) *O*, *O*-dimetilcurina, oltre la nota (*R,R*) isochondodendrina. Un analogo alcaloide è la sciadoferina isolata da una Menispermaceae del Perù, la *Sciadotenia toxifera* Krukoff e A. C. Smith [42].

Ma il più importante risultato conseguito in questo campo fu dovuto alla conoscenza di Marini Bettolo non solo con il suddetto Krukoff ma anche con quella gran figura di missionario che fu Padre Luigi Cocco della Missione di Santa Maria de los Guaicas del Rio Ocamo, Alto Orinoco [43]. Dalle punte di frecce (*pei-namô* in lingua

Yanomami) da lui fornite si poté isolare in quantità sufficiente per l'identificazione solo un nuovo alcaloide bisbenzilisochinolinico terziario, la peinamina, ma non l'alcaloide quaternario responsabile dell'attività curarizzante della pianta utilizzata, una ignota Menispermacea



(10) macolina

[44]. Per singolare coincidenza Marini Bettolo ricevette da Krukoff un campione di

legno di una Menispermacea, la *Abuta grisebachii* Triana e Planchon (Prance), della Missione Auaris (Roraima, confine Brasile-Venezuela), pianta chiamata macoli usata per frecce dagli Indi Sanama. Da essa, oltre alla suddetta peinamina, ed in quantità minori 7-O-demetilpeinamina, N-metil-7-O-demetilpeinamina (tutti della serie *S,R*), si isolò [45] un nuovo alcaloide bisbenzilisochinolinico monoquaternario (come si era poi dimostrata essere la *d*-tubocurarina), la macolina (1,5%) (10) accanto al suo alcaloide terziario, la macolidina. Questi due appartengono alla serie (*R,S*), enantiomera della peinamina, ma tutti hanno giunzione testa-coda, coda-testa a differenza della *d*-tubocurarina che ha giunzione testa-coda, testa-coda.

Oggi la macolina potrebbe essere (se non fossero andati dispersi i risultati della sua attività curarizzante) accanto alla *d*-tubocurarina (1) tra gli agenti miorilassanti (M03AB) nella lista della Farmacopea Europea, quella farmacopea di cui Marini Bettolo fu fondatore e primo presidente.

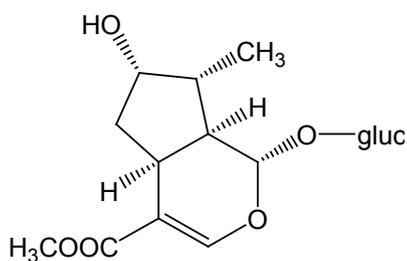
E si deve alla collaborazione con J. Lemli, rappresentante belga nel gruppo di Farmacognosia della stessa Farmacopea Europea, la disponibilità di un curaro del Perù della Università di Lovanio dal quale isolammo, oltre alle ormai note (*R,R*)-curina e (*R,S*)-chondrocurina e *d*-tubocurarina, la (*R,S*)-*nor*-N<sub>b</sub>-chondrocurina [46].

Infine l'esempio emblematico delle frecce da cerbottana degli Yanomami di Roraima acquistate da Marini Bettolo tramite il

Ministerio do Interior, Fundação Nacional do Índio (FUNAI) in Brasile [47] dalle quali si è isolata una sostanza psicotropa derivante forse da piante del genere *Virola* (Myristicaceae), la 5-metossi-*N-N*-dimetiltriptamina (12 mg per freccia). Ci si può chiedere se queste frecce siano un ambito acquisto per certi turisti o un cambiamento culturale per la caccia degli Yanomami dato che la sostanza determina gravi disturbi comportamentali per cui l'animale ferito non muore per paralisi respiratoria, come per il curaro, ma si lascia prendere con le mani.

## NUOVI ALCALOIDI INDOLICI DA LOGANIACEAE E APOCYNACEAE DELL'AFRICA

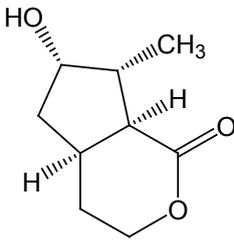
Presso l'Istituto Italo-Africano, del quale era segretario generale l'ambasciatore Luigi Gasbarri (che era stato il responsabile dell'Amministrazione fiduciaria italiana in Somalia) si costituì nel 1979 per iniziativa di Marini Bettolo il primo Centro collaboratore per la medicina tradizionale con l'OMS. Questo portò alla collaborazione con l'Università di Nigeria, Nsukka (Anambra State, ex Biafra), e con l'International Centre of Insect Physiology and Ecology, Nairobi (Kenya), ed alla disponibilità di piante contenenti sempre alcaloidi indolici da *Strychnos* ed Apocynaceae.



(11) loganina

Non alcaloidi indolici dimeri come in alcune specie di *Strychnos* sudamericane ma "pseudodimeri" del tipo dell'usambarano, isolato dalla *Strychnos usambarensis* Gilg. del Rwanda, furono le nigritanine isolate dalle foglie di *S. nigritana* Baker [48] della Nigeria. In esse infatti

la triptamina legata, come era stato dimostrato per incorporazione, con l'iridoide loganina (11) (o anche probabilmente con akagerina isolata dalle radici della stessa pianta e dalle foglie di *S. spinosa* Lam.) forma un alcaloide monomero tipo desacetildiabolina (5)



(12) booneina

che, a sua volta, invece che dimerizzare, si unisce ad un'altra unità triptamina a formare così "pseudodimeri".

Alcaloidi monomeri delle sopramenzionate serie *pseudo* e *N-metil-pseudo* furono isolati, assieme alla ubiquitaria diabolina (4), dalle radici di *S. henningsii* Gilg, del Kenya [49].

Infine correlate alla diabolina sono le varie echitamidine, isolate dalla *Alstonia boonei* De Wild., Apocynacea della

Nigeria, assieme ad uno strano  $\delta$ -lattone monoterpenco, denominato booneina (12) [50], significativo dal punto di vista biogenetico per la stretta somiglianza strutturale con l'anzidetta loganina.

## CONCLUSIONE

Questa nota sull'attività scientifica di Marini Bettolo nel campo del curaro a lui dedicata, come in occasione del suo 75° compleanno fece Bisset nel 1992 con l'articolo sul curaro sul *Journal of Ethnopharmacology* (36, 1), innegabilmente tediosa in alcune parti, vuol motivare sulla base dei risultati della ricerca quella selezione di piante, fatta dagli Indi nelle ridondante flora amazzonica, dotate di azione curarizzante in quanto contenenti alcaloidi dimeri quaternari, indolici o benzilisochinolinici. Ma la ricerca ha anche evidenziato numerose specie di *Strychnos* e di Menispermaceae non utilizzate dagli Indi per il curaro nelle quali gli alcaloidi non avevano entrambi i requisiti anzidetti – dimeri e quaternari – o non avevano più possibilità di acquisirli o contenevano alcaloidi che solo con l'evoluzione avrebbero potuto darne dei nuovi.

L'utilizzazione del curaro, diciamo degli agenti curarizzanti anche di sintesi, in anestesia chirurgica ha richiesto un'accezione più ampia del termine di farmaco che secondo la Direttiva CEE 65/65 oltre quella di diagnosi, prevenzione e terapia è anche di modifica di funzione organica come alcuni contraccettivi.

L'ultima nota scientifica di Marini Bettolo, della cui pubblicazione, seppur sofferente, era molto interessato, uscita nel 1993 sulle *Memorie* dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, porterà il titolo: "Il curaro da veleno a farmaco" [51].

Il Nuovo Mondo ha così dato un contributo alla medicina che si può ben paragonare a quello del *Papaver somniferum* L. per l'antipodo Europa.

Nel 1992 a Genova al Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, essendo Marini Bettolo impossibilitato, l'autore presentò una nota sul contributo delle piante americane alle scienze farmaceutiche [52] in occasione delle celebrazioni colombiane. Parlo di celebrazioni "colombiane" per la scoperta dell'America a 500 anni perché oggi "El objetivo no es impugnar su legado. Tampoco puede ser celebrarlo" [1b].

### Bibliografia

- 1a. Goodman E.J. *The explorers of South America*. Macmillan, New York, 1972;
- 1b. Bonilla H. *Los Conquistados*. Tercer Mundo Editores, 1992.
2. Rerum medicarum Novae Hispaniae Thesaurum. Accademia Nazionale dei Lincei. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, Roma, 1992, copia anastatica,
3. Bovet D., Depierre F., de Lestrangé Y. *Compt. Rend.* (1947) 225, 74.
4. Paton W.D.M., Zaimis E.J. *Brit. J. Pharmacol.* (1949) 4, 381.
5. Bovet D., Bovet-Nitti F. *Sci. Med. Ital.* (1955) 3, 484.
6. Del Castillo J., Katz B. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* (1956) 6, 121.
7. Wieland H., Bahr K., Witkop B. *Ann. Chem.* (1949) 547, 173.
8. Schmid H., Karrer P. *Helv. Chem. Acta* (1947) 30, 1162 e *Angew. Chem.* (1955) 67, 361.
9. Adank K., Bovet D., Ducke A., Marini Bettolo G.B. *Gazz. Chim. Ital.* (1953) 83, 966.
10. Marini Bettolo G.B., Lederer M. *Nature* (London) (1954) 174, 133.
11. Bovet D., Bovet-Nitti F., Marini Bettolo G.B. *Curare and curare-like agents*. Eds. Elsevier, Amsterdam, 1957.
12. Marini Bettolo G.B., Bovet D. *Gazz. Chim. Ital.* (1954) 84, 1141.
13. Marini Bettolo G.B., Bovet D. *Rend. Ist. Super. Sanità* (1956) XIX, 954.
14. Marini Bettolo G.B. *J. Chromatogr.* (1958) 1, 182 e 411.
15. Casinovi C.G., Marini Bettolo G.B., Bisset N.G. *Nature* (London) (1962) 193, 1178.
16. Marini Bettolo G.B., Ciasca M.A., Galeffi C., Bisset N.G., Krukoff B.A. *Phytochemistry* (1972) 11, 381.
17. Biocca E. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti Lincei* (1947) [8] 2, 689.

18. Marini Bettolo G.B., Biocca E., Galeffi C., delle Monache F., Montalvo E.G. *Ann. Ist. Super. Sanità* (1965) 1, 784.
19. Biocca E. *Viaggi tra gli Indi. III*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, 1967.
20. Barker J. Memoria sobre la cultura de los Guaicas. *Boll. Indig. Venezolano* (1953) 1, 433.
21. Biocca E., Bovet D., Galeffi C., Marini Bettolo G.B. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti Lincei* 1965 [8] 38, 34.
22. Lazzarini-Peckolt O. The formation of the curarizing factors of curare. *Rev. Soc. Brasil. Quim.* (1950) 19, 109.
23. Bauer W.P. *Tribus* (1971) 20, 125.
24. Marini Bettolo G.B., Galeffi C., Carpi A. *Ann. Ist. Super. Sanità* (1967) 3, 378.
25. Krukoff B.A., Marini Bettolo G.B., Bisset N.G. *Lloydia* (1972) 35, 193.
26. Marini Bettolo G.B., Galeffi C. Discontinuous systems in the counter-current distribution. *J. Chromatogr. Library* (1985) 32, 283.
27. Marini Bettolo G.B., Miranda delle Monache E., Galeffi C., Ciasca Rendina M.A., Villar del Fresno A. *Ann. Chim.* (Rome) (1970) 60, 444.
28. Galeffi C., Miranda delle Monache E., Marini Bettolo G.B. *J. Chromatogr.* (1974) 88, 416.
29. Galeffi C., Nicoletti M., Messina I., Marini Bettolo G.B. *Tetrahedron*.(1979) 5, 2545.
30. Marini Bettolo G.B., Miranda delle Monache E., Erazo Giuffra S., Galeffi C. *Gazz. Chim. Ital.* (1971) 101, 971.
31. Marini Bettolo G.B., Erazo Giuffra S., Galeffi C., Miranda delle Monache E. *Gazz. Chim. Ital.* (1973) 103, 591.
32. Marini Bettolo G.B., Galeffi C., Nicoletti M., Messina I. *Phytochemistry* (1980) 19, 992.
33. Galeffi C., Miranda delle Monache E., Marini-Bettolo G.B. *Ann. Chim.* (Rome) (1973) 63, 849.
34. Galeffi C., Ciasca Rendina M., Miranda delle Monache E., Marini Bettolo G.B. *Farmaco, ed. sci.* (1971) 26, 1100.
35. Galeffi C., Marini Bettolo G.B. *Gazz. Chim. Ital.* (1980) 110, 81.
36. Marini Bettolo G.B., Messina I., Nicoletti M., Patamia M., Galeffi C. *An. Ass. Quim. Argent.* (1982) 70, 263.
37. Galeffi C., Patamia M., Nicoletti M., Messina I., Marini Bettolo G.B. *Phytochemistry* (1982) 21, 2393.
38. Galeffi C., Marini Bettolo G.B. *Tetrahedron* (1981) 37, 3167.
39. Marini Bettolo G.B., Messina I., Nicoletti M., Patamia M., Galeffi, C. *J. Nat. Prod.* (1980) 43, 717.

40. Everett A.J., Lowe L.A., Wilkinson S. *Chem. Commun.* (1970) 1020.
41. Galeffi C., Marini Bettolo G.B., Vecchi D. *Gazz. Chim. Ital.* (1975) 105, 1207.
42. Galeffi C., La Bua R., Messina I., Zapata Alcazar R., Marini Bettolo G.B. *Gazz. Chim. Ital.* (1978) 108, 97.
43. Cocco L. Parima. *LAS Roma*, (1976) 178.
44. Galeffi C., Scarpetti P., Marini Bettolo G.B. *Farmaco, ed. sci.* (1977) 32, 665.
45. Galeffi C., Scarpetti P., Marini Bettolo G.B. *Farmaco, ed. sci.* (1977) 32, 853.
46. Lemli J., Galeffi C., Messina I., Nicoletti M., Marini Bettolo G.B. *Planta Med.* (1985) 68.
47. Galeffi C., Messina I., Marini Bettolo G.B. *J. Nat. Prod.* (1983) 46, 586.
48. Oguakwa J.U., Nicoletti M., Messina I., Galeffi C., Marini Bettolo G.B. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti Lincei* (1978) [8] 65, 299.
49. Chapya W.A., Galeffi C., Sperandei M., Msonthy J.D., Nicoletti M., Messina I., Marini Bettolo G.B. *Gazz. Chim. Ital.* (1983) 113, 773.
50. Marini Bettolo G.B., Nicoletti M., Messina I., Patamia M., Galeffi C., Oguakwa J.U., Portalone G., Vaciago A. *Tetrahedron* (1983) 39, 323.
51. Galeffi C., Marini Bettolo G.B. *Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL. Memorie* (1993) 75.
52. Galeffi C. *Farmaco* (1993) 48, 1175.