



Unione Europea



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
VIII ciclo

Studio di metaboliti secondari provenienti da specie vegetali che agiscono sul SNC

Dottorando	Antonio Bracci
Tutor	Ch.mo Prof. Vincenzo De Feo
Coordinatore	Ch.mo Prof. Antonietta Leone

ABSTRACT italiano	pag 1
ABSTRACT	pag 5
INTRODUZIONE	pag 7
SCOPO DELLA TESI	pag 13
Capitolo 1 - La dipendenza	
Il concetto di dipendenza	pag 15
La dipendenza e la tolleranza da Morfina	pag 15
Dipendenza da ansiolitici e Ipnotici	pag 19
Dipendenza da cannabis	pag 21
Dipendenza da cocaina	pag 23
Dipendenza da anfetamina	pag 25
Dipendenza da allucinogeni	pag 26
Capitolo 2	
Piante attive sul Sistema Nervoso Centrale	pag 29
Capitolo 3	
<i>Esposita lanata Britt. & Rose</i>	pag 31
Botanica	pag 31
Usi tradizionali	pag 31
Studi precedenti	pag 32
Risultati	pag 33
Discussione	pag 38

Capitolo 4

<i>Brugmansia arborea</i> Lagher.	pag 40
Botanica	pag 41
Usi tradizionali	pag 41
Studi precedenti	pag 41
Risultati	pag 51
Discussione	pag 82

Capitolo 5

<i>Ipomea violacea</i>	pag 83
Botanica	pag 84
Usi tradizionali	pag 85
Studi precedenti	pag 86
Risultati	pag 88
Discussione	pag 89

Capitolo 7	
Materiali e metodi	pag 91
<i>Esposita lanata</i>	pag 91
<i>Brugmansia arborea</i>	pag 92
<i>Ipomea violacea</i>	pag
99Analisi statistica	pag 99
BIBLIOGRAFIA	pag 103

L'utilizzo delle piante medicinali nasce con l'uomo. Lo studio delle basi scientifiche a supporto del loro utilizzo si è sviluppato e continua a svilupparsi da poco più di un secolo. Lo scopo di questo lavoro di dottorato è di dare supporto all'utilizzo di specie vegetali applicabili in ambito farmacologico per curare determinate affezioni del Sistema Nervoso Centrale derivanti da patologie o dall'uso di sostanze stupefacenti. Molto spesso le sostanze vegetali infatti interagiscono con il sistema nervoso centrale, come accade per gli oppiacei, la coca, la nicotina ed altre specie. I metaboliti secondari provenienti da tre diverse specie di uso non comune (*Brugmansia arborea*, *Espostoa lanata* ed *Ipomea violacea*) sono stati sottoposti ad un attento studio per valutarne l'attività sul Sistema nervoso centrale e cercare di comprendere quale possa essere il loro utilizzo a scopo medico. Queste tre specie vengono utilizzate normalmente nella medicina tradizionale dell'America del Sud, nella maggior parte dei casi con uno scopo rituale. La società attuale ha trasformato queste specie in *Smart Drugs* togliendo loro il concetto di sacralità attribuitogli per millenni dai primi utilizzatori

Brugmansia arborea Lagher. è normalmente consumata sotto forma di infuse e tisane per la costituzione delle "misha" bevande con attività magico-curativa. Già dagli studi precedenti era stato possibile identificare tre alcaloidi presenti nelle specie e la loro attività è stata testata in vitro per verificare la capacità di tali alcaloidi di interagire con recettori per la dopamina e serotonina. Lo studio condotto in questo lavoro si è invece basato sullo studio dei metaboliti secondari provenienti da specie naturalizzate in Italia per comprendere se fossero prodotti gli stessi alcaloidi, in quale quantità e se le diverse condizioni climatiche e territoriali avessero influenzato la loro produzione. Il processo di screening iniziale ha consentito di determinare che la frazione di interesse contenente alcaloidi fosse quella dell'estratto metabolico. Tale estratto è stato saggiato in topi CD1 per verificare la capacità

di agire in combinazione con morfina e constatarne gli effetti in trattamenti sia in acuto che in cronico. Lo studio ha dimostrato la capacità di ridurre gli effetti derivanti dalla sindrome di astinenza da oppiacei, dimostrandosi come un'ottima alternativa al naloxone rispetto al quale riduce i sintomi somatici di astinenza. Lo stesso studio è stato ripetuto sulla frazione purificata e sui singoli principi attivi. I composti puri hanno però dimostrato una minore efficacia rispetto al complesso. Per dimostrare che l'attività della pianta è strettamente legata ai composti di natura alcaloidea sono stati effettuati inoltre studi *in vivo* sulle frazioni metanoliche non contenenti gli alcaloidi. Si è dunque dimostrata l'inattività biologica di tali composti di natura non alcaloidea. Per verificare quali effetti avessero gli alcaloidi utilizzati nelle aree cerebrali connesse al sistema dopaminergico della ricompensa coinvolti nella dipendenza da oppiacei, sono state prelevate la corteccia frontale e lo striato. Tutti gli esperimenti sono stati svolti su topi CD1. I risultati hanno dimostrato che i singoli alcaloidi hanno effetti dopaminergici differenti. Il primo di essi è in grado di riportare i valori di dopamina al livello del controllo spiegando almeno in parte l'assenza di una crisi di astinenza altrimenti presente. L'effetto degli altri alcaloidi, che determinano invece un interessante picco di dopamina aprono nuove prospettive di studio per lo sviluppo in ambito medico per la cura di sindromi da ipoprodotto di dopamina come ad esempio il Parkinson. *B. arborea* ha inoltre mostrato una capacità di ridurre in maniera dose dipendente l'iperattività motoria. Gli studi di CPL (preferenza di luogo associata alla somministrazione di una sostanza che induce dipendenza) hanno inoltre dimostrato che gli estratti della pianta sono in grado di ridurre la preferenza degli animali utilizzati (topi cd1), per le gabbie in cui vengono trattati con morfina, e che l'associazione tra trattamento e luogo si estingue molto più rapidamente negli animali trattati anche con *B. arborea* rispetto a quelli trattati con sola morfina. I risultati della somministrazione di *B. arborea* un'ora prima del trattamento con cocaina hanno dimostrato la capacità di ridurre

l'iperattività da cocaina stessa. Si ipotizza dunque l'utilizzo di tale specie, e più precisamente del complesso alcaloideo presente in fiori e foglie, per ridurre le sindromi di astinenza da morfina e favorire il divezzamento da oppiacei.

Espostoa lanata Britt. & Rose è utilizzata a scopo magico dagli sciamani per entrare in contatto con il mondo delle anime tramite l'aspirazione dei fumi prodotti dalla sua combustione. Dalla pianta sono stati isolati alcaloidi di natura feniletilamminica. I test bioassay oriented sono stati effettuati in activity cage sugli estratti a polarità crescente (etere di normale sano, etere di petrolio, cloroformio, cloroformio metanolo 9:1, metanolo). L'estratto risultato attivo è stato quello metanologico. Il frazionamento cromatografico dell'estratto attivo ha portato all'identificazione della tiramina. La presenza di tiramina nella frazione con maggiore attività in activity cage ha dimostrato una capacità di abbattere la capacità locomotoria del 60% rispetto ai controlli con salino ed in modo dose dipendente. La tiramina tal quale non dovrebbe essere in grado di attraversare la barriera ematoencefalica in quantità tale da giustificare la riduzione della coordinazione motoria e le convulsioni tonico cloniche registrate. Questo effetto è stato invece attribuito alla sua coniugazione ad una catena lipidica che ne consente un più agevole trasporto attraverso la BBB (barriera emato encefalica). La tiramina in quanto simpatico-mimetico stimola il rilascio di noradrenalina. La presenza ampiamente discussa in letteratura di recettori specifici (TA1) fa presupporre la sua capacità di funzionare come neurotrasmettitore e di mediatore nell'attivazione della vasocostrizione renale.

L'ultima specie presa in esame è stata *Ipomea violacea* L., originaria della flora del sud America ma ampiamente diffusa in tutta Europa. La larga diffusione di questa specie negli *smart shop* e le scarse informazioni presenti in letteratura sulla sua composizione chimica hanno determinato il forte interesse per lo studio di questa specie. Da letteratura risultano presenti nella

pianta l'isoergina, che presenta un'attività molto inferiore al suo epimero, la cianoclavina, il lisergolo e l'ergometrina. La caratterizzazione chimica dei composti presenti nella specie da noi studiata ha dimostrato la presenza di swainsonina e lisergolo. L'LSA (Acido lisergico) presente in questa specie dunque causa effetti analoghi all'LSD seppure con effetti notevolmente ridotti. Il test dell'head twich non ha dato esito positivo, dimostrando la sua non attività sui recettori serotoninergici coinvolti nell'head twich 5 THP. Sono state inoltre studiate l'attività motoria, che risulta dose dipendente e la capacità di interazione sociale dei topi CD1 utilizzati per tutti i test.

The use of medicinal plants was established with the man. The study of the scientific basis to support their use has grown and continues to grow by little more than a century. The aim of this PhD thesis is to support the use of plant species within the applicable drug to treat certain diseases of the central nervous system caused by a disease or the use of abuse drugs. Very often, the vegetable matter in fact interact with the central nervous system, as is the case for opiates, cocaine, nicotine and other species. The secondary metabolites from three species (*Brugmansia arborea*, *Espositoa lanata* and *Ipomoea violacea*) were subjected to a study to assess their activity on the Central Nervous System, and try to discover their medical uses. These three species are typically used in traditional medicine of South America, in most cases with a ritual purpose. Today's society has turned these and other species in smart drugs, removing the concept of sacredness allocated for thousands of early users.

Brugmansia arborea Lagher. normally consumed in the form of infusion or decoction to obtain "*Misha*" drinks with magical healing properties. Previous studies identified three alkaloids in the species collected in South America. These compounds showed to interact with receptors for dopamine and serotonin. Our study is instead based on the chemical study of secondary metabolites from species collected in Italy, with the aim to verify if the alkaloids are qualitatively and quantitatively similar. The initial screening process has allowed to determine the fraction of interest was that the extract contains alkaloids metabolism. This extract has been tested on CD1 mice to verify its ability to interact in combination with morphine and to observe the effects both in acute and chronic treatment. The study has demonstrated the ability to reduce the effects of the opiate withdrawal syndrome, suggesting an alternative to naloxona. The same study was repeated on the purified fraction, reaching to the identification of individual alkaloids. However, the pure

compounds seem less active than the crude fraction. To study the possible mechanisms of action of these brain areas of treated animals (CD1 mouse) related to the dopaminergic system involved in opiate dependence, were taken from the frontal cortex and striatum. The results showed that individual alkaloids have different effects on dopamine. The first of them is able to enhance the values of dopamine at the level of control at least partly explaining the absence of withdrawal symptoms otherwise present. The effect of alkaloids active on dopamine system open new perspectives for the development of drugs for the treatment of syndromes underproduction of dopamine such as Parkinson's. *Brugmansia arborea* extracts were also tested for their ability to influence the motor hyperactivity generated and demonstrated an ability to reduce morphine in a dose-dependent manner. CPL (place preference) studies have also shown the ability of these extracts to reduce the preference of animals used (CD1 mice), in cages where they are treated with morphine, and that the association between treatment and the place is extinguished much more rapidly in animals treated with *B. arborea* compared to those treated with morphine alone. The results of administration of extracts one hour before treatment with cocaine demonstrated the ability to reduce hyperactivity to cocaine itself. It is assumed therefore the use of this species, namely the complex alkaloids in flowers and leaves, to reduce morphine withdrawal syndromes and facilitate weaning from opioids.

Espostoa lanata Britt. & Rose is used by shamans to do magic to get in touch with the world of souls through the aspiration of the fumes produced from burning it. From this species phenethylamine alkaloid has been isolated. Bioassays were carried out in an oriented cage activity, evaluating the biological activity of extracts of increasing polarity (petrol, chloroform, chloroform and methanol 9:1, methanol). The latter extract was found to be

active. It was further purified by chromatographic methods, and tyramine was isolated. The active fraction demonstrated an inhibition of locomotor activity by 60% compared to controls with saline and a dose dependent manner. Tyramine seems unable to cross the blood-brain barrier in amounts capable to reduce motor coordination and induce tonic clonic seizures recorded. This effect is probably to be attributed to its conjugation to a lipid chain, which allows easier transport across the BBB. Tyramine as sympathetic mimetic stimulates the release of norepinephrine. Literature data report the presence of specific receptors (TA1) that can help to explain the function of tyramine as a neurotransmitter and a mediator in the activation of renal vasoconstriction. *Ipomoea violacea* L. is a species belonging to the flora of South America, but widely diffused in Europe. The prevalence of this species in the smart shops and the limited information in the literature on its chemical composition and pharmacological effects was at the basis of its study. The available literature report the presence of isoergine its epimer chanoclavine, lysergol and ergometrine. In our sample we found the presence of swainsonine and lysergol. LSA (Lysergic acid) cause similar effects to LSD although with minor potency. The test of head twitches did not give satisfactory results, proving its not work on serotonin receptors involved in 'head twitches' 5 THP. Motor activity is dose dependent. CD1 mice are used for all test .

*« If the doors of perception were cleansed,
everything would appear to man as it truly is,
infinite. »*

W. Blake

Piante psicoattive ed evoluzione umana

"L'impatto degli allucinogeni nella dieta è stato più che psicologico; le piante allucinogene possono aver catalizzato in noi più o meno tutto quello che ci distingue dagli altri primati superiori, ed essere quindi responsabili di tutte le funzioni mentali che noi associamo al concetto di umanità" [T. McKenna]

L'uso delle sostanze psicoattive nasce come "*bisogno primario*" dell'uomo, come osservato dallo psicofarmacologo Ronald Siegel. Le droghe vengono da lui interpretate come "*agenti adattogeni*", che aiutano gli individui a far fronte ad una serie di esigenze esistenziali.

McKenna, illustre etnobotanico, sostiene che le sostanze psicoattive sarebbero state il motore dell'evoluzione cerebrale dei primati che hanno conferito una capacità superiore ad alcuni di essi distinguendoli dagli animali. Gli studi archeologici hanno dimostrato che *Homo habilis* ha avuto rispetto ai suoi predecessori una improvvisa crescita del volume cerebrale non in accordo i normali processi evolutivi, da cui, sembra essersi generato, in seguito al successivo aumento del volume cerebrale, *Homo erectus*. Attualmente i dati scientifici in nostro possesso non sembrano fornire una spiegazione plausibile a questo fenomeno. L'ipotesi di McKenna è molto semplice. Infatti essa si basa sul concetto dell'alimentazione degli individui. Secondo McKenna i primi primati che si allontanarono dagli alberi in cerca di cibo si trovarono ad affrontare un mondo molto più variegato dal punto di vista alimentare e tra queste incontrarono alcune specie, che oggi definiamo psicoattive, in grado di

generare uno stato alterato di coscienza. Per McKenna furono proprio quegli stimoli, dovuti alle sostanze psichedeliche, a catalizzare le capacità cerebrali degli ominidi, nel corso dei millenni fino a generare le capacità cerebrali che attualmente si riscontrano nell'uomo. Secondo questa teoria l'utilizzo di queste specie vegetali non avrebbe un uso così semplicemente voluttuario, in seguito giustificato dall'introduzione di rituali religiosi, ma sarebbero concausa dello sviluppo cerebrale dell'uomo così come oggi lo conosciamo (*Food of the Gods: The Search for the Original Tree of Knowledge – A Radical History of Plants, Drugs, and Human Evolution*). McKenna ha individuato in *Psilocybe cubensis*, un fungo psicoattivo ampiamente diffuso in America meridionale ed in Asia,. Tra l'altro McKenna attribuisce agli stimoli indotti da queste piante la generazione, o quanto meno la stimolazione delle aree cerebrali volte al linguaggio e alla comunicazione. Questa teoria combacia con i luoghi in cui si presuppone abbia avuto origine il distacco dell'uomo dal primate, cioè nella savana africana dove crescono numerose specie di funghi con proprietà allucinogene. Da ciò scaturì quella che McKenna chiama l'età degli emeogeni, ovvero "l'età della condivisione", nella quale l'uomo primitivo, cacciatore e raccoglitore, consumava costantemente funghi psicoattivi, e caratterizzata dall'assenza di gerarchie ben definite, da una sessualità di tipo orgiastico e dal culto della grande dea madre. Secondo McKenna, una volta che la società è stata adeguatamente strutturata e che per concausae di tipo climatico non è più possibile il consumo generalizzato di funghi allucinogeni per tutti gli individui presenti nelle società costituite, sorge la necessità di costituire una casta privilegiata che continui a fare uso di queste sostanze. Di qui avrebbe origine la figura dello sciamano. Lo sciamano, inteso come il legame tra uomo e divinità, vive in uno stato di *trance*, ed è colui che sa guidare con consapevolezza e perizia fino alla fioritura di tutte quelle capacità insite in ognuno di noi, ma che normalmente rimangono sopite. In "Le porte della percezione" di Aldous Huxley, si espone una teoria piuttosto avvincente secondo cui il cervello sarebbe un filtro che limita le capacità percettive della coscienza. Secondo Huxley la maggior parte degli uomini per incrementare le proprie possibilità percettive deve indurre uno stato di alterazione mentale, alterando il proprio equilibrio fisiologico. Alcuni individui riuscirebbero a determinare questo stato di lieve inattività di

controllo da parte del cervello attraverso la danza, lo sport, ed altre attività fisiche o di meditazione che riescono a distaccare la mente dal corpo. In merito all'utilizzo della mescalina egli sostiene che, siccome quest'ultima interferisce sul sistema nervoso centrale causando una alterazione al livello enzimatico, alterando così la capacità discriminativa del cervello, si induce una ridotta efficienza del cervello stesso come strumento di controllo. L'inefficienza biologica del cervello, dunque, permetterebbe l'ingresso nella coscienza di alcune categorie di avvenimenti mentali il cui accesso normalmente sono repressi in quanto non necessari alla sopravvivenza. Il processo della conoscenza dunque avverrebbe grazie a queste sostanze stupefacenti in quanto la dis-regolazione dei neurotrasmettitori consentirebbe un flusso di informazioni interne all'organismo e provenienti dall'esterno che normalmente vengono filtrate.

Dunque le sostanze che alterano la coscienza consentirebbero l'acquisizione di informazioni su più piani contemporaneamente. La connessione tra le piante attive sul Sistema Nervoso Centrale ed il loro utilizzo a scopo rituale prima che voluttuario, è sempre stato fortemente presente in tutte le culture arcaiche. Questa connessione che si è andata trasformando in uso medico nella medicina europea dei popoli soggetti alla industrializzazione, è rimasta invece fortemente tangibile nei popoli ancora in via di sviluppo. Per questo motivo ci risulta molto più facile seguirne le tracce e, a causa della scarsa conoscenza dei componenti chimici alla base di tale attività, tali specie sono particolarmente interessanti. Sono innumerevoli le testimonianze di piante ad uso rituale nelle culture apotropiche (culture in cui ad un oggetto o una persona viene attribuita la capacità di allontanare il male). Alcune tribù di Indiani d'America delle pianure utilizzavano durante i riti iniziatici i semi psicoattivi della pianta del *mescal* (*Sophora secundiflora*, famiglia delle Leguminosae). Il nome "mescal" non riguarda il cactus del peyote, bensì esclusivamente la pianta della *Sophora secundiflora*. Un vecchio errore di identificazione fece sì che il principale alcaloide psicoattivo del peyote venisse chiamato "mescalina". Il "Mescalismo" è un culto religioso degli Indiani delle pianure basato sull'uso del seme di *Sophora*. Peter Furst (1986) afferma che il culto del mescal ha una storia di almeno 10.000 anni, a partire cioè dal periodo dei cacciatori paleo-indiani della fine del Pleistocene. Scavi archeologici

hanno riportato alla luce semi di mescal in almeno 12 siti di pitture preistoriche, datati con il metodo del C¹⁴ ad oltre l'8000 a.C. [Adovasio, 1976]. E' stato ipotizzato che fra le tribù di indiani d'America il culto del seme di mescal sia stato gradualmente sostituito da quello del peyote (Howard, 1957; ma per una critica a questa teoria si vedano La Barre, 1957 e Troike, 1962. Fra gli oggetti di alcune "borse della medicina" anticamente appartenuti a stregoni di tribù indiane e conservate nei musei americani sono stati identificati semi di mescal [Merrill, 1977]. T.N. Campbell [1958] ha evidenziato un insieme di particolari paralleli fra il rito del mescal e i soggetti rappresentati nelle pitture preistoriche dei ripari sotto roccia del fiume Pecos, nel Texas. Il Mezcal è un distillato di agave, prodotto in Messico, principalmente tra i comuni di Oaxaca, Sola de Vega, Yautepec, Ocotlán, Ejutla e Zimatlán, che formano la zona a Denominazione di Origine 'Mezcal de Oaxaca'. Il nome Mezcal deriva dal termine indigeno Nahuatl 'mexcalmentl' che significa, appunto, agave. Prodotto fin dai tempi degli Aztechi dai quali era considerato afrodisiaco, Il Mezcal è un distillato ancestrale e mitico. La leggenda racconta che la dea Mayatl, Dea del Mezcal, nutriva i suoi sudditi con il Mezcal sgorgante dai suoi quarantamila seni. Un giorno la Dea si trovò estremamente eccitata, una sensazione che non aveva mai provato. La ragione di quest'eccitamento era la nascita nel suo cuore di uno splendido verme, il *gusano*, che piano piano rendeva più sensibile il corpo della Dea. Mayatl per la prima volta s'innamorò di un bellissimo guerriero chiamato Chag, il quale pur temerario e coraggioso rimase sconvolto dalle attenzioni a lui rivolte sino a caderne svenuto. La timidezza di Chag non fece perdere l'illusione alla Dea che al contrario cercò in tutti i modi di ottenere il suo amore. Un giorno Mayatl offrì il suo più bel seno, da cui sgorgava copioso il Mezcal, al guerriero: Chag dopo aver bevuto una gran quantità di Mezcal vinse la sua timidezza e con le lacrime agli occhi disse a Mayatl: "Fammi diventare Dio o diventa tu donna, così finalmente potremo amarci". La leggenda racconta che Mayatl profondamente emozionata prese dal suo cuore un meraviglioso *gusano* e lo offrì a Chag. Dopo averlo mangiato l'uomo si sentì divino, prese tra le sue braccia Mayatl e la amò per sette giorni e sette notti. Altro esempio di specie attiva sul Sistema Nervoso Centrale di cui solo da poco sono stati dimostrati gli effetti è *Boswellia sacra*. Questa specie viene utilizzata da

millenni per la produzione degli incensi utilizzati durante le cerimonie religiose. La specie originaria dell'India veniva utilizzata ampiamente durante i rituali religiosi, fino ai giorni nostri. Secondo gli studi recenti pubblicati negli ultimi giorni, effettuati presso il Department of Plant Sciences, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, la specie contiene degli acidi definiti come boswelici che sono attivi sui recettori Trpv3 presenti nel cervello dei mammiferi [Moussaieff et al.,2008] . Questa attività centrale giustifica il suo utilizzo a scopo rituale protratto nei millenni così come spiega lo stato alterato di coscienza che aiuta la fase di aggregazione sociale che si crea durante le cerimonie religiose.

Il lavoro di quattro anni di tesi sperimentale si propone di studiare specie vegetali provenienti da usi tradizionali poco conosciuti che possano avere una applicazione in ambito farmacologico. Dal punto di vista meramente fitochimico, l'obiettivo è la caratterizzazione chimica, per comprendere se le specie vegetali prese in esame contengano metaboliti secondari nuovi oltre quelli già citati in letteratura e determinare la struttura chimica dei metaboliti eventualmente sconosciuti. In questa ottica è previsto inoltre lo studio di questi metaboliti per comprendere la loro attività in ambito biologico. Le specie prese in analisi sono al giorno d'oggi utilizzate come *smart drugs*. Dunque la necessità è anche quella di rendersi conto dei danni possibili sul Sistema Nervoso Centrale e di comprendere oltre al loro funzionamento anche i meccanismi biologici coinvolti. D'altro canto sono sorte problematiche ben più complesse relative alla possibilità di utilizzare i metaboliti isolati a scopo curativo per i processi di desuefazione da oppiacei e cocaina, studiando non solo gli effetti di interazione in trattamenti in acuto ed in cronico ma anche le variazioni comportate nelle amine biogene, nelle variazioni comportamentali indotte e nelle interazioni sociali con altri individui.

Il concetto di dipendenza

La dipendenza viene definita come la necessità di un individuo di avere a sua disposizione un determinato oggetto, persona, o nel caso di cui noi ci occupiamo, una sostanza stupefacente. Nell'inglese scientifico, mentre con la parola *dependence* indichiamo le forme di dipendenza totalmente "benigne" e quindi non patologiche, con la parola *addiction* indichiamo le forme di dipendenza chiaramente "malate", cioè una dipendenza che è una vera e propria schiavitù. Infatti se consideriamo il consumo di prodotti non nocivi in piccole dosi, quale ad esempio il caffè quotidiano, questi non può che essere considerato che come una dipendenza benigna. Ben differente è dunque il caso dell'*addiction* in cui un individuo risulta dipendente da un qualcosa la cui assenza provoca un forte malessere fisico e psicologico. In alcuni casi, quando il bisogno fisico supera le capacità cognitive, l'assunzione avviene senza averne alcun controllo, senza poterne ridurre le quantità e senza poter fermare l'assunzione anche quando è visibile che questa sostanza comincia a creare danni. Negli ultimi anni c'è stato un grande sviluppo dal punto di vista medico e sono stati chiariti i meccanismi chimici e biologici alla base di questo processo. Si è inoltre compreso che esiste una stretta correlazione tra il consumo di una sostanza che induce dipendenza grave ed il concetto della gratificazione.

La dipendenza e la tolleranza da morfina

La dipendenza fisica induce all'uso continuativo dello stesso oppiaceo o di una sostanza simile per prevenire l'astinenza. La mancata somministrazione del farmaco o la somministrazione di un farmaco antagonista porta alla comparsa di una caratteristica sindrome da astinenza.

La tolleranza e la dipendenza fisica dagli oppiacei (naturali o di sintesi) si sviluppano rapidamente. I sintomi della fase di astinenza da oppiacei, sono visibili in maniera acuta nelle prime 72 ore. Dopo queste prime ore critiche i sintomi regrediscono in circa 15 giorni, anche se alcuni di essi si protraggono per anche due o tre mesi. La fase di astinenza è distinguibile in quattro fasi. La prima fase si verifica dopo poche ore dall'ultima somministrazione, normalmente entro le 6-8

ore. In questo primo momento l'individuo va in conto a respiro accelerato, sudorazione, secrezione nasale copiosa, sbadigli, sonno agitato, irrequietezza. Nelle ore successive si ha un forte incremento dei sintomi cui si aggiungono, aumento della temperatura corporea, innalzamento della pressione arteriosa, aumento del battito cardiaco, aumento del numero di inspirazioni, nausea, vomito e diarrea. Le ultime due ore sono quelle in cui i sintomi diventano molto intensi e sono quelli che determinano molto spesso la ricaduta del soggetto. Infatti in questa fase si hanno brividi, contrazioni muscolari, crampi diffusi e dolori alle ossa. Questo processo diviene mortale nei neonati da madri tossicodipendenti.

Sintomi e segni

L'**intossicazione acuta (overdose)** da oppiacei induce nel soggetto prurito, euforia, rossore, miosi, sonnolenza, diminuzione della frequenza e dell'ampiezza del respiro, ipotensione, bradicardia, diminuzione della temperatura corporea.

Complicanze

Tralasciando le complicanze che derivano dalla carenza di igiene nei soggetti utilizzatori, ne esistono altre legate alle proprietà della droga. I principali problemi sono visibili a livello polmonare, cui seguono le epatiti, dolori artritici, deficienza immunologica e disturbi neurologici.

Polmonari: l'indebolimento del tessuto polmonare rende il soggetto più suscettibile a polmoniti dovute ad agenti patogeni. Sono frequenti i casi di fibrosi e di ascessi. La somministrazione per via venosa di farmaci predestinati ad uso orale può determinare la fibrosi. L'abuso cronico di eroina porta a una diminuzione della capacità vitale e a una diminuzione da lieve a moderata della capacità di diffusione. In caso di somministrazione in acuto sono frequenti i casi di edema polmonare. Spesso i danni vengono enfatizzati dal consumo di tabacco.

Epatiche: può insorgere un'epatite virale di tipo A, B e C.

Muscolo-scheletriche: molto frequente è l'osteomielite causata da infezioni ematogene derivanti dall'uso di siringhe non sterili. Possono aversi spondiliti e sacroileiti infettive. Nella miosite ossificante (gomito del tossicodipendente), il

muscolo brachiale è danneggiato da un uso maldestro dell'ago, seguito da sostituzione della massa muscolare con una massa calcificata (metaplasia extraossea).

Immunologiche: in oltre il 90% dei tossicodipendenti si verifica un'ipergammaglobulinemia sia per le IgG che per le IgM. La ragione di tali alterazioni immunologiche è sconosciuta, ma essa può essere il riflesso di una stimolazione antigenica continua da parte delle infezioni o delle iniezioni parenterali quotidiane di sostanze estranee. Con il mantenimento a base di metadone, l'ipergammaglobulinemia si riduce.

Neurologiche: negli eroinomani, la maggior parte dei disturbi neurologici sono causate da fattori non infettivi quali coma e anossia cerebrale. Può manifestarsi un'ambliopia (dovuta presumibilmente alla contaminazione dell'eroina con chinino), una mielite trasversa e un certo numero di mono- e polineuropatie, così come una sindrome di Guillain-Barré. Le complicanze cerebrali includono quelle secondarie a endocardite batterica (meningite batterica, aneurisma micotico, ascesso cerebrale, ascessi subdurali ed epidurali), quelle dovute a epatite virale o tetano e la malaria cerebrale acuta da *Plasmodium falciparum*. Alcune complicanze neurologiche possono essere dovute a risposte allergiche alle sostanze da taglio dell'eroina.

Terapia

Il trattamento clinico dei tossicodipendenti da oppiacei è molto difficoltoso. Per usare in maniera legale un farmaco di tipo oppiaceo nel trattamento di un tossicodipendente, il medico deve stabilire l'esistenza di una dipendenza fisica da oppiacei. La dipendenza fisica è suggerita da un'anamnesi di tre o più iniezioni di narcotico al giorno, dalla presenza di segni da ago recenti, dall'osservazione dei segni e sintomi dell'astinenza o dalla presenza di morfina in un campione urinario. L'eroina è metabolizzata in morfina, coniugata con acido glucuronico ed escreta.

Trattamento di un'overdose: l'antagonista degli oppiacei naloxone è il farmaco di scelta, perché non induce depressione respiratoria. Elimina rapidamente lo stato di incoscienza dovuto a un oppiaceo. Siccome alcuni pazienti diventano agitati, confusi e aggressivi appena escono da uno stato comatoso, può essere necessario

applicare dei mezzi sicuri di contenzione prima della somministrazione dell'antagonista. Tutti i pazienti trattati per un'overdose dovrebbero essere ricoverati e tenuti in osservazione almeno per 24 ore, dato che l'azione del naloxone è relativamente breve e la depressione respiratoria si può ripresentare per diverse ore, soprattutto con il metadone. L'edema polmonare grave, che può causare la morte per ipossia, abitualmente non risponde al naloxone e non è chiara la sua relazione con l'overdose.

Astinenza: la sindrome da astinenza è autolimitante e non è pericolosa per la vita. Il paziente va informato che proverà sintomi sgradevoli, ai quali non sarà consentito di raggiungere livelli intollerabili, e che i farmaci usati per alleviarli saranno somministrati in base ai segni fisici obiettivi di astinenza. Spesso le complicanze nascono dalla combinazione con altri problemi medici. Attualmente la terapia sostitutiva con metadone è il metodo preferito per lo svezzamento dagli oppiacei, in ragione della sua emivita lunga e delle sue proprietà sedative meno marcate. Il metadone viene somministrato per via orale nella quantità minima (in genere, 30 mg/die) sufficiente a prevenire i segni gravi di astinenza, ma eliminando totalmente tutti i segni.. Dosi più alte vanno somministrate soltanto quando si osservano segni fisici di astinenza. Dosi comprese tra 25 e 45 mg possono produrre perdita di coscienza se il soggetto non ha sviluppato tolleranza. Una volta stabilita la dose adeguata, essa va ridotta progressivamente di non più del 20% al giorno. Le manifestazioni acute di astinenza scompaiono di solito entro 7-10 giorni, ma i pazienti lamentano spesso debolezza, insonnia e una grave ansia pervasiva per diversi mesi. La dipendenza da oppiacei lieve è presente nei soggetti che hanno fatto scarso utilizzo degli stessi e può essere trattata riducendo la dose di narcotico gradualmente, sostituendolo con un oppiaceo debole (ad esempio il propossifene napsilato) oppure usando le benzodiazepine a dosi scalari. La clonidina è un adrenergico in grado di bloccare quasi tutti i segni dell'astinenza da oppiacei. Probabilmente riduce la dismissione adrenergica centrale secondaria alla stimolazione dei recettori centrali (lo stesso meccanismo con il quale la clonidina abbassa la PA). Tuttavia la clonidina causa ipotensione e sonnolenza e la sua sospensione può portare rapidamente all'insorgenza di agitazione, insonnia, irritabilità, tachicardia e cefalea. La clonidina può essere utile alla sospensione dell'eroina o del metadone prima dell'inizio di un trattamento orale con naltrexone.

Anche l'agonista-antagonista degli oppiacei buprenorfina è stato usato con successo nella sospensione.

DIPENDENZA DA ANSIOLITICI E IPNOTICI

I farmaci ansiolitici, così come gli ipnotici necessitano di una somministrazione continuativa, la cui interruzione, al di sotto dei livelli critici innesca una sindrome di astinenza. La tolleranza che si innesca è di tipo irregolare ed incompleta, tanto da potersi innescare anche in soggetti che sono consumatori abituali e con sintomi che possono persistere. I disagi che ne conseguono sono di natura comportamentale e indurre psicosi, in relazione al dosaggio e la farmacodinamica del farmaco utilizzato. Struttura chimica e farmacodinamica avvicinano molto questi farmaci al metabolismo dell'etanolo, cui somigliano per la sindrome di astinenza sia per l'induzione alla dipendenza. Nella maggior parte dei casi sono privilegiati farmaci ad azione rapida come il pentobarbitale e derivati.

Sintomi e segni

I segni di un'intossicazione crescente da sedativi sono una diminuzione dei riflessi cutanei superficiali, una lieve diminuzione della vigilanza con nistagmo grossolano o rapido, atassia, eloquio impacciato e instabilità posturale. L'ulteriore progressione causa nistagmo dei movimenti oculari in avanti, sonnolenza, atassia marcata con cadute, confusione, sonno profondo, miosi pupillare, depressione respiratoria e infine la morte. I pazienti che assumono elevate dosi di sedativi spesso hanno difficoltà ideative, lentezza dell'eloquio e della comprensione, perdita di memoria, compromissione del giudizio, diminuzione del tempo di attenzione e labilità emotiva

Effetti da sospensione: la dipendenza psicologica ha un impatto molto elevato soprattutto nei pazienti con una naturale predisposizione. La sospensione dei farmaci induce agitazione, incubi, risvegli frequenti e stati di tensione nelle prime ore della mattina. Il livello di dipendenza fisica è in relazione alla dose e alla durata dell'uso. La sospensione di **barbiturici** assunti in dosi elevate produce una brusca sindrome da astinenza sotto forma di un malessere grave, preoccupante e potenzialmente letale, analogo al delirium tremens. La sindrome di astinenza, che deriva da sospensione dei farmaci, va affrontata in struttura sanitaria in quanto

difficilmente reversibile e con una durata di circa 30 giorni. Talvolta, persino dopo una sospensione gestita adeguatamente nel corso di 1-2 settimane, si verificano delle convulsioni. Entro le prime 12-20 ore successive alla sospensione di un barbiturico a breve durata d'azione, il paziente senza trattamento diventa sempre più irrequieto e presenta tremori e debolezza. In seconda giornata il tremore diventa più evidente, i riflessi tendinei profondi possono accentuarsi e il paziente diventa più debole. Dal secondo al quinto giorno la sindrome da astinenza non trattata si manifesta con delirio, insonnia, confusione, visioni terrorizzanti e allucinazioni uditive. Spesso si hanno ipertensione e disidratazione.

La sospensione delle **benzodiazepine** produce una sindrome di astinenza molto meno grave. La maggior parte dei problemi deriva dal fatto che il farmaco persiste a lungo nell'organismo. Non sono del tutto conosciute le cause della sindrome d'astinenza che forse vede le sue radici più in un fattore psicologico. L'astinenza nella sua forma più grave può manifestarsi nei soggetti che usavano farmaci ad assorbimento rapido e dismissione veloce come ad esempio il lorazepam. Molti soggetti che abusano di benzodiazepine, sono stati o sono forti bevitori, e una sindrome ritardata di astinenza da benzodiazepine può complicare l'astinenza alcolica.

Terapia

La procedura per il trattamento della dipendenza da sedativi, in particolare dai barbiturici, consiste nel somministrare ai pazienti il farmaco in questione e successivamente sospendere il farmaco seguendo un programma rigoroso e monitorando i segni di astinenza. Un grave stato d'ansia o di agitazione può aumentare la tolleranza del paziente. Una volta accertata la dose di tolleranza nelle 24 ore, la stessa dose viene in genere somministrata per 2 o 3 giorni per stabilizzare il paziente, per poi ridurla del 10% al giorno.

I barbiturici ad azione più rapida, altri farmaci sedativo-ipnotici o gli ansiolitici minori possono essere sostituiti da una dose di fenobarbitale equivalente a 1/3 della dose media giornaliera del farmaco da cui il paziente è dipendente (ad esempio per il secobarbitale in dosi di 1000 mg/die, la dose stabilizzante di fenobarbitale è di 300 mg/die o di 75 mg q 6 ore). Il fenobarbitale va somministrato *po* e la dose iniziale va ridotta di 30 mg/die finché il paziente non viene disintossicato. Dal

momento che la dose iniziale giornaliera deve essere stabilita in base alla storia del paziente, esiste un potenziale di errore e il paziente deve essere attentamente osservato per le prime 72 h. Se egli rimane agitato o ansioso la dose deve essere aumentata; se è sonnolento, disartrico o ha nistagmo, la dose va diminuita. Durante la disintossicazione del paziente si devono evitare altri farmaci sedativi o psicotropi. Tuttavia, se il paziente è anche in trattamento con antidepressivi, soprattutto triciclici, tali farmaci non devono essere interrotti bruscamente; la dose va ridotta nel giro di 3-4 giorni.

DIPENDENZA DA CANNABIS

La Cannabis rientra tra le droghe la cui dipendenza non è di tipo fisico, quanto piuttosto di tipo psicologico. Sono rari i casi reali in cui non sia possibile disintossicare i soggetti. La cannabis può essere usata in maniera episodica senza evidenze di disfunzionalità sociale o psicologica. Il concetto di dipendenza non è applicabile in pieno in questo caso, va piuttosto percepito come uno stato di irrequietudine e incapacità al riposo dei parte dei soggetti che ne fanno un uso quotidiano. L'uso della cannabis è diffuso ovunque. Non tutti i consumatori cronici sono tossicomani. L'uso di cannabis costituisce effettivamente un problema di droga, che spesso però viene sottovalutato anche dalla società stessa anche perché la sua importanza tossicologica è incerta. Il numero di consumatori che hanno chiesto un trattamento o una consulenza per essere aiutati a smettere può essere sovrastimato, poiché i soggetti che risultano positivi ai test sul posto di lavoro spesso sono obbligati a richiedere il trattamento e poi vengono seguiti con analisi obbligatorie.

Sintomi e segni

La cannabis produce uno stato di coscienza alterato non del tutto distaccato dalla realtà nel quale le idee appaiono sconnesse, incontrollabili e liberamente fluenti. Il tempo, i colori e le percezioni spaziali possono essere alterati. In genere si produce una sensazione di benessere e rilassamento. Questi effetti durano fino a 2-3 ore

dopo l'assunzione. Non vi sono evidenze convincenti di un effetto prolungato o di postumi. Si manifestano costantemente tachicardia, iperemia congiuntivale e bocca secca. Molti degli effetti psicologici appaiono correlati alla situazione in cui la droga viene assunta. Si sono verificate reazioni di panico, soprattutto nei consumatori alle prime esperienze, ma sono divenute meno frequenti con il crescere dell'accettazione sociale di questa droga. Si manifesta diminuzione delle capacità comunicative e motorie, compromissione della percezione della profondità e dei movimenti oculari di inseguimento dell'oggetto e alterazione del senso del tempo, con possibilità di rischio in certe situazioni. La marijuana può accentuare fino all'esasperazione sintomi di tipo schizofrenico, anche in pazienti trattati con farmaci antipsicotici. Coloro che criticano l'utilizzo di marijuana citano numerosi dati scientifici sui suoi effetti avversi, ma molte delle affermazioni su un suo presunto grave impatto biologico non sono state dimostrate, anche nel caso di consumatori relativamente accaniti e per aree esaminate approfonditamente, come la funzione immunologica e riproduttiva. E' comunque da tenere in conto che molti dei danni all'organismo sono analoghi a quelli provocati dal tabacco. Quindi sono visibili danni a livello polmonare. Ciò è reso evidente da estese alterazioni delle vie aeree, di significato sconosciuto. Neanche i fumatori quotidiani sviluppano malattie ostruttive polmonari. Il carcinoma polmonare non è stato osservato nei soggetti che fumano solo marijuana, probabilmente perché viene inalato meno fumo che con le sigarette. Tuttavia le biopsie dei tessuti bronchiali mostrano alterazioni precancerose, quindi un carcinoma può comunque insorgere. Gli studi sui neonati non hanno trovato evidenza di danni fetali dovuti all'uso di cannabis da parte della madre. Poiché i metaboliti dei cannabinoidi restano evidenti a lungo, nei consumatori regolari le analisi delle urine dopo un'unica assunzione restano positive per diversi giorni o settimane dalla sospensione. Le analisi che identificano un metabolita inattivo accertano soltanto il consumo, non la disfunzione; il fumatore può non essere sotto l'effetto della droga nel momento in cui la sua urina viene analizzata.

DIPENDENZA DA COCAINA

Si sviluppa tolleranza, ma non è stata confermata la dipendenza fisica; quando la droga viene sospesa non si manifesta alcuna sindrome tipica di astinenza. Tuttavia,

la tendenza a continuare l'assunzione della droga è forte a causa degli effetti piacevoli che induce nel soggetto utilizzatore.

La maggior parte dei consumatori ne fa un uso episodico a scopo edonistico, limitandone volontariamente il consumo. Tuttavia sono numerosi i casi in cui si è avuto un aumento dell'uso di cocaina e dello sviluppo di un comportamento tossicomane in alcuni consumatori, sebbene sia stato registrato recentemente un declino di tale fenomeno.

Il consumo di cocaina sotto forma di crack sta prendendo piede sempre di più in questi ultimi anni. Il sale cloridrato importato viene convertito in forma più volatile, di solito aggiungendo bicarbonato di sodio o acqua e riscaldandolo. La sostanza trasformata viene accesa, e si inala il fumo che ne risulta. L'assunzione in questo modo risulta più veloce e più veloce è anche l'effetto centrale. Il costo ancora piuttosto elevato in relazione ad altre droghe ne limita l'uso ad una cerchia comunque non esageratamente ampia.

Sintomi e segni

Gli effetti variano a seconda delle modalità di assunzione. L'assunzione per endovena o per via aerea produce ipereccitazione, ipervigilanza, euforia e sensazione di capacità e potenza. L'assunzione per via nasale riduce gli effetti ma ne consente un dilatamento nel tempo, che resta comunque breve. Di conseguenza la somministrazione normalmente viene ripetuta di frequente. Questa somministrazione ripetuta produce effetti tossici come tachicardia, ipertensione, midriasi, contrazioni muscolari, insonnia e nervosismo molto accentuato. Se si manifestano allucinazioni, deliri paranoidi e comportamenti aggressivi, la persona può essere pericolosa. Le pupille si dilatano al massimo e gli effetti simpaticomimetici della droga aumentano la gittata cardiaca e polmonare e la frequenza cardiaca.

L'overdose di cocaina può provocare tremori, convulsioni e delirium. La morte può sopravvenire per aritmie e insufficienza cardiovascolare. L'uso associato di cocaina e alcol produce un prodotto di condensazione, il cocaetilene, che ha proprietà stimolanti e può contribuire alla tossicità.

Il consumo costante per via nasale lacera le narici. L'assunzione sotto forma di crack a dosi elevate ha gravi conseguenze tossiche cardiovascolari e comportamentali.

Terapia

In genere non è necessario il trattamento dell'intossicazione acuta da cocaina, perché la droga ha una durata d'azione estremamente breve. Se è richiesto l'intervento per un'overdose, possono essere usati i barbiturici o il diazepam. È necessario trattare l'ipertermia.

La sospensione dell'uso protratto di cocaina richiede un'assistenza considerevole, e la depressione che ne può risultare richiede uno stretto controllo e un trattamento.

DIPENDENZA DA AMFETAMINA

La sintesi e l'uso illecito di metamfetamina sono largamente diffuse a causa dell'ottimo rapporto tra dose ed effetto e anche in seguito al costo ridotto. L'amfetamina e la metamfetamina non vengono più utilizzate, fortunatamente, come farmaci per controllare l'alimentazione. Viene utilizzata a livello medico per altri disturbi sotto uno stretto controllo medico.

Sintomi e segni

Gli effetti psicologici del consumo di amfetamina o metamfetamina sono simili a quelli prodotti dalla cocaina. Non esiste una sindrome di astinenza tipica, ma è verificabile tramite delle variazioni rilevabili all'encefalogramma. La sospensione brusca di amfetamina può smascherare una depressione soggiacente o scatenare una reazione depressiva grave. In molte persone, la sospensione è seguita da 2 o 3 giorni di astenia intensa o sonnolenza e da depressione psichica. La tolleranza da amfetamina si sviluppa lentamente, tanto che alcuni soggetti nel corso dei mesi o degli anni raggiungono dosi esageratamente più alte di quelle di partenza. La tolleranza ai vari effetti si sviluppa in maniera diversa, come la tachicardia che con il tempo tende a ridursi, ma possono manifestarsi effetti psicotossici, come allucinazioni e deliri. I consumatori di amfetamina sono soggetti a incidenti, poiché

la sostanza produce eccitamento e megalomania seguiti da affaticamento eccessivo e sonnolenza. La somministrazione endovenosa può indurre effetti simili alla schizofrenia. Alte dosi continuative di metamfetamina possono produrre reazioni d'ansia in cui il soggetto è angosciato, presenta tremori e è preoccupato dal suo benessere fisico; la psicosi da amfetamina, in cui il soggetto interpreta in modo erroneo le azioni degli altri, ha allucinazioni e diventa eccessivamente sospettoso; una sindrome da esaurimento, comprendente grande astenia e bisogno di sonno, dopo la fase di stimolazione; uno stato depressivo prolungato, durante il quale è possibile il suicidio. Eccezionalmente, la psicosi viene scatenata da una singola dose elevata o da dosi moderate ripetute. Gli aspetti tipici di tale psicosi comprendono deliri di persecuzione, idee di riferimento e sentimenti di onnipotenza. I soggetti che usano dosaggi elevati EV normalmente accettano l'idea che prima o poi diverranno paranoici e spesso non passano all'atto. Tuttavia, con un uso molto intenso della sostanza o dopo svariate settimane di assunzione, tale consapevolezza può venire a mancare e il consumatore può reagire ai deliri. È frequente il miglioramento nella psicosi da amfetamina anche dopo un uso prolungato. Anche i consumatori totalmente disorganizzati e paranoici possono guarire lentamente ma in maniera completa. I sintomi più floridi scompaiono in pochi giorni o settimane, ma spesso persistono per alcuni mesi confusione, perdita di memoria e ideazione delirante.

Terapia

La fenotiazina viene utilizzata per contrastare lo stato psicotico e i deliri. Anche la clorpromazina viene impiegata a questo scopo ma presenta numerosi effetti collaterali anche piuttosto marcati. L'alooperidolo è efficace ma spesso provoca una pericolosa reazione motoria acuta di tipo extrapiramidale. In genere la rassicurazione e un ambiente calmo e non minaccioso permettono al paziente di riprendersi. L'acidificazione delle urine con cloruro di ammonio favorisce l'escrezione dell'amfetamina.

DIPENDENZA DA ALLUCINOGENI

Gli allucinogeni comprendono la dietilamide dell'acido lisergico (LSD), la psilocibina, la mescalina, la 2,5-dimetossi-4-metilamfetamina, la 3,4-metilendiossimetamfetamina (MDMA) e altri derivati simil-anfetaminici di sostituzione. Il termine "allucinogeno" è ancora in uso, sebbene l'assunzione di tali farmaci possa anche non produrre allucinazioni. Termini alternativi come sostanze "psichedeliche" o "psicotomimetiche" sono ancora meno adatti.

La MDMA ha effetti stimolanti di tipo amfetaminico accompagnati da una sindrome psichedelica che provoca sicurezza di sé, empatia ed euforia. In Europa, l'uso di MDMA ha provocato alcuni decessi, molto probabilmente dovuti a grave disidratazione accompagnata da coagulazione vasale disseminata, mioglobinuria e insufficienza renale.

Sintomi e segni

Gli allucinogeni inducono uno stato di eccitamento del SNC e un'iperattività autonoma centrale, che si manifesta con alterazioni percettive e dell'umore. Le allucinazioni vere e proprie sono apparentemente rare. La dipendenza psichica dagli allucinogeni è molto variabile ma di solito non è intensa e, qualora tali sostanze vengano sospese improvvisamente, non può essere rilevata alcuna evidenza di dipendenza fisica. Per l'LSD si sviluppa un alto grado di tolleranza che scompare rapidamente. I principali rischi di queste sostanze sono gli effetti psichici e la compromissione della capacità di giudizio, che può condurre a decisioni pericolose o a incidenti.

Le reazioni agli allucinogeni dipendono da numerosi fattori, tra cui le aspettative del consumatore, la sua abilità nell'affrontare le distorsioni percettive e il contesto di assunzione. Le reazioni avverse (crisi d'ansia, apprensività estrema, stati di panico) all'LSD sono rare. Per lo più, queste reazioni regrediscono rapidamente con un trattamento adeguato in un ambiente sicuro. Tuttavia, alcuni soggetti (soprattutto dopo aver usato LSD) continuano ad avere disturbi e possono manifestare uno stato psicotico persistente. Non è chiaro se l'uso della droga sia in grado di accelerare o di rendere palese un potenziale psicotico preesistente, o se possa produrre tale condizione in un soggetto precedentemente stabile dal punto di vista psichico.

Alcuni soggetti, soprattutto i consumatori cronici o abituali di allucinogeni (particolarmente di LSD), possono manifestare gli effetti evidenti di tali sostanze anche dopo averne interrotto l'uso. Questi episodi sono costituiti per lo più da illusioni visive, ma possono includere distorsioni sensoriali di ogni tipo e allucinazioni.

Terapia

Le fenotiazine devono essere usate con estrema cautela a causa del pericolo di ipotensione, particolarmente nel caso di ingestione di fenciclidina. Gli ansiolitici come il clordiazepossido o il diazepam possono contribuire a ridurre l'ansia. Anche per i forti consumatori di allucinogeni, lo svezzamento dalla droga di solito si ottiene facilmente; alcuni di essi possono necessitare di un trattamento psichiatrico per problemi associati. Gli stati psicotici persistenti o gli altri disturbi psichici richiedono un trattamento psichiatrico adeguato. I flashback transitori e non eccessivamente disturbanti per il paziente non richiedono un trattamento particolare. Tuttavia, quelli associati ad ansia e depressione possono richiedere una terapia medica.

Piante attive sul Sistema Nervoso Centrale

Nel corso dei secoli le culture indigene hanno selezionato specie medicinali attivi sui vari organi ed apparati umani. Tra esse, un ruolo primario, perché legate al concetto di sacro, sono rappresentate dalle specie attive sul Sistema Nervoso Centrale. Tra gli innumerevoli esempi possono essere citate *Erythroxylon coca* (Erythroxylaceae), in cui la cocaina, estratta delle foglie, rappresenta una droga psicostimolante ampiamente conosciuta come sostanza d'abuso da oltre 100 anni; *Piper methysticum* (Piperaceae) in cui sono stati isolati più di quaranta composti dei quali solo i kavalattoni sono responsabili dell'effetto ansiolitico, *Passiflora incarnata* in cui vitexina, canferolo, orientina e alcaloidi dell'armano (armano, armalina e armina) sono responsabili dell'effetto ansiolitico/sedativo; *Valeriana officinalis* (Valerianaceae) in cui acido isovalerico, valeronone, valeranale, valeranolo, acido valerico e i valepotriati sono i componenti maggiormente responsabili dell'attività sedativa/ ansiolitica della pianta; *Paullinia cupana* conosciuta come stimolante del SNC e afrodisiaco per la presenza di caffeina, teofillina e teobromina; *Hypericum perforatum* riconosciuta ampiamente per le sue proprietà antidepressive. Esistono inoltre numerose specie vegetali appartenenti alla famiglia delle Solanaceae attive sul SNC, considerate da sempre piante importantissime per l'uomo per le loro proprietà tossiche e terapeutiche (mandragora, belladonna), come fonte alimentare (patata, pomodoro), spezie (peperoncino) o droghe voluttuarie (tabacco). Da un punto di vista chimico, le Solanacee sono caratterizzate dalla presenza di numerosi alcaloidi tropanici, derivati dall'aminoacido ornitina. La L-iosciamina è il principale alcaloide dei generi *Atropa* e *Datura*. Nella radice di mandragora, l'alcaloide predominante è la scopolamina. Entrambi gli alcaloidi hanno simili proprietà parasimpaticolitiche (riduzione della salivazione, sudorazione, secrezione bronchiale, aumento della peristalsi intestinale, rilassamento degli organi cavi quali cistifellea, vescica ed utero). Oltre a queste azioni a livello periferico, dovute sostanzialmente solo alla forma L dei vari alcaloidi, sono compresenti molti effetti a livello del S.N.C. La iosciamina in alte dosi è stimolante della corteccia cerebrale, mentre la scopolamina, anche in piccole dosi, è un depressore motorio e, in dosi più elevate, induce sonno crepuscolare. L'associazione di estratti di Solanacee del genere

Datura dell'area tropicale andina con benzodiazepine è molto utilizzata dalla “malavita” colombiana. Questa sostanza (burundanga) induce ipnosi, annulla la volontà, provoca perdita di memoria ed è utilizzata nelle cerimonie religiose. Appartengono inoltre a questa famiglia *Nicotiana tabacum* il cui alcaloide, la nicotina, agisce inizialmente sui gangli vegetativi come stimolante e a dosi più elevate come bloccante neurovegetativo; *Atropa belladonna* contenente sostanze parasimpaticolitiche/ anticolinergiche quali atropina, scopolamina e L- iosciamina; *Withania somnifera* che ha riscosso successo come adattogeno; *Solanum indicum* e *Solanum xanthocarpum*, il cui impiego comune è diretto al controllo della tosse; *Hyoscyamus niger* e tantissime altre. Il meccanismo d'azione generale delle piante appartenenti a tale famiglia è quello di deconnettere il Sistema Nervoso sottocorticale dal controllo corticale e di “sedare” la corteccia cerebrale [Bianchi, 2004].

Espostoa lanata Britt. et Rose



Figura 1. *Espostoa lanata*

Descrizione botanica

Cresce nelle regioni montuose di Ecuador, Bolivia e Perù ad un'altitudine che varia dai 1000 ed i 2000 metri. Cactacea quasi arborescente con tronco ramificato, alto fino a 4 metri. Rami del diametro di 5-10 centimetri. Numerose spine radiali, corte ed acute, giallastre con la punta bruna. Spine centrali 2 robuste e proiettate in fuori, gialle, lunghe 5-8 centimetri. Nelle parti giovani lunghi e sericei peli bianchi. La parte fiorifera è caratterizzata da un lungo cefalio (*Figura 1*)

Usi tradizionali

Utilizzata nelle pratiche mediche tradizionali: gli sciamani ne ispirano i fumi per entrare in contatto con il mondo delle anime, con evidenti attività psicoattive. Inoltre la peluria veniva anticamente per riempire i guanciali.

Studi precedenti

Non sono numerosi gli studi che si sono occupati di caratterizzare chimicamente la composizione in metaboliti secondari di *E. lanata*. Studi precedenti hanno dimostrato nella pianta la presenza di ordenina, tiramina, N-metiltiramina [Djerassi et al.] (*Figure 2-4*).

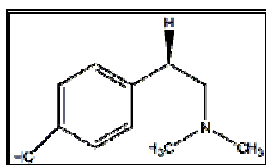


Figura 2. Ordenina

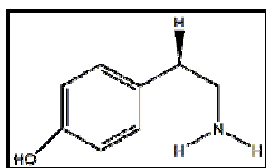


Figura 3. Tiramina

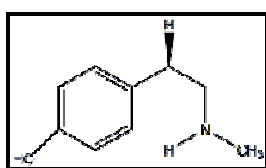


Figura 4. N-metil-tiramina

Risultati

Gli estratti sono stati ottenuti per macerazione con i seguenti solventi:

- Etere di petrolio.
- Cloroformio.
- Cloroformio /Metanolo 9:1.
- Metanolo.

La procedura eseguita può essere riassunta dalla Tabella 1:

Tronco polverizzato
Peso fresco: 4 Kg
Peso secco: 550 g

Tabella 1. Peso estratto secco

Il quantitativo di estratto ottenuto da ciascun processo di macerazione è riportato nella Tabella 2.

Peso in grammi estratto foglie e fiori	
Etere di petrolio :	4,2g
Cloroformio :	5,9g
Cloroformio/ Metanolo 9:1 :	9,3g
Metanolo :	7,3g

Tabella 2. peso degli estratti

Sono stati prelevati 3,7 g di estratto metanolico solubilizzato in 20 ml di metanolo ed il surnatante è stato prelevato ed utilizzato per il processo di separazione. Sono state ottenute le 85 frazioni che, alla luce delle risultanze in cromatografia su strato sottile (TLC) sono state riunite in frazioni maggiori. La tabella seguente mostra le riunioni ottenute (*Tabella 3*)

N° sequenziale	Peso in mg
1	899,1
2	839,7
3	143,0
4	291,4
5	166,9

Tabella 3. Separazione per esclusione dimensionale

Tali riunioni sono state saggiate *in vivo* in modo da orientare il lavoro stesso in direzione delle sole frazioni attive biologicamente. Essendo attiva, come vedremo in seguito la frazione denominata 2, è stata effettuata la sua caratterizzazione chimica tramite HPLC. Di seguito sono riportati i grafici di attività delle frazioni precedentemente illustrate (*Figure 6-11*).

Gli estratti sono stati testati su topi CD-1 in *activity cage* per verificarne la capacità di influenzare l'attività motoria. Degli estratti utilizzati solo l'estratto metanolico ha dimostrato di essere attivo.

Ottenimento dei composti puri

Le frazioni sono state sottoposte ad un ulteriore processo di purificazione tramite HPLC utilizzando una colonna C 18 RF μ -Bondapak. Le condizioni utilizzate sono le seguenti: flusso 2.0 ml/min, eluente 60% Metanolo + 40% Acqua Diluizione 1mg/100 μ L. Da questa separazione sono state ottenute 5 frazioni differenti (*Tabella4.*) E' stata successivamente effettuata la caratterizzazione chimica dei composti isolati tramite analisi NMR.

HPLC fr 2	Peso in mg
A	22,1
B	81,5
C	15,2
D	30,6
E	28,4
F	15,8

Tabella 4. Pesì frazioni HPLC

La interpretazione degli spettri ha portato all'identificazione dell'aminoacido Tiramina (*fig.12*) coniugata ad una lunga e complessa catena lipofila.

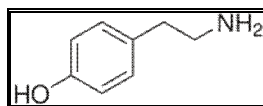


Figura 5. tiramina

Come sar  desumibile in seguito solo la frazione metanolica riduce la motilit  nei test eseguiti. Per questa motivazione, il lavoro   stato biossay Oriented, frazione metanolica che   stata saggiata alle dosi di 30 mg/Kg e 100 mg/Kg.

Il grafico dell'attivit  motoria sul complesso metabolico   riportato nella *Figura 5*.

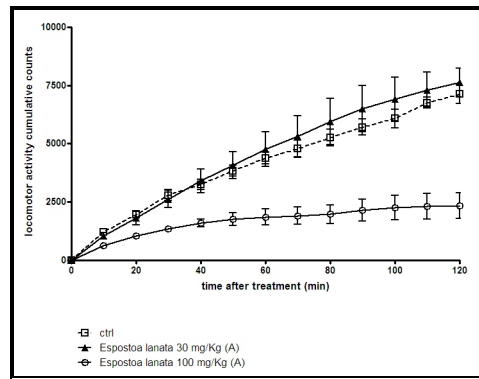


Figura 6. Test attività motoria sulla frazione metanolica

Dopo aver testato l'attività della frazione metanolica *in vivo* su topi maschi CD-1, presso i laboratori del Dipartimento di Farmacologia Sperimentale dell'Università di Napoli Federico II, è stata effettuata una purificazione di questo complesso per cromatografia ad esclusione molecolare su Sephadex[®] LH 20. Le frazioni ottenute sono state somministrate per intraperitoneale solubilizzando l'estratto metanolico in soluzione salina. I tempi di lettura sono stati di 120 minuti con una cadenza di rilevazione ogni 10 minuti dell'attività motoria degli animali e ripetuti per 6 animali.

Tali riunioni sono state saggiate *in vivo* in modo da orientare il lavoro stesso in direzione delle sole frazioni attive biologicamente. Essendo attiva, come vedremo in seguito la frazione denominata 2, è stata effettuata la sua caratterizzazione chimica tramite HPLC. Di seguito sono riportati i grafici di attività delle frazioni precedentemente illustrate (*Figure 6-11*).

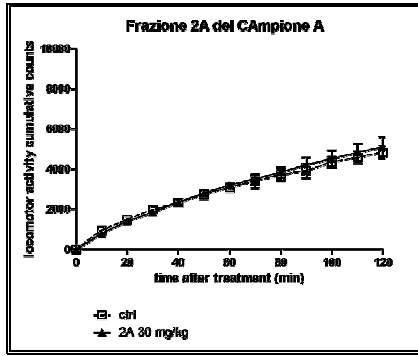


Figura 7. Attività locomotoria frazione 1

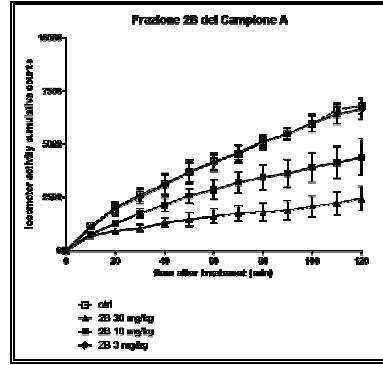


Figura 8. Attività locomotoria frazione 2

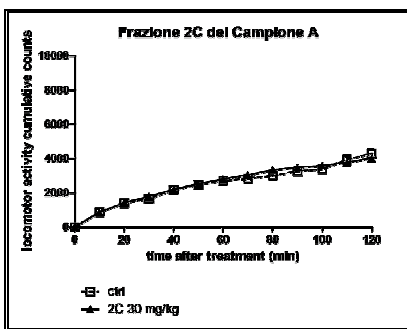


Figura 9. Attività locomotoria frazione 3

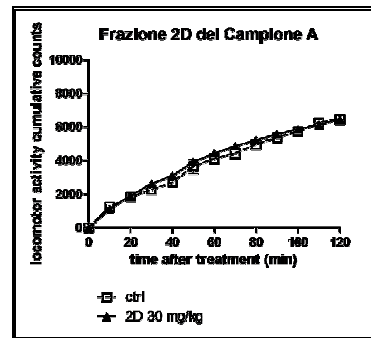


Figura 10. Attività locomotoria frazione 4

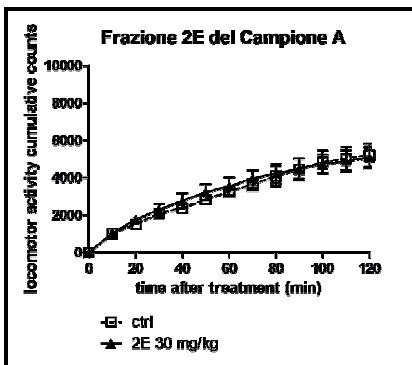


Figura 11. Attività locomotoria frazione 5

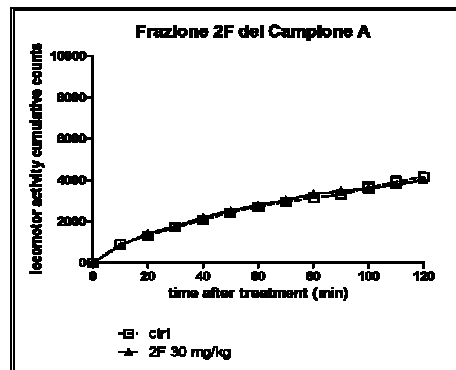


Figura 12. Attività locomotoria frazione 6

Discussione

Nel genere *Cylindropuntia* [Meyer & Mohamed, 1980] sono stati individuati alcaloidi feniletilaminici quali ordenina, candicina, colina, tiramina, N-metiltiramina, 3-metossitiramina e 3,4-dimetossi-b-feniletilamina. La tiramina è un simpaticomimeticico che stimola il rilascio di noradrenalina dalle vescicole neuronali causando vasocostrizione, aumento dei battiti cardiaci e della pressione sanguigna. L'esistenza di un recettore con alta affinità per la tiramina, accoppiato a una proteina G e denominato TA1, suggerisce la possibilità che questa sostanza agisca da neurotrasmettitore. I recettori TA1 sono distribuiti nel cervello e in tessuti periferici quali i reni. Ciò giustificherebbe l'ipotesi che la tiramina possa anche agire in modo diretto sul controllo della pressione sanguigna.

Prospettive

Le piante utilizzate a scopo rituale spesso hanno come scopo quello di indurre danni ai nemici. Lo studio di piante utilizzate nella magia nera vengono spesso sottovalutate e si incontra una forte resistenza culturale nel parlare di esse. Il ritrovamento della tiramina in *E. lanata* è molto importante dal punto di vista culturale. Inoltre questa scoperta conferma la presenza di fenetilamine nelle *cactaceae*. Le prospettive per questa classe di molecole è analoga a quella proposta l'uso medico della cannabis e gli allucinogeni di sintesi che hanno in letteratura un ruolo nel trattamento dei disturbi psichici post-traumatici, dei dolori e delle sofferenze dei pazienti terminali, dei disturbi psicosomatici e delle nevrosi ossessive, delle depressioni e dei disturbi da dipendenza da alcol, dipendenza da oppiacei e da cocaina;

Brugmansia arborea Lagerheim



Figura 13. *Brugmansia arborea*

Descrizione botanica

Pianta nativa del Sud America (Ecuador e Cile). È una specie adattabile ma tipica di climi tropicali e subtropicali. Cresce in terreni sufficientemente drenati in esposizione totale o parziale al sole. Si presenta come arbusto o albero differente dalle specie *B. suaveolens* e *B. aurea*. Tra le sei specie comprese nel genere, la varietà arborea ha il fiore più breve. La corolla bianca ha una lunghezza compresa tra gli 8 ed i 12 centimetri a forma di tromba e rulli che richiama la forma di viticci lunghi due centimetri. Il profumo del fiore è più forte la sera, rendendolo più attraente per falene e altri impollinatori notturni. I fiori sono visibili tutto l'anno anche se il periodo più favorevole è la stagione estiva. Il fogliame è ricoperto di peli vellutati e i frutti sono capsule spinose. Presentano colori verdolini e nel processo di maturazione passano al giallino – verde. Sono velenosi e non commestibili. Gli stami hanno peli bianchi e le antere sono indipendenti. *B. arborea* è l'unica specie auto-fertile e non ha bisogno di un donatore di polline per produrre i suoi frutti. Il seme impiega 4 mesi a maturare all'interno del frutto. Essi sono di colore bruno scuro con tre angoli (*Figura 13*)

Gli usi tradizionali

Le notizie storiche fanno risalire l'introduzione delle brugmansie (in passato dature) nei Giardini Hanbury alla fine dell'800 ad opera di Thomas Hanbury e del fratello Daniel che, farmacista, era interessato alla coltivazione delle Solanacee, famiglia di grande importanza farmaceutica

Le brugmansie nelle regioni di origine (Sud America) erano impiegate dalle popolazioni indigene come veleni, per usi terapeutici (come antispasmodica nella cura dell'asma), psichedelici e nelle cerimonie religiose. Queste piante nel corso della storia sono state utilizzate già dagli Atzechi e, sembra, persino dalla Pizia delfica. La presenza di alcaloidi conferisce alle piante, infatti, proprietà psicotrope e allucinogene. Le piante vengono mangiate fresche o essiccate, bevute come tisane, preparate come unguenti o pomate, oppure fumate.

In particolare, *B. arborea*, conosciuta nei paesi peruviani del nord anche come “misha oso”, “misha toro” e “misha galga”, è utilizzata ancora oggi nella medicina tradizionale andina oltre che durante le cerimonie religiose anche per il trattamento dei foruncoli e delle altre eruzioni cutanee (foglie fresche o rispettiva tintura alcolica). Le foglie, intere o frammenti di esse, per applicazione cutanea sull'area infiammata nel caso di infiammazione reumatica o altra infiammazione, mentre i decotti delle foglie e dei fiori sono usati tipicamente come analgesici, decongestionanti, vulnerari e antispasmodici oltre che come antireumatici [De Feo, 2005].

Studi precedenti

Studi precedenti hanno permesso di identificare i componenti attivi della pianta. Nei fiori e nelle foglie di *Brugmansia candida* Pers. e *Brugmansia arborea* (L.) Laghereim sono stati determinati gli alcaloidi tropanici. In *B. arborea* i livelli medi trovati erano 77.7 e 39.9 mg per 100 gr di fiori e foglie essiccati. La Ioscina era presente in fiori e foglie essiccati di *B. arborea* tra 46.3 e 35.1 mg (per 100 gr di sostanza essiccata) (*Figura 14*). La Iosciamina invece è stata ritrovata in tracce solo

in casi sporadici esclusivamente nei fiori. In entrambi le specie, i pistilli contenevano la maggiore quantità percentuale di alcaloidi [Roses et al. 1987]

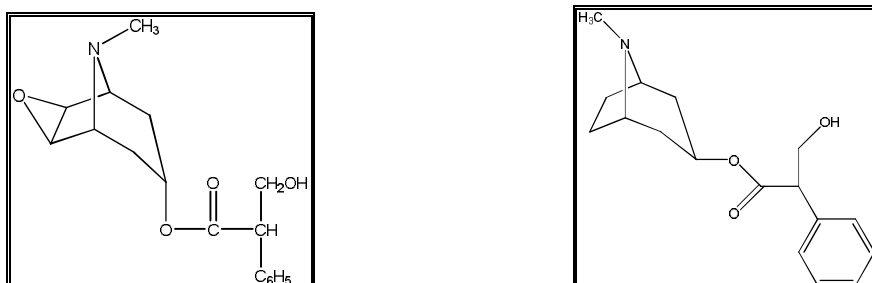


Figura 14. Ioscina e Iosciamina

Il processo estrattivo effettuato:

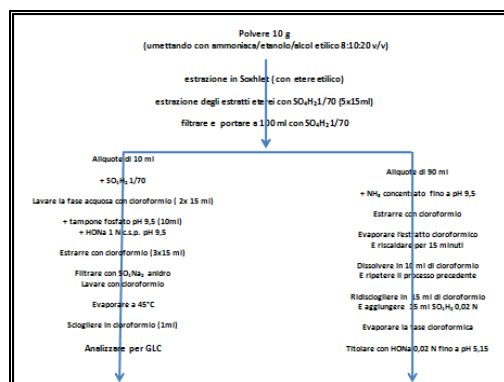


Figura 15. metodo di estrazione

Farmacologia

Il più recente studio relativo alla composizione chimica della pianta è stato pubblicato nel 1997. In esso sono stati analizzati gli effetti sul Sistema Nervoso Centrale degli estratti metanolici e acquosi, identificate mediante metodi spettroscopici le tre sostanze attive – atropina, scopolamina e nor-ioscina (Figura 16) - appartenenti alla classe degli alcaloidi tropanici e analizzate gli effetti delle frazioni cromatografiche e dei tre alcaloidi puri sulle contrazioni dell'ileo isolato di cavia indotta da acetilcolina (Ach) ed elettricamente. I risultati mostrarono che

entrambi gli estratti testati riducevano la contrazione dell'ileo in modo dose-dipendente e che alcune frazioni metanoliche parzialmente purificate e i tre composti puri riducevano le contrazioni elettriche ed indotte da acetilcolina [Capasso et al. 1997].

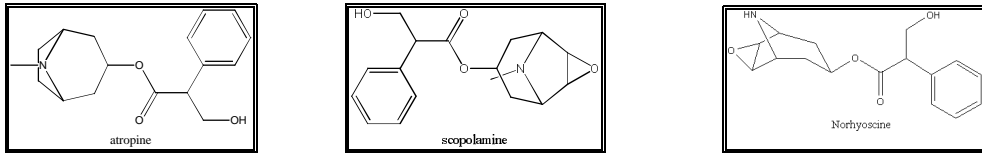


Figura 16. Atropina, Scopolamina e Nor-ioscina

I risultati sono illustrati nelle figure seguenti

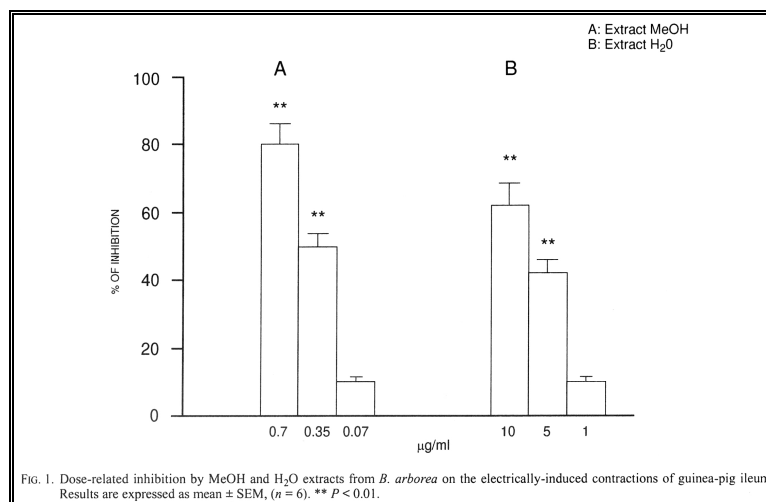


Figura 17. Inibizione dose-correlata da parte degli estratti acquosi di *B. arborea* nei confronti delle contrazioni indotte elettricamente sull'ileo di cavia.

La Figura 17 mostra che la contrazione è indotta in maniera dose dipendente alle dosi considerate e che l'estratto metanolico è più potente rispetto a quello acquoso.

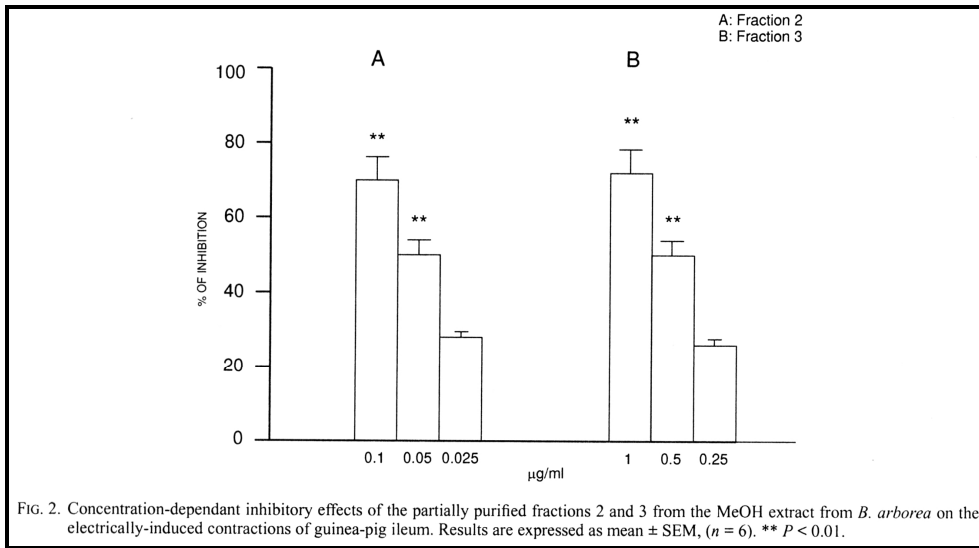


Figura 18. Effetti inibitori concentrazione dipendente da parte delle frazioni 2 e 3 dell'estratto metanolico di *B. arborea* sulle contrazioni di ileo di cavia indotte elettricamente.

L'estratto metanolico, maggiormente attivo, è stato purificato mediante colonna di Sephadex[®] LH 20. Ciascuna frazione parzialmente purificata risulta essere ugualmente attiva così come mostra il grafico (Figura 18).

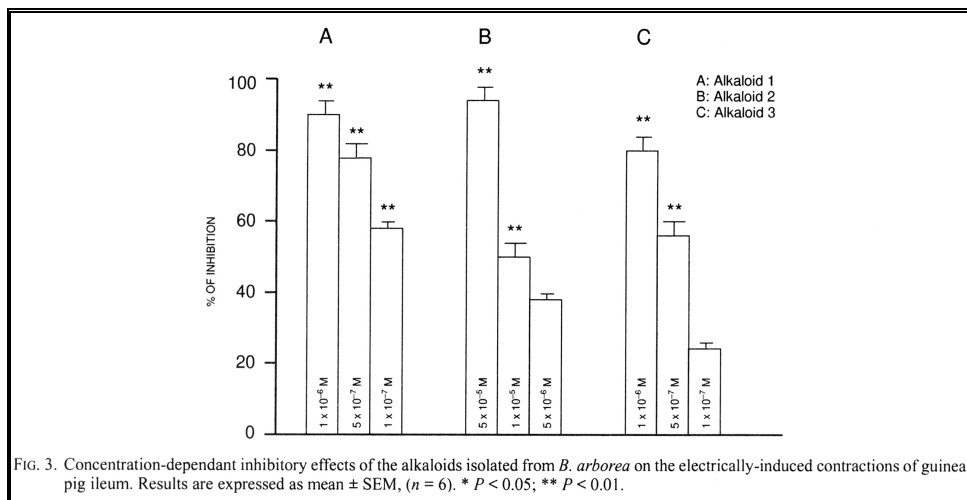


Figura 19. Effetti inibitori concentrazione dipendenti da parte degli alcaloidi isolati da *B. arborea* sulle contrazioni indotte elettricamente dell'ileo di cavia

La *Figura 19* mostra che i tre alcaloidi purificati dalla frazione 2 dell'estratto metanolico hanno un potente effetto inibitorio sull'E.C.I. nell'ordine di potenza atropina > scopolamina > nor- ioscina.

Brugmansia arborea è stata oggetto solo di pochi studi farmacologici. È stato evidenziato che l'estratto acquoso della pianta *in vitro* mostra un'affinità per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, D₁, D₂, α_1 e α_2 mediante saggi di binding. Il saggio è stato effettuato sulla corteccia cerebrale di ratti maschi Sprague-Dawley. L'affinità dell'estratto per i recettori è stata espressa come inibizione percentuale di radioligando al recettore e misurata come radioattività del complesso radioligando/recettore rimanente (*Tabella 20*). I risultati di tale studio sono stati riassunti nella seguente figura [De Feo et al, 2005]

Plant extract	5-HT _{1A} (%)	5-HT _{2A} (%)	5HT _{2C} (%)	D1(%)	D2(%)	α_1 (%)	α_2 (%)
BrAE	38.5	16.0	39.2	74.8	96.8	21.0	37.2

Tabella 5. Affinità degli estratti di *B. arborea* per i recettori testati è espressa come inibizione percentuale di binding radioligando/recettore e misurata come radioattività del complesso restante radioligando/recettore

Studi *in vitro* sul binding recettoriale finalizzati ad evidenziare l'affinità a la selettività sui recettori serotoninergici 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, sui recettori dopaminergici D₁ e D₂, sui recettori adrenergici α_1 e α_2 di *B. arborea* hanno dimostrato che l'estratto acquoso della pianta mostra affinità per tutti i recettori testati e il più alto livello di inibizione alla massima concentrazione testata (125 μ g/ml) era il 38% per il recettore 5HT_{1A}, 16% per il recettore 5HT_{2A} e il 39% per il recettore 5HT_{2C}. I risultati degli esperimenti hanno confermato che la pianta è in grado di interagire con i recettori serotoninergici (responsabili del controllo dell'umore, dell'emozione, del sonno, dell'appetito e di numerose funzioni psicologiche e comportamentali) e di avere effetti sul sistema nervoso centrale simili a quelli osservati in alcune sostanze ad attività psicotropa [De Feo et al. 2007].

I risultati sono riportati nella seguente figura

	5-HT _{1A}	5-HT _{2a}	5HT _{2c}	D1	D2	α ₁	α ₂
B. arborea Acqueous extract	ME38.5 %	ME 16%	ME 39,2%	IC ₅₀ +0.35 μg/ml	IC ₅₀ 0.16±0.07 μg/ml	ME21.0 %	ME 23.8%

Tabella 6. Affinità dell'estratto di *B. arborea* per i recettori alla massima concentrazione testata (125 mg/ml) sui recettori testati è definita come inibizione percentuale di binding radioligando/ recettore e misurata come radioattività nel complesso restante

Uno studio condotto su topi maschi relativo agli effetti farmacologici sul SNC di *Brugmansia arborea* ha stabilito che l'estratto metanolico riduce significativamente, in maniera dose-dipendente, l'attività locomotoria dei topi (*Figura 20*). Questa riduzione è notevole dopo 10 min. dall'inizio del test e aumenta durante tutto il tempo di analisi (120 min).

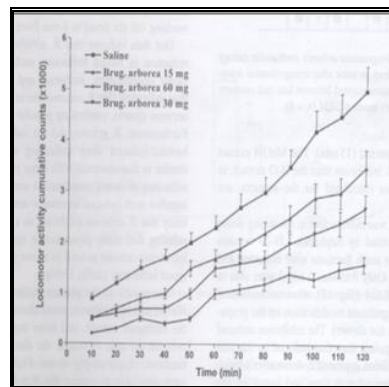


Figura 20. Curva tempo-dose effetto dell'estratto metanolico di *B. arborea* sull'attività locomotoria nei topi. Ascissa: minuti; Ordinata: calcoli cumulativi ogni 10 minuti

Inoltre la coordinazione motoria dei topi trattati è stata ridotta in modo dose dipendente quando viene messa a confronto la soluzione salina con l'estratto metanolico di *B. arborea* misurata mediante il rota- rod bar (*Figura 21*).

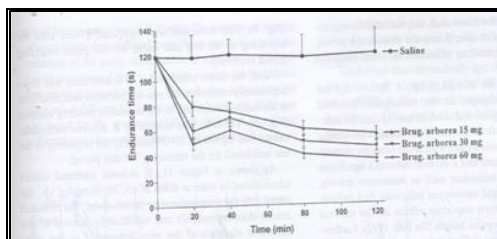


Figura 21. curva dose effetto dell'estratto metanolico di *B. arborea* sulla coordinazione motoria dei topi.

Come mostrato nella *Figura 22* l'estratto metanolico di *B. arborea* somministrato nei topi alla dose di 15, 30, 60 mg/Kg i.p non modifica il sonno indotto dal pentobarbital.

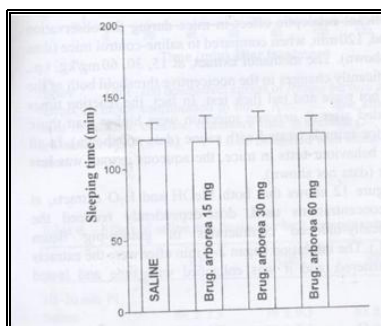


Figura 22. Effetti dell'estratto metanolico di *B. arborea* sul sonno indotto da pentobarbital

L'estratto metanolico di *Brugmansia arborea* riduce in maniera dose dipendente e in modo significativo tutti gli elementi comportamentali dei topi analizzati. L'inibizione più significativa è stata registrata dopo 10 minuti dall'inizio del trattamento, come mostrato nella *Figura 23*.

	RE	GR	SRT	CR	SM	WF	SC	BH
10-20 min PI								
Saline	59 ± 7.1	82 ± 4.7	77 ± 5.8	58 ± 3.0	50 ± 3.7	47 ± 6.8	57 ± 5.7	79 ± 6.4
Brug 15 mg	36 ± 3.7	59 ± 5.3	62 ± 5.8	47 ± 3.5	44 ± 7.0	50 ± 3.5	35 ± 2.0	57 ± 4.3
Brug 30 mg	39 ± 2.5	37 ± 3.5	52 ± 3.2	30 ± 3.2	36 ± 2.6	47 ± 2.7	30 ± 3.1	39 ± 2.4
Brug 60 mg	25 ± 1.6	19 ± 1.2	12 ± 1.9	10 ± 1.2	16 ± 1.7	17 ± 1.6	11 ± 1.5	13 ± 1.7
40-50 min PI								
Saline	77 ± 6.8	88 ± 7.5	89 ± 7.8	81 ± 7.3	80 ± 6.8	69 ± 7.1	81 ± 8.7	90 ± 8.1
Brug 15 mg	51 ± 3.9	63 ± 7.5	67 ± 7.1	77 ± 7.3	57 ± 7.9	41 ± 3.9	44 ± 3.6	32 ± 3.9
Brug 30 mg	32 ± 1.9	42 ± 3.9	47 ± 3.7	51 ± 5.9	39 ± 3.2	19 ± 1.2	24 ± 1.3	20 ± 1.4
Brug 60 mg	27 ± 1.5	26 ± 2.3	23 ± 1.8	27 ± 1.4	21 ± 1.7	13 ± 1.0	10 ± 1.1	13 ± 1.4
70-80 min PI								
Saline	79 ± 3.1	88 ± 7.2	74 ± 6.2	72 ± 6.4	80 ± 8.4	70 ± 6.2	82 ± 6.2	77 ± 6.9
Brug 15 mg	57 ± 6.3	53 ± 3.5	48 ± 4.3	39 ± 4.2	62 ± 4.7	38 ± 2.5	45 ± 3.2	41 ± 3.0
Brug 30 mg	36 ± 2.3	23 ± 3.1	34 ± 2.9	23 ± 1.3	42 ± 4.1	27 ± 2.1	22 ± 1.3	24 ± 1.4
Brug 60 mg	22 ± 1.3	10 ± 1.4	15 ± 1.2	18 ± 1.5	20 ± 2.3	12 ± 1.3	10 ± 1.2	11 ± 1.2
100-120 min PI								
Saline	75 ± 6.4	79 ± 7.5	85 ± 8.3	77 ± 7.5	85 ± 7.9	75 ± 7.1	67 ± 8.0	76 ± 7.8
Brug 15 mg	35 ± 2.9	39 ± 4.2	39 ± 2.6	44 ± 3.6	42 ± 3.1	47 ± 3.2	42 ± 5.3	47 ± 4.8
Brug 30 mg	29 ± 1.8	20 ± 2.0	14 ± 1.2	19 ± 1.5	15 ± 1.3	16 ± 1.3	18 ± 1.3	19 ± 1.4
Brug 60 mg	12 ± 1.4	15 ± 1.6	17 ± 1.9	12 ± 1.9	11 ± 2.0	15 ± 1.3	18 ± 1.6	21 ± 1.1

Figura 23. Le abbreviazioni : Re: rearing; GR: Grooming; SRT: Social response; CR: crossing; SM: smelling; WF: Washing face; SC: Scratching; BH: bar holding; PI: Post injection; Brug: *Brugmansia arborea*.

Inoltre gli estratti acquosi e metanolici riducono in maniera dose dipendente la contrazione indotta elettricamente dell'ileo di cavia come mostrato dalla *Figura 24*. L'estratto metanolico dimostra una attività maggiore dell'estratto acquoso.

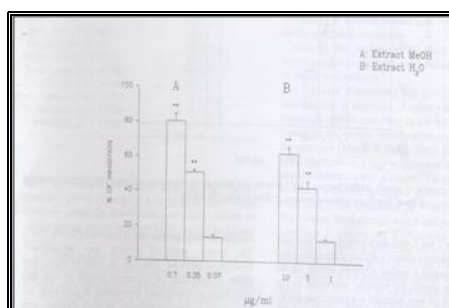


Figura 24. inibizione dose correlata degli estratti metanolico ed acquoso di *B. arborea* sulle contrazioni di ileo di cavia

I tre composti purificati ottenuti dall'estratto metanolico (atropina; scopolamina; nor- ioscina) inibiscono la contrazione dell'ileo di cavia in modo dose-dipendente come riportato nella *Figura 25*.

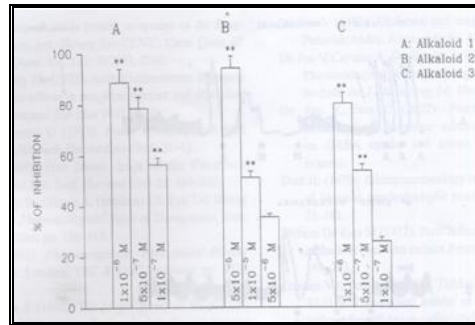


Figura 25. Risposta degli alcaloidi isolati da *B. arborea* dose correlata sulle contrazioni indotte in ileo di cavia

Inoltre inibiscono la contrazione indotta da acetilcolina dal momento che fungono da suoi antagonisti. Essi sono conosciuti per il loro effetto antimuscarinico. L'ordine secondo cui si manifesta la potenza è atropina >nor-ioscina> scopolamina. Inoltre i tre alcaloidi sono risultati efficaci nel ridurre la sindrome d'astinenza da morfina in maniera dose dipendente quando vengono somministrati 10 minuti dopo la morfina stessa [De Feo et al., 2002].

La capacità di ridurre la sindrome d'astinenza da morfina è stata dimostrata anche con studi *in vitro*. I tre alcaloidi (atropina, scopolamina, nor-ioscina) iniettati 10 minuti dopo la morfina sono stati capaci di ridurre tale effetto in maniera dose dipendente come mostrato dalla *Figura 26*.

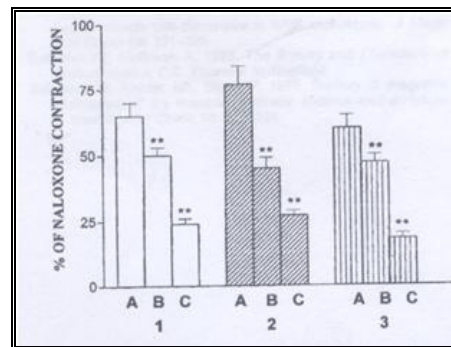


Figura 26. Effetto degli alcaloidi su astinenza indotta da morfina

Attualmente però il meccanismo secondo il quale i tre composti regolano tale effetto è ancora poco chiaro [De Feo, 2003].

I dati presenti in letteratura sono stati utilizzati per dare origine al nostro studio.

Risultati

Gli estratti sono stati ottenuti per macerazione con i seguenti solventi:

- Etere di petrolio.
- Cloroformio.
- Cloroformio /Metanolo 9:1.
- Metanolo.

La procedura eseguita può essere riassunta dalla *Tabella 7*.

Foglie e fiori	Rami
Peso fresco: 4,9 kg	Peso fresco:4.8 kg
Peso secco: 800 g	Peso secco: 850g

Tabella 7.

Il quantitativo di estratto ottenuto da ciascun processo di macerazione è riportato nella *Tabella 8*

Peso in grammi estratto foglie e fiori	Peso in grammi estratto rami
Etere di petrolio : 6,2527g	Etere di petrolio :13.3685g
Cloroformio : 22,3400g	Cloroformio : 13,1881g
Cloroformio/ Metanolo 9:1 : 6,0499g	Cloroformio/Metanolo 9:1 : 9.6225g
Metanolo : 31.8052g	Metanolo : 89.1582g

Tabella 8. Peso in grammi degli estratti

La presenza di alcaloidi nell'estratto metanologico di entrambe le frazioni (anche se la frazione fiori e foglie ne risultava quantitativamente più abbondante) è stata rivelata mediante TLC.

Il processo di separazione e di ricerca di composti utili alla nostra ricerca ha utilizzato metodologie di separazioni ripetute. Gli alcaloidi sono stati estratti dal residuo metabolico tramite alcalinizzazione a pH 8 e successiva estrazione con diclorometano.

Gli estratti sono stati testati al fine di valutarne l'attività biologica.

L'estratto cloroformio/ metanolo 9: 1 è stato separato su colonna di gel di silice. Sono state raccolte 140 frazioni riunite per affinità chimiche, in base all'analisi cromatografica su lastre di silice, in 8 riunioni, come riportato in *Tabella 9*.

N° frazione	Peso in mg
1-10	496,8
11-18	260,3
19-52	399,5
53-58	47,5
59-60	43,8
61-78	145,3
79-88	522,0
89-140	136,9

Tabella 9. Frazioni di Gel di Silice

L'attività sul SNC delle tredici riunioni ottenute dalla seconda separazione è stata saggiata in vivo su topi maschi CD1 presso il laboratorio di Farmacologia sperimentale dell'Università degli Studi di Napoli, ma ha dato esito negativo.

Dopo aver testato l'attività della frazione metanolica presso l'Università degli studi di Camerino- Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sanità pubblica *in vivo* su topi maschi CD1 è stata effettuata una purificazione di quest'ultimo per cromatografia di esclusione molecolare su Sephadex[®] LH 20.

Sono stati prelevati 3,48 g di estratto metanolico di fiori e foglie, solubilizzati in 20 ml di metanolo e centrifugati. Sono state ottenute 115 frazioni che, mediante cromatografia su strato sottile (TLC) sono state riunite in 15 frazioni maggiori. La *Tabella 10* riporta le riunioni ottenute.

N° sequenziale	Range riunione	Peso in mg	% rispetto all'intero
1	1-10	3,3	0,09
2	11-21	470,4	13,4
3	22-26	285,1	8,1
4	27-33	367,6	10,5
5	34-41	522,6	21,4
6	42-53	230,5	6,5
7	54-60	33,4	0,9
8	61-88	222,6	6,3
9	89-93	39,3	1,1
10	94-115	200,7	5,7

Tabella 10. Riunioni di Sephadex

Le riunioni 2, 3 e 4 contenenti gli alcaloidi sono state poi sottoposte a dibattimento in acqua/ butanolo in ambiente alcalino (pH 8).

Ottenimento dei composti puri

Le frazioni 2, 3 e 4 sono state sottoposte ad un ulteriore processo di purificazione tramite HPLC utilizzando una colonna C 18 RF μ - Bondapak, utilizzando le seguenti condizioni Flusso 2.0 ml/min, eluente 70% metanolo + 30% acqua, diluizione 1mg/100 μ L. Da questa separazione sono state ottenute 9 frazioni differenti che hanno portato all'isolamento di tre alcaloidi poi riconosciuti attraverso metodiche NMR.

HPLC fr 2	Peso in mg	HPLC fr 3	Peso in mg	HPLC fr 4	Peso in mg
Sol	27,0	Sol	5,9	Sol	30,9
1	37,5	1	8,3	1	124,4
2	21,8	2	2,8	2	17,5
3	7,3	3	3,4	3	6,3
4	1,4	4	28,8	4	19,1
5	19,5	5	2,9	5	14,1
6	1,0	6	5,2	Sca	4,1
7	0,6	7	4,3		
Sca	8,3	Sca	4,0		

Tabella 11. Peso in grammi delle frazioni ottenute dall'HPLC

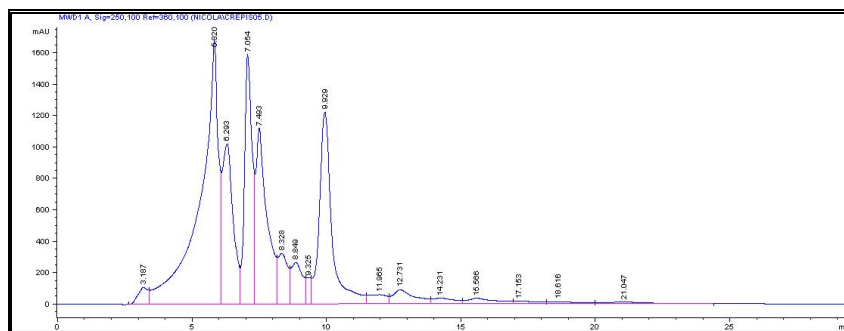


Figura 27. Cromatogramma dell'HPLC riunione 2

Saggi Biologici

I dati di letteratura riportano la capacità della pianta e in particolare dell'estratto metanolico di ridurre *in vitro* il withdrawal da morfina. Si è deciso dunque, sulla base di tali ricerche scientifiche, di testare l'efficacia *in vivo* presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Camerino.

Gli animali utilizzati sono stati topi maschi adulti ceppo CD-1 (Charles River, Italy) del peso di 25–30 g. I topi sono stati allevati in colonie (7 topi in ogni gabbia) esposti a cicli normali di luce (dalle 7.00 a.m. alle 7.00 p.m.); temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$; acqua e cibo *ad libitum*.

Sono stati effettuati i saggi con l'estratto metanolico dibattuto, i quali sono stati suddivisi in nove gruppi ciascuno dei quali ha ricevuto uno specifico trattamento secondo il seguente disegno sperimentale :

- 1 gruppo Brugmansia 7,5mg/Kg i.p. + soluzione salina s.c.
- 1 gruppo Brugmansia 15 mg/Kg i.p. + soluzione salina s.c.
- 1 gruppo Brugmansia 30 mg/Kg i.p. + soluzione salina s.c.
- 1 gruppo controllo veicoli
- 1 gruppo Morfina + soluzione salina s.c.
- 1 gruppo controllo Naloxone
- 1 gruppo Brugmansia 7,5mg/Kg i.p. + Morf. 10mg/Kg s.c.
- 1 gruppo Brugmansia 15 mg/Kg i.p. + Morf. 10mg/Kg s.c.
- 1 gruppo Brugmansia 30 mg/Kg i.p. + Morf. 10mg/Kg s.c.

Gli esperimenti hanno avuto una durata di sette giorni durante i quali è stata valutata l'induzione alla tolleranza e alla dipendenza rispettivamente mediante il Tail-Flick test e la registrazione dell'attività motoria. Inoltre hanno comportato una riduzione del peso corporeo delle cavie variabile a seconda del tipo di trattamento cui sono state sottoposte (*Figura 28*).

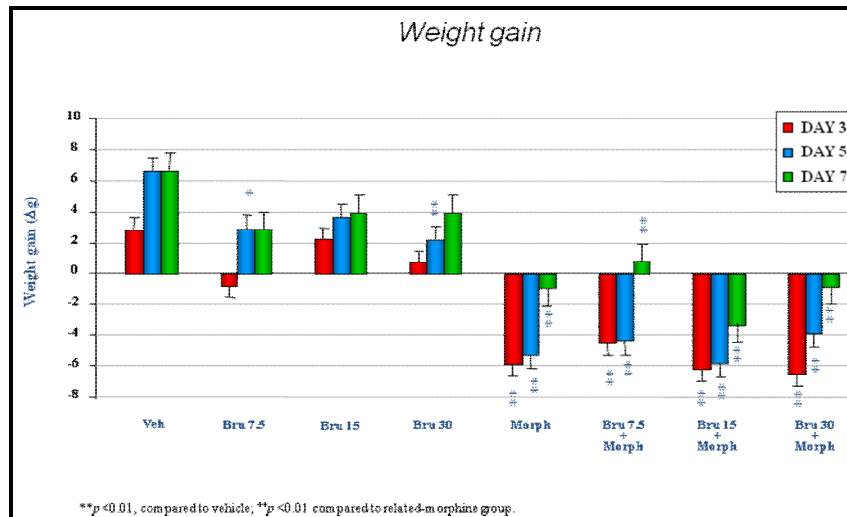


Figura 28. Variazioni di peso degli animali trattati

Il grafico dimostra che durante i sette giorni di trattamento la riduzione ponderale del peso indotta dalla morfina si verifica esclusivamente quando è data in co-somministrazione con l'estratto di *B. arborea* alla dose di 7.5mg / kg

Acquisizione della tolleranza da morfina in combinazione con la frazione complessa di *Brugmansia arborea*.

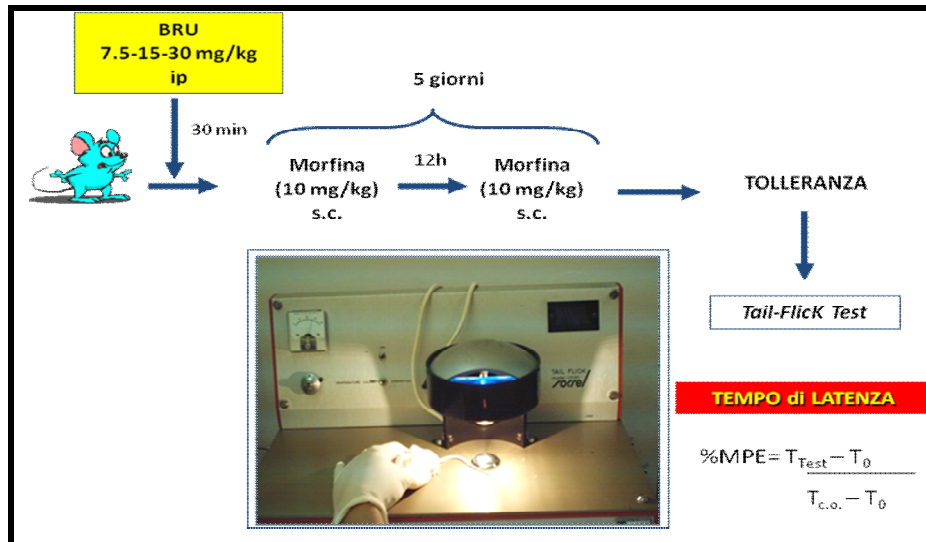
Tolleranza

Per tolleranza si intende l'adattamento fisiologico dell'organismo che, a fronte della somministrazione prolungata del farmaco, in un certo senso si abitua a quella dose e rende indispensabile un incremento del dosaggio per mantenere lo stesso effetto farmacologico desiderato. In questo studio la tolleranza è stata valutata andando a misurare la riduzione del potere analgesico della morfina in seguito a trattamento ripetuto.

Topi maschi CD1 hanno ricevuto per via sottocutanea somministrazioni ripetute di morfina (10mg/kg, s.c.), 2 volte al giorno per 5 giorni consecutivi.

Trenta minuti prima di ciascuna somministrazione di morfina, i topi hanno ricevuto per via i.p. l'estratto di *B. arborea* alle dosi di 7.5, 15, 30 mg/kg.

La tolleranza è stata valutata mediante tail-flick test, confrontando l'effetto antinocicettivo della morfina subito dopo la prima (giorno 1) e l'ultima somministrazione (giorno 5).



Il tail-flick test si avvale di un analgesimetro mediante il quale è possibile misurare il tempo di risposta dell'animale in seguito all'applicazione di uno stimolo dolorifico costituito da un fascio di calore radiante di opportuna intensità applicato sulla coda, a 2 cm dall'estremità. La potenza calorifica del fascio è stata regolata in modo da avere un tempo di risposta base per ogni topo di 2-3 secondi (T_0), mentre il cut-off time ($T_{c.o.}$) è stato posto a 12 secondi per ridurre il rischio di danno tissutale.

In entrambi i giorni di test, gli animali sono stati testati sia 60 che 30 minuti prima della somministrazione delle sostanze per determinare il tempo di latenza di base (T_0), e successivamente 30 dopo la somministrazione sottocute di morfina.

Il tempo di latenza dell'animale è riportato come percentuale del massimo effetto possibile (MPE) calcolato come rapporto tra la differenza tra il tempo di latenza del test e il basale, diviso la differenza tra il cut off (12) e il basale.

L'effetto dell'estratto metanolico totale inerente alla tolleranza da morfina è stato semplificato graficamente (*Figura 29*).

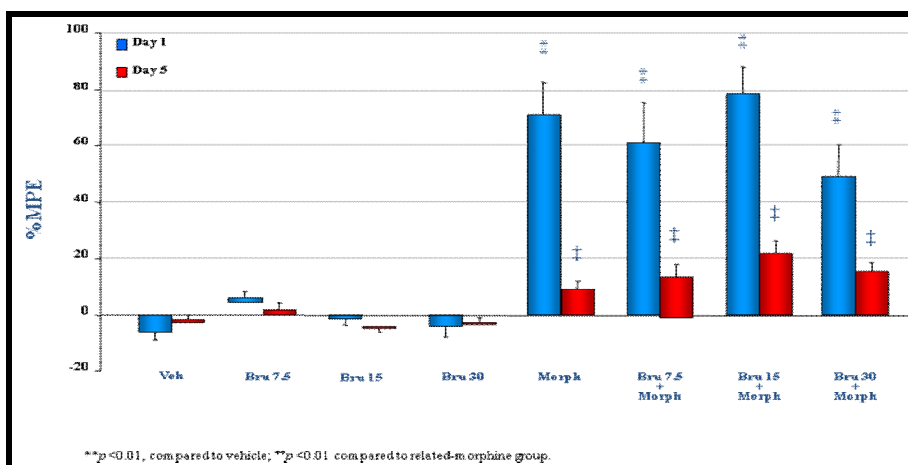
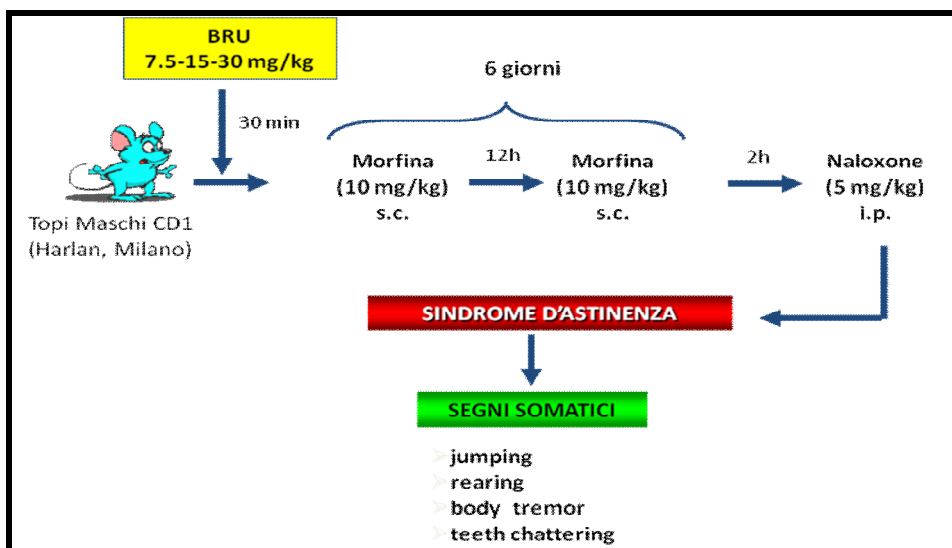


Figura 29. Effetto dell'estratto metabolico totale di *B. arborea* su.....

Acquisizione della Dipendenza da morfina in combinazione con estratto totale di *Brugmansia arborea*

È l'abitudine all'assunzione che porta alla necessità di un uso continuativo; viene distinta in fisica (astinenza da brusca sospensione del farmaco) e psicologica (desiderio fortissimo degli effetti psicologici indotti dal farmaco). In questo test è stata valutata principalmente la dipendenza fisica da morfina, andando a valutare i principali segni somatici di astinenza insorti negli animali resi dipendenti.

A tale scopo topi maschi CD-1 hanno ricevuto per via sottocutanea somministrazioni ripetute di morfina (10mg/kg, s.c.), 2 volte al giorno per 6 giorni consecutivi. Trenta minuti prima di ciascuna somministrazione di morfina, i topi hanno ricevuto per via i. p. l'estratto di *B. arborea* alle dosi di 7.5, 15, 30 mg/kg.



La dipendenza è stata determinata mediante la valutazione dei principali segni somatici precipitati in seguito a somministrazione dell'antagonista oppioide naloxone (5 mg/kg, ip):

- Jumping (*Figura 30*)
- Tremors (*Figura 31*)
- Rearing (*Figura 32*)
- Teeth chattering (*Figura 33*)

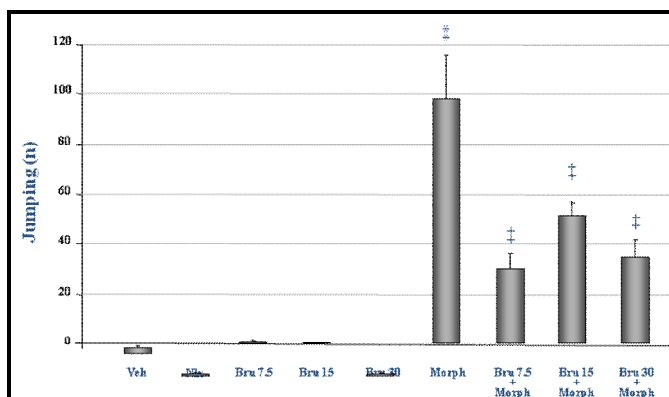


Figura 30. Jumping indotto da estratto metanolico di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

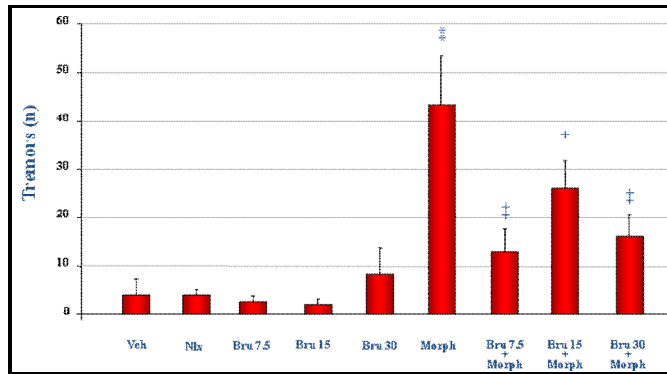


Figura31. Tremors indotto da estratto metanolico di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

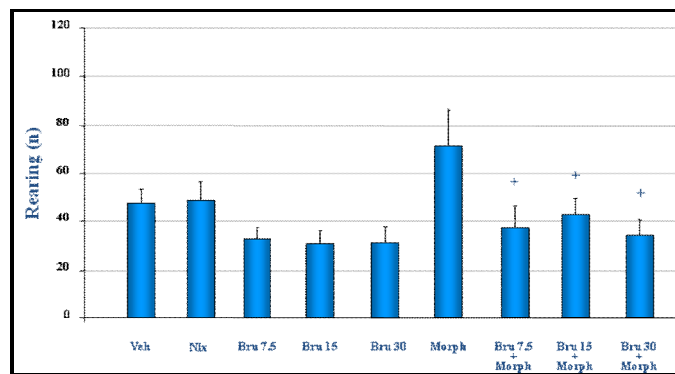


Figura32. Rearing indotto da estratto metanolico di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

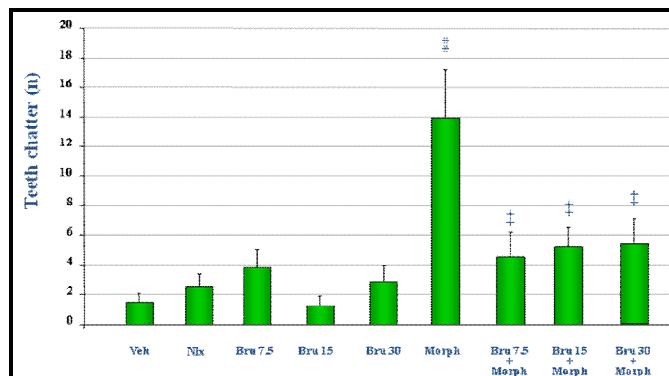


Figura33. Teeth chatter indotto da estratto metanolico di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

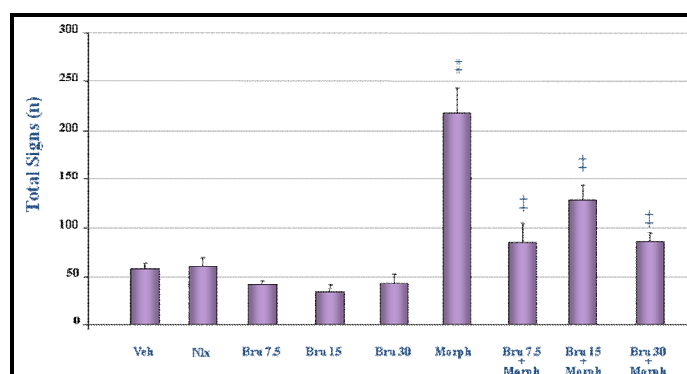


Figura 34. Total signs indotto da estratto metanolico di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

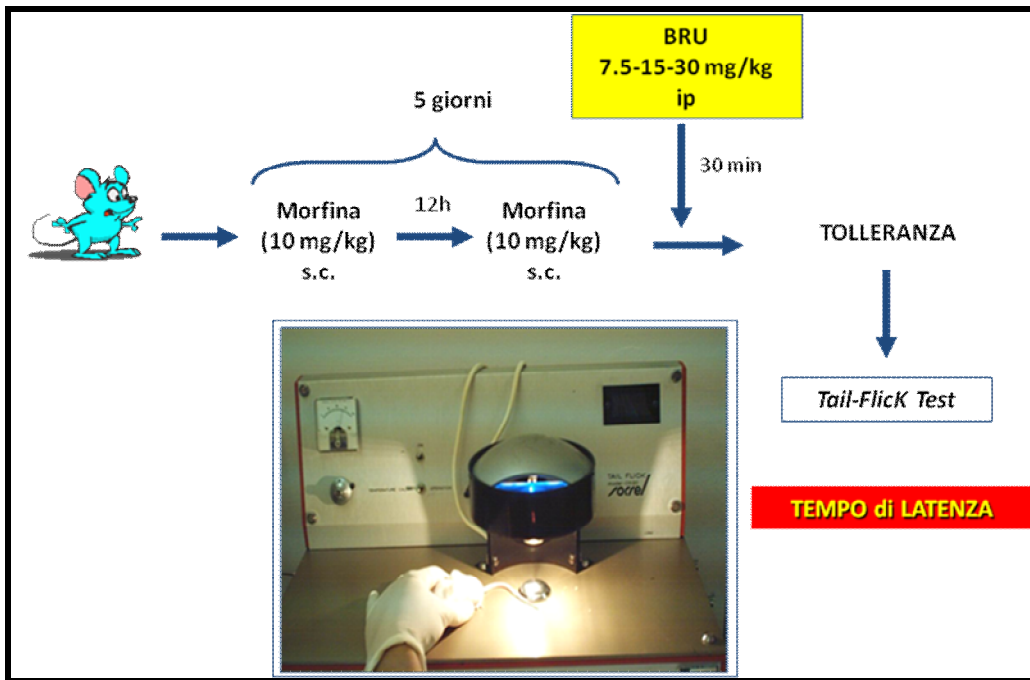
Il total signs è considerato come media della somma dei dati di jumping, rearing, tremors e teeth chatter.

Alla fine di questo primo studio è stato rilevato che:

Estratto di *B. arborea* 7,5mg/Kg i.p. + morfina 10mg/Kg s.c. risponde al meglio. Al 7° giorno inibisce la perdita di peso da morfina. All'induzione di dipendenza: abbassa la crisi di astinenza. Estratto di *B. arborea* 30 mg/Kg i.p. + morfina 10mg/Kg s.c. riduce la tolleranza in valore assoluto anche se non sembra applicabile clinicamente.

Espressione della tolleranza

Si è passati poi ad un secondo studio in cui è stato testato l'effetto dell'estratto totale di *B. arborea* sull'espressione di tolleranza e dipendenza da morfina (in pratica un esperimento in acuto), diversamente dal precedente lavoro in cui abbiamo valutato l'effetto di *B. arborea* sullo sviluppo di tolleranza e dipendenza (esperimento in cronico).



La metodologia sperimentale è la stessa applicata negli studi precedenti.

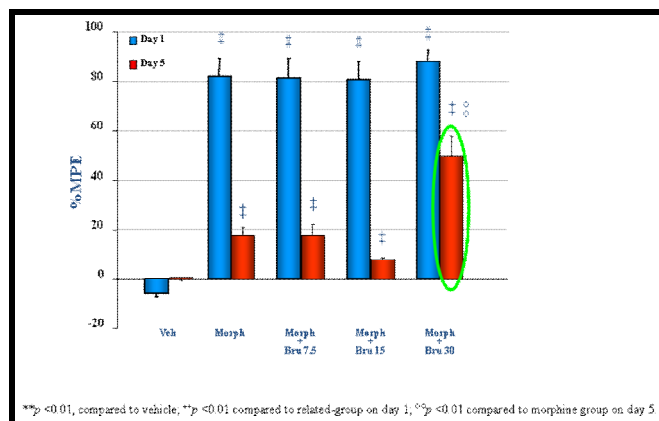


Figura35. Effetto dell'estratto metanolico totale di *B. arborea* sull'espressione della tolleranza

Espressione della dipendenza

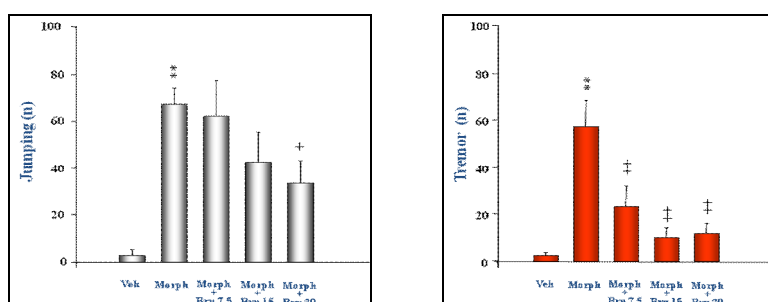
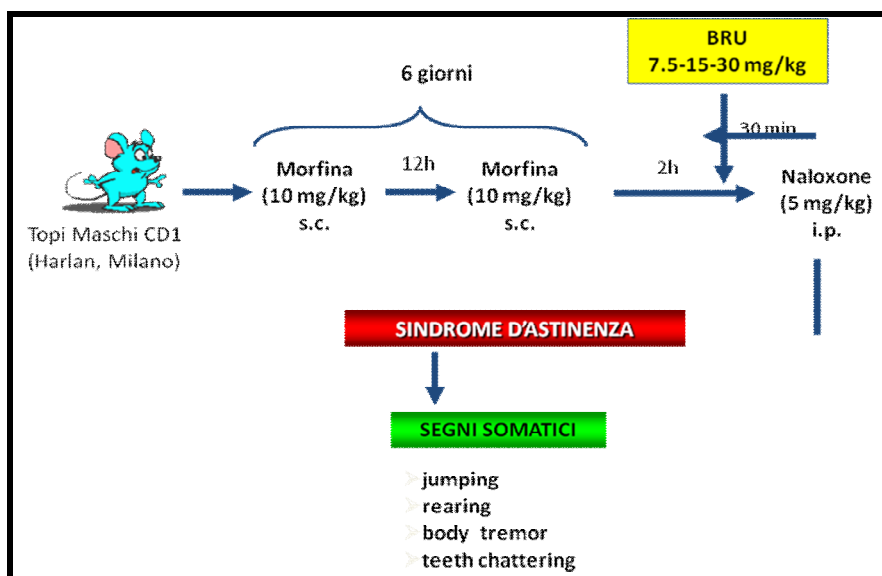


Figura36. Jumping e tremor indotto da estratto intero di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

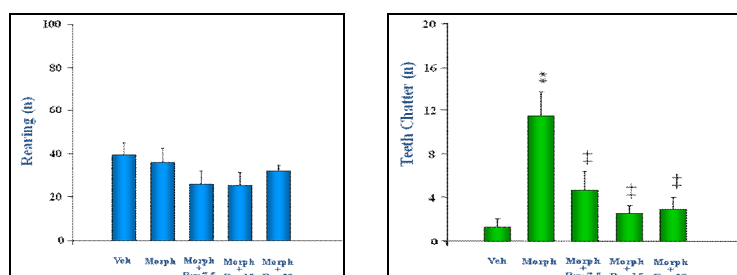


Figura 37. Rearing e teeth chatter indotto da estratto intero di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

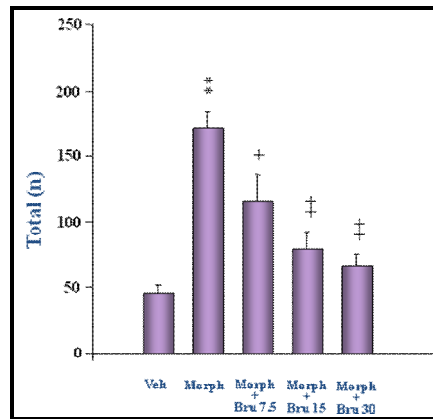


Figura38. Total sings indotti da estratto intero di *B. arborea* alle dosi di 7,5; 15, 30 mg/Kg

La *Figura 38* mostra l'attività dose dipendente della frazione purificata contenente i soli alcaloidi estratti da *B. arborea*. La figura mostra come i segni utilizzati per registrare la sindrome di astinenza indotta da naloxone vengano abbattuti dalla somministrazione della frazione alcaloidea contenuta in *B. arborea*. La risposta è dose-dipendente. Questa seconda analisi ha rivelato che la frazione di 30 mg /kg è attiva sull'espressione della dipendenza e della tolleranza da morfina.

Valutazione dell'acquisizione e dell'espressione di tolleranza e dipendenza su estratti purificati di *Brugmansia arborea* denominati FA (frazione alcaloidea) ed FNA (frazione non alcaloidea)

Considerando i risultati ottenuti sullo sviluppo di tolleranza e dipendenza (esperimento in cronico), è stato valutato se l'effetto potesse dipendere dalla frazione alcaloidea che è quella presente in maggior concentrazione nell'estratto.

Pertanto è stato valutato l'effetto della frazione alcaloidea 2, 3 e 4 (ottenuta dalla separazione su colonna Sephadex LH 20 precedentemente descritto) sullo sviluppo di tolleranza e dipendenza (esperimento in cronico) da morfina. La dose impiegata pari a 1.386 mg/kg è stata estrapolata dalla concentrazione di 7.5 mg/kg di *B. arborea* che nel test precedente si era dimostrata essere la più efficace. I risultati

evidenziano una leggera capacità della frazione alcaloidea (FA) di ridurre l'espressione della tolleranza e della dipendenza.

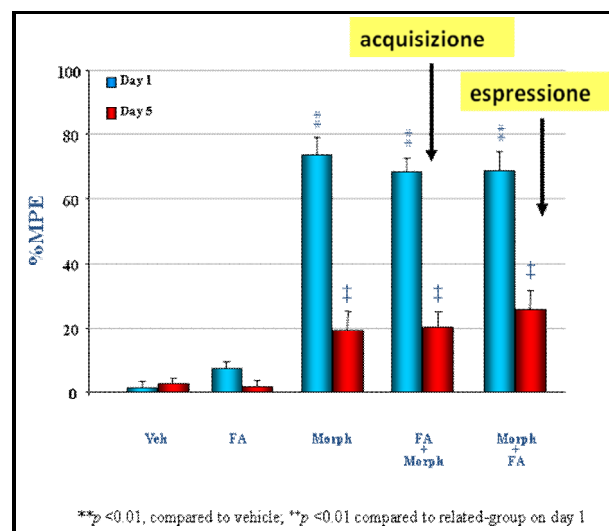
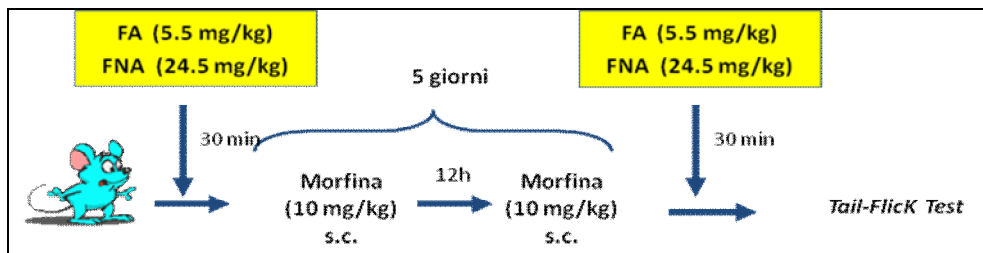


Figura 39. Effetto della frazione alcaloidea di *B. arborea* (FA) sull'acquisizione ed espressione della tolleranza da morfina

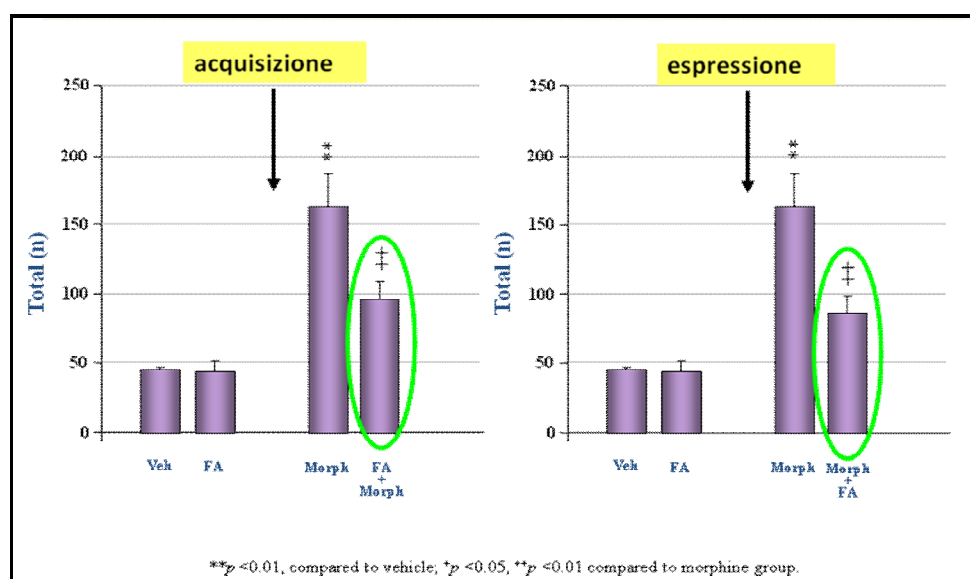
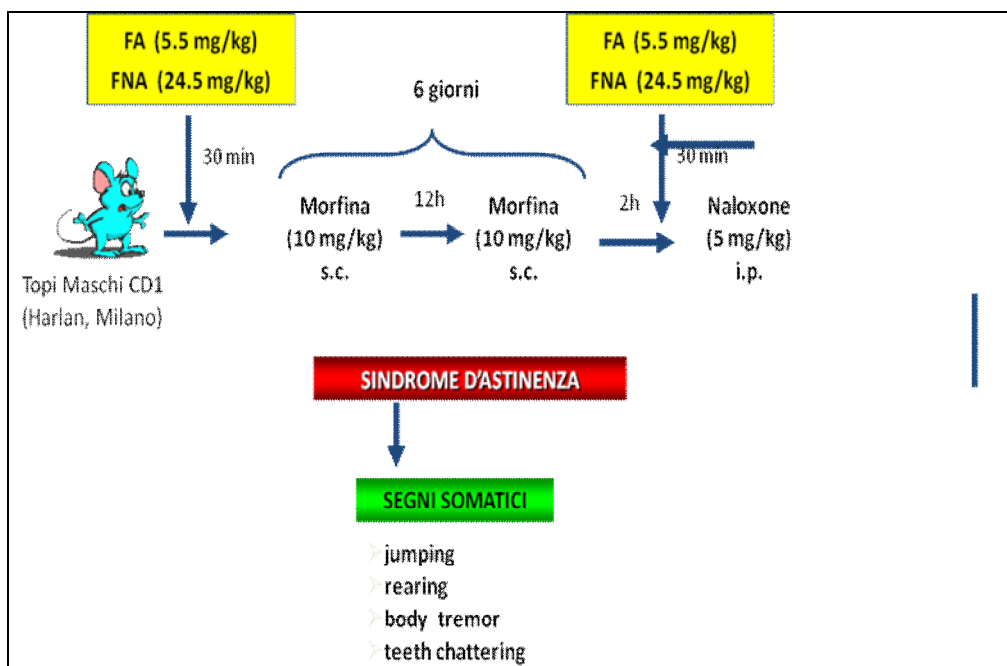


Figura 40. Effetto della frazione alcaloide di *B. arborea* (FA) sullo sviluppo dell'acquisizione ed espressione della dipendenza da morfina

L'entità della riduzione non è confrontabile con quella indotta dall'estratto 7,5. Si è pensato quindi che l'estratto in toto (BRU) fosse più efficace della singola frazione e il dosaggio impiegato troppo basso. Si è perciò proposto di saggiare un dosaggio maggiore di FA (paragonabile alla dose 30 di *B.*

arborea) soprattutto per escludere che non ci siano altre sostanze che contribuiscono all'effetto.

Dal momento che l'esperienza precedente ha assicurato così come riportato in letteratura è stato condotto uno studio sulla frazione non alcaloide operando nelle medesime condizioni. I risultati di quest'ultima esperienza confermano che la frazione non alcaloide è priva di attività.

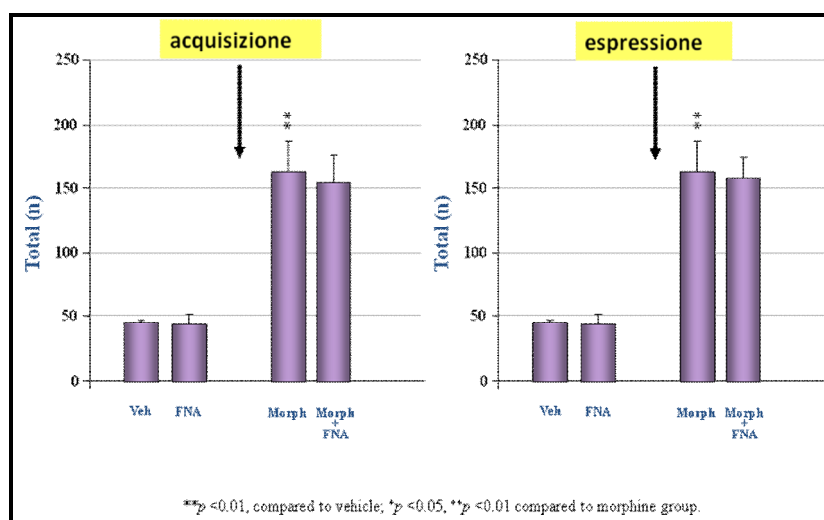


Figura41. Effetti della frazione alcaloide e non alcaloide di *B. arborea* sull'espressione e acquisizione della dipendenza da morfina

Singoli alcaloidi

Il procedimento successivo è stato indirizzato a definire se i singoli alcaloidi avessero una attività maggiore del complesso. Di conseguenza essi sono stati purificati attraverso HPLC e saggiati ad un dosaggio corrispondente alla loro presenza negli estratti.

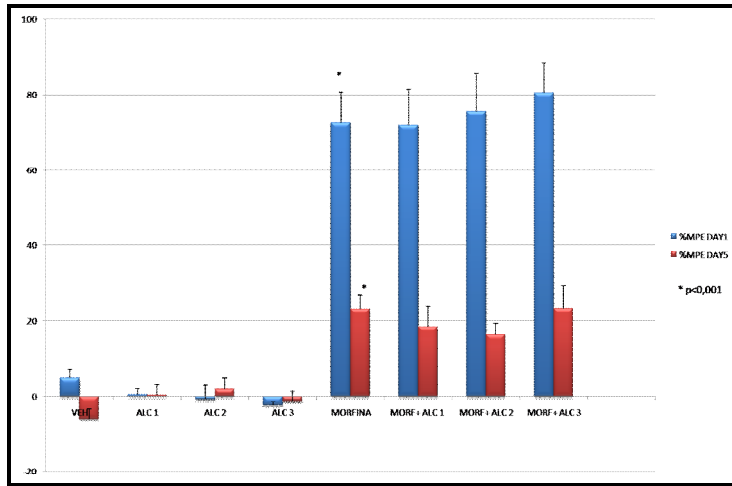


Figura42. Alcaloidi 1-3 da *B. Arborea* saggiati sull'espressione della tolleranza

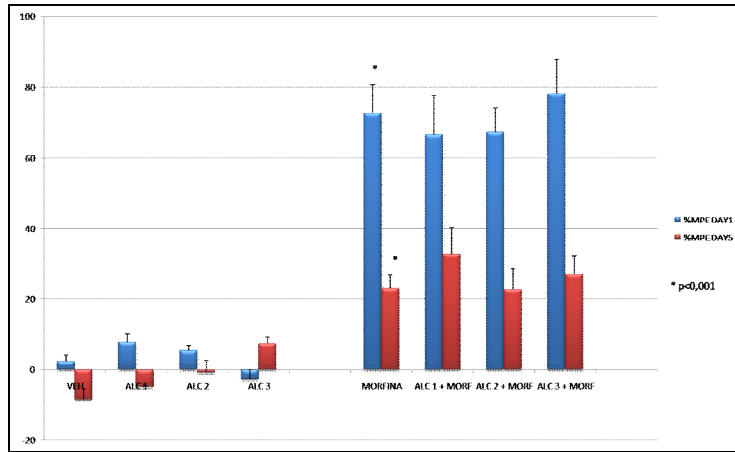


Figura 43. Alcaloidi 1-3 da *B. Arborea* saggiati sull'acquisizione della tolleranza

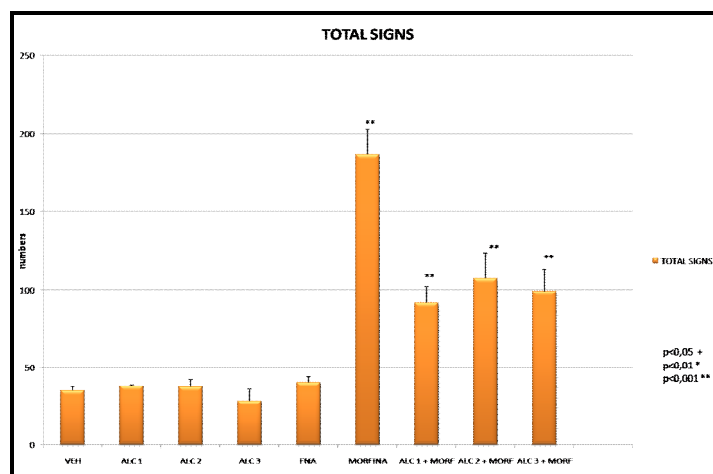


Figura 44. Acquisizione della dipendenza degli alcaloidi 1-3 da *B. arborea*.

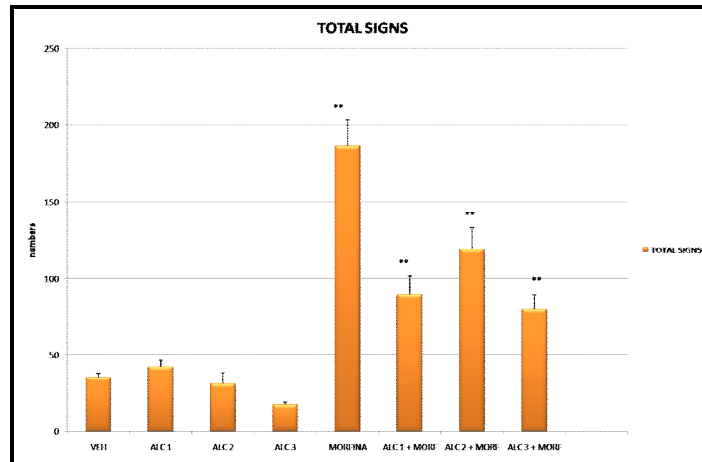


Figura45. Total signs. Espressione della dipendenza

Valutazione dei livelli dopaminergici

In seguito ai risultati ottenuti sulla capacità dei singoli alcaloidi utilizzati di ridurre sensibilmente espressione ed acquisizione della dipendenza, si è deciso di valutare se fossero visibili variazioni dei livelli dopaminergici al livello della corteccia prefrontale e all'interno dello striato. Gli animali appena terminato il test sono stati sacrificati per dislocazione cervicale in modo da ridurre al minimo lo stress. Le aree cerebrali interessate sono state prelevate ed immediatamente poste in congelatore ad una temperatura di -80 °C. La separazione è avvenuta secondo la seguente metodica:

L'analisi delle amine biologiche (dopamina) effettuata presso l'Università degli Studi di Chieti, Dipartimento di Scienze del Farmaco, è avvenuta secondo il seguente modello. Gli animali sono stati sacrificati per dislocazione al momento della conclusione del test di sindrome di astinenza indotta [Heffney et al.1982] La corteccia prefrontale ed lo striato vengono prelevati e posti in ghiaccio secco e conservati ad una temperatura di -80 °C. I campioni scongelati ed omogeneizzati con 200 µl di acido perclorico 0,1 N vengono centrifugati a 11000 r.p.m. per 25 minuti. Il surnatante viene prelevato ed analizzato tramite HPLC alle seguenti condizioni: flusso: 1ml/min a temperatura controllata di 22 °C. Le ammine biogene sono state separate attraverso colonna (0.5 µm, 12.5 cm, 4.6 cm; Agilent Zorbax High Pressure Cartige Guard-column), la fase mobile è costituita da acido acetico 0.10M, EDTA 0,70 mM, solfato di sodio 1,0 mM diluito in metanolo al 14%. Gli

analiti sono ossidati da un elettrodo di carbonio cristallizzato mantenuto a 330 mV e contrastato da un elettrodo di Argento/argento Cloruro.

Nella *Figura 46* viene mostrato il livello di dopamina rilevato all'interno del tessuto striato prelevato dagli animali utilizzati per lo studio sull'acquisizione della tolleranza. I tre alcaloidi saggiati dimostrano una differente attività a livello cerebrale. Gli alcaloidi 1 e 3 determinano un innalzamento dei valori basali di dopamina. Tali valori restano elevati in cosomministrazione con morfina. L'alcaloide numero due invece determina una ipoescrezione di dopamina si a livello basale che negli animali trattati anche con morfina.

Acquisizione nello striato

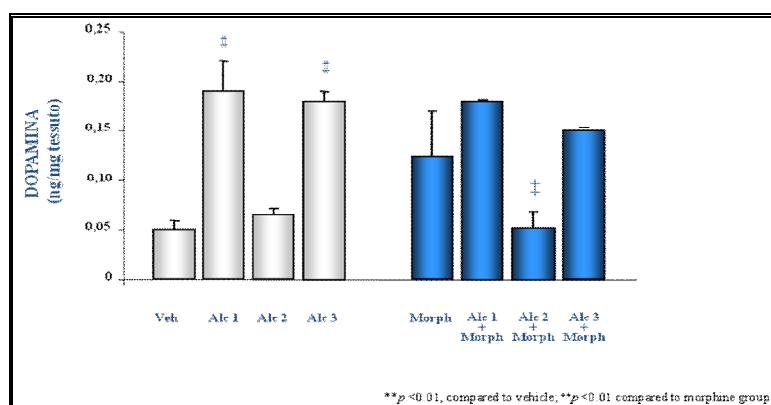


Figura46. livelli dopaminergici nello striato durante gli studi sull'acquisizione

Espressione nello striato

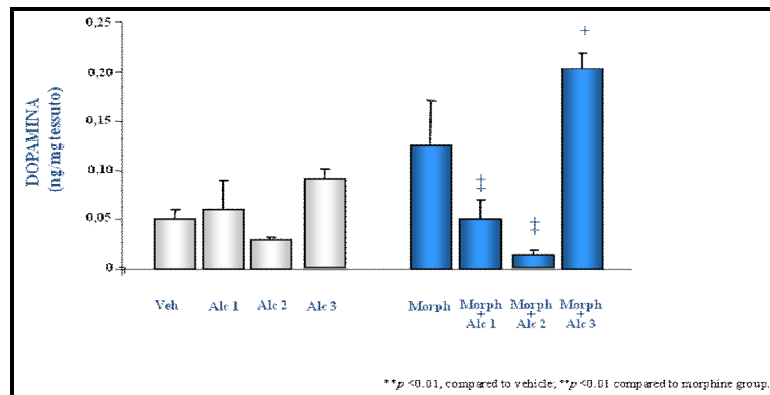


Figura47. livelli dopaminergici nello striato durante gli studi sull'espressione

Nella *Figura 47* sono visibili i livelli di dopamina rilevati nello striato degli animali CD1 utilizzati per studiare l'espressione della dipendenza da morfina. Il risultato evidenzia che gli alcaloidi 1 e 2 non alterano il valore basale di dopamina mentre l'alcaloide 3 determina una ipersecrezione di dopamina in co somministrazione con morfina.

Acquisizione nella PFC

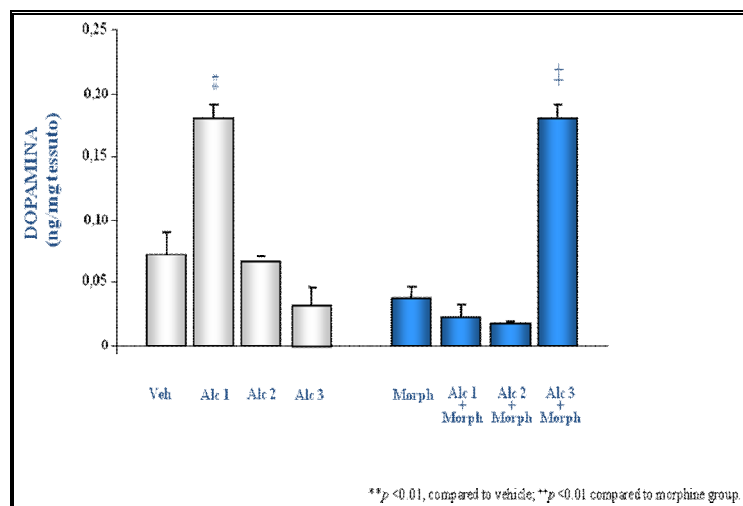


Figura48. Livelli dopaminergici nell'acquisizione nella Corteccia prefrontale

Nella *Figura 48* è mostrato come i valori di dopamina nella corteccia prefrontale vengano fortemente aumentati dalla somministrazione di dell'alcaloide 3 in presenza di morfina. Al contrario l'alcaloide 1 da solo determina una

ipersecrezione di dopamina da sola, valore che si abbatta totalmente in cosomministrazione con morfina. Espressione nella PFC

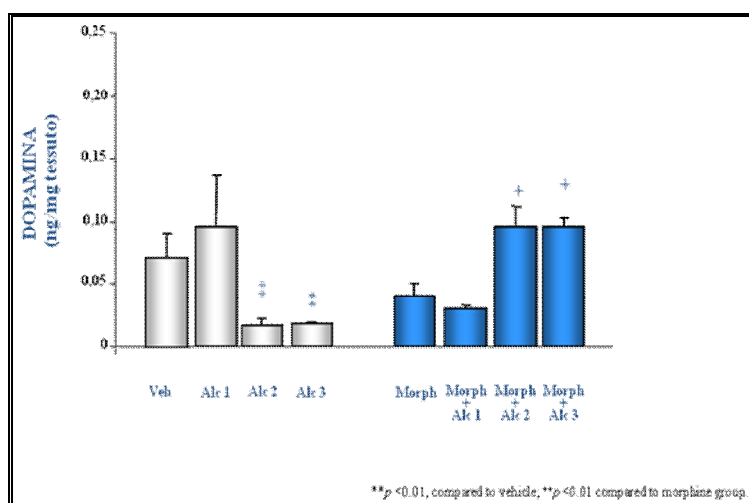


Figura 49. Livelli dopaminergici nell'espressione nella Corteccia prefrontale

Nella Figura 49 si vede come i valori di dopamina registrati dallo studio della corteccia prefrontale negli animali studiati per l'espressione siano riportati a valore di controllo in cosomministrazione di morfina con gli alcaloidi 1 e 2. Tali valori non risultano alterati quando gli alcaloidi sono somministrati da soli.

I risultati ottenuti dunque dimostrano che *B. arborea* agendo nello striato e nella corteccia prefrontale sono in grado di ridurre i segni e sintomi normalmente indotti dalla sindrome di astinenza. In particolare la frazione alcaloidea purificata è attiva in modo dose dipendente nello studio sulla dipendenza. I singoli alcaloidi sono meno attivi del complesso come spesso è rilevabile negli estratti di natura vegetale dove il sinergismo delle singole molecole sembra dare risultati migliori di quelli di un singolo composto. I dati relativi allo studio in aree cerebrali specifiche coinvolte nel meccanismo di gratificazione determinato dalla somministrazione da oppiacei dimostra che i singoli alcaloidi hanno una attività distinta fortemente in contrasto tra di loro nella escrezione di dopamina sia quando somministrati da soli, sia in cosomministrazione con morfina. Dunque è desumibile che tali alcaloidi potrebbero essere utilizzati in modo selettivo in quelle patologie che determinano una riduzione della produzione di dopamina.

In considerazione della capacità rilevata di attivare una risposta dopaminergica e di ridurre i sintomi da sindrome di astinenza da oppiacei di *B. arborea* si è deciso di

valutare la sua capacità di ridurre l'attività motoria da solo e comparato con con morfina in activity cage per verificare il rapporto dose effetto su tale attività.

Tali saggi biologici sono stati effettuati presso Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia

Nella realizzazione di questo studio sono stati utilizzati 397 topi albin bianchi del ceppo CD-1 acquistati presso Charles River (Barcellona, Spagna); 315 sono stati utilizzati come soggetti sperimentali e i restanti come standard. Gli animali adulti di peso variabile tra i 30-35 grammi al loro arrivo sono stati stabulati in gabbie di plastica (28x28x14,5 cm) in gruppi di 4.

Le condizioni ambientali del laboratorio sono state permanentemente controllate: temperatura costante 21 °C, ciclo giorno/notte 12/12 ore. gli animali hanno ricevuto acqua e cibo *ad libitum*, sono stati alimentati ed idratati anche durante l'attività motoria. La pulizia delle gabbie è stata realizzata una volta a settimana.

Il procedimento di trattamento e di custodia degli animali è stato realizzato secondo le normative vigenti dettate dalla comunità internazionale descritte in European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 de noviembre de 1986).

Gli animali sono trattati per via intraperitoneale (i.p.) con differenti dosi di Morfina Cloridrato (Laboratori Sigma-Aldrich, Spagna) e Cocaina Cloridrato (Laboratori Alcaliber, Madrid). Le dosi somministrate sono state proporzionali al peso dell'animale in un volume di 0,01 mg/ml e solubilizzate in soluzione salina fisiologica (NaCl 0,9%). Gli animali di controllo sono stati trattati con la sola soluzione salina.

Gli animali adulti dopo un periodo di adattamento di 7 giorni ricevono soluzione salina (M0), 60, 30 15, 7,5 mg/Kg di estratto metanolico di *B. arborea* in combinazione con una dose di cocaina di 25 mg/Kg. Le prove comportamentali sono state effettuate dopo 25 minuti dopo il trattamento, tranne che per l'attività motoria, che è stata registrata subito dopo la somministrazione del farmaco.

Il primo test effettuato sull'estratto totale di *Brugmansia arborea* ha avuto lo scopo quello di definire se la sostanza influenza l'attività motoria degli animali rispettivamente ad un trattato con sola soluzione salina.

L'esperimento viene effettuato con lo scopo di sapere quale effetto produce l'estratto sull'animale e quando si hanno i picchi di attività nell'arco delle 24 ore. Questo consente di progettare lo studio in co-somministrazione con altri farmaci (nel nostro caso morfina e cocaina) stabilendo quanto tempo, prima o dopo, vada somministrata l'estratto di brugmansia, così da potere verificare l'efficacia o meno del prodotto.

Gli animali trattati con morfina e cocaina normalmente sono in uno stato di iperattività. Il trattamento con morfina induce iperattività per 2 ore circa, la cocaina nei primi 30 minuti, abbiamo registrato i dati su tabelle in intervalli di 1 minuto, raccolti poi in media ogni 10 minuti.

Per verificare poi se la pianta avesse attività protratta nelle 24 ore abbiamo deciso di registrare la media dei movimenti in ogni ora e nell'arco delle 24 ore.

Di seguito sono riportati i grafici di attività degli animali ogni dieci minuti dopo trattamento con estratto totale di *Brugmansia arborea*, registrati per 2 ore. (Figura50)

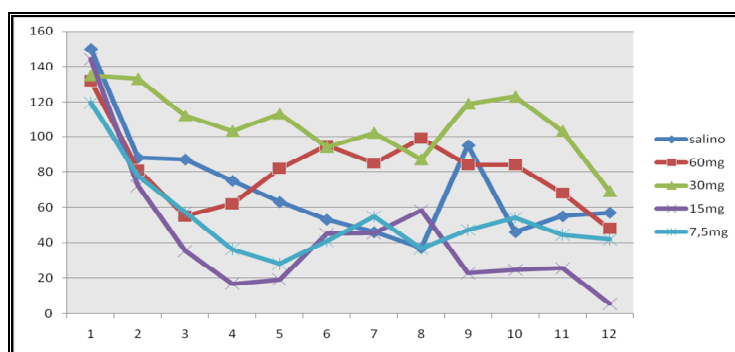


Figura 50. attività locomotoria dopo somministrazione di estrattodi *B. arborea* in 120 minuti

L'estratto in concentrazioni differenti ha efficacia differente. In tutti i casi determina iperattività degli animali. Come già previsto il dosaggio di 30 mg/Kg ha una migliore relazione dose/effetto.

Di seguito vediamo invece l'attività registrata nell'arco delle 24 ore con cadenza ora per ora (*Figura 51*)

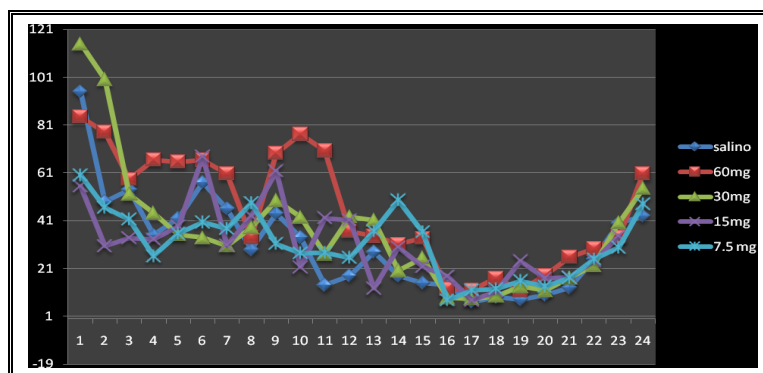


Figura51. Attività locomotoria registrata per 24 ore dopo trattamento con estratto intero di *B. arborea*.

Nell'arco delle 24 ore sappiamo che l'estratto di *B. arborea* ha nelle prime 16 ore e che esistono due picchi di attività il primo dopo circa 2 ore dalla somministrazione, il secondo dopo circa 8 ore. I dosaggi di interesse sono quello di 30mg/Kg e 60 mg/Kg che determinano una risposta dose dipendente dell'attività locomotoria.

Il passo successivo è quello di effettuare la co-somministrazione con morfina per conoscere l'effetto che può avere sulla iperattività da morfina (*Figura 52*).

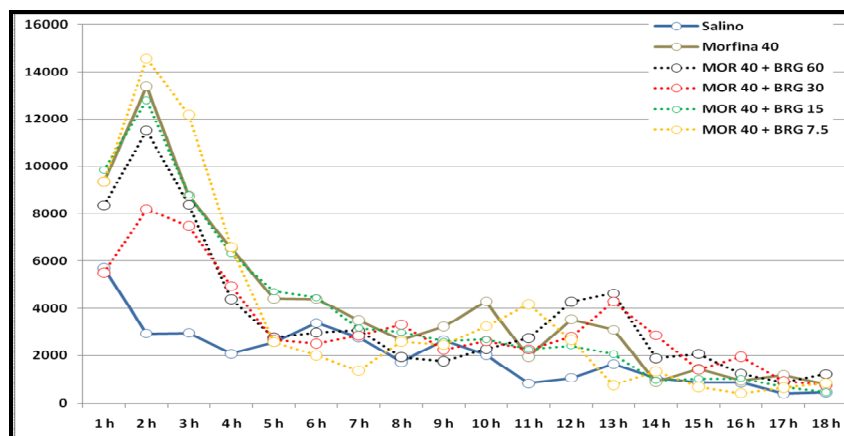


Figura52. Registrazione dell'attività locomotoria nelle 24 ore dopo cosomministrazione di *B. arborea* e morfina

L'importanza di questi dati risiede nel fatto che, avendo la morfina attività dopo circa una ora dalla somministrazione, e che si protrae per diverse ore, sappiamo che per potere vedere l'effetto in combinazione con morfina dobbiamo somministrarli contemporaneamente seppure in distretti differenziati dell'animale

Si è deciso inoltre di effettuare lo studio dell'attività locomotoria in cosomministrazione con cocaina (Figura 53).

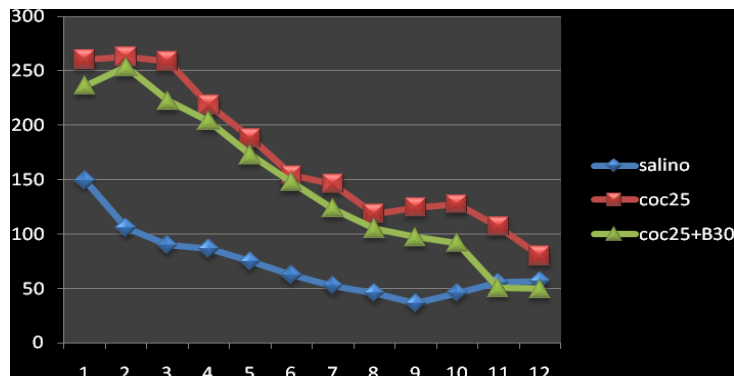


Figura53. Grafico dell'attività locomotoria indotta da cocaina nei primi 120 minuti

I risultati dimostrano nell'arco dei primi 120 minuti non si ha riduzione dell'attività locomotoria in seguito a trattamento con l'estratto di *B. arborea* contemporaneamente alla somministrazione di cocaina a 25 mg/kg.

La brugmansia viene somministrata una ora prima della cocaina. Questo trattamento precedente alla somministrazione di cocaina serve a far si che i picchi di attività delle due sostanze coincidano. Nel primo grafico è visibile l'attività nei primi 120 minuti misurata ogni 10 minuti (Figura54).

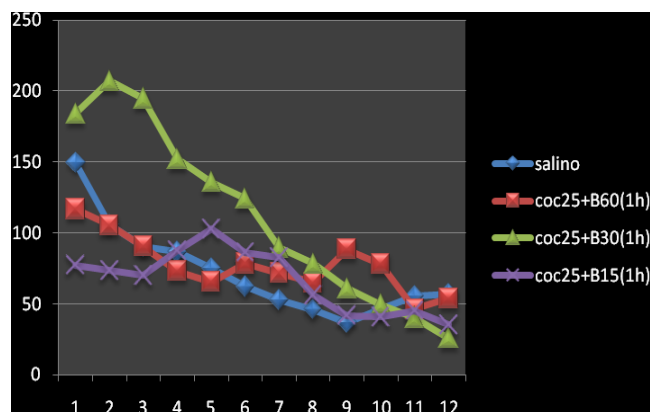


Figura 54. Grafico di attività locomotoria registrato nei primi 120 minuti dopo cosomministrazione di cocaina ed estratto intero di *B. arborea*

Dalla figura 54 è visibile come la iperattività indotta da cocaina venga riportata al valore del solo salino quando viene somministrato ad un dosaggio di 60 mg/kg una ora prima della somministrazione di cocaina.

Somministrazione di brugmansia una ora prima del trattamento con cocaina in 24 ore registrata ogni ora. (Figura 55).

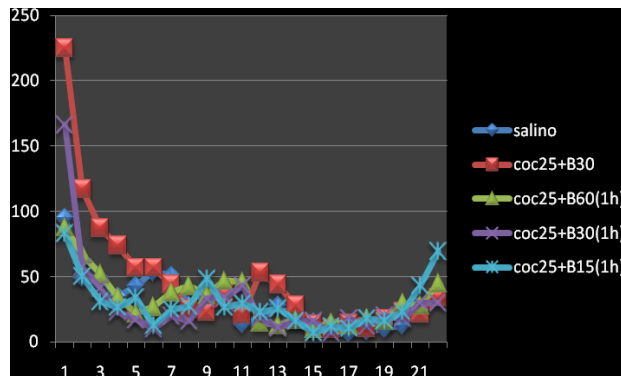


Figura 55. Registrazione dell'attività locomotoria con Cocaina e Brug. A diverse concentrazioni 1H prima.

Come desumibile dalla *Figura 54* l'iperattività indotta da cocaina nelle 24 ore viene riportata ai valori di controllo quando l'estratto di B. Arborea viene somministrato ad un dosaggio di 60 mg/Kg una ora prima del trattamento con cocaina a 25 mg/Kg.

CPL (Elezione del luogo preferito)

La CPL è un modello animale utilizzato per lo studio delle proprietà di dipendenza delle droghe. Questo procedimento si basa sull'associazione degli stimoli ambientali neutri associati alla droga. Risulta nell'acquisizione di una preferenza per i luoghi legati ad uno stimolo specifico (secondari o rafforzamento condizionato). Con l'uso di questo modello animale si osserva che la morfina produce preferenza di luogo nei topi (Bilsky & Reid, 1991; Bilsky et al., 1990, 1991; 1998; Schechter, 1991; Marona-Lewicka et al., 1996; Meyer et al., 2002; Cole et al., 2003; Braida et al., 2005; Herzig et al., 2005).

CPL Brugmansia arborea e morfina (fig.55)

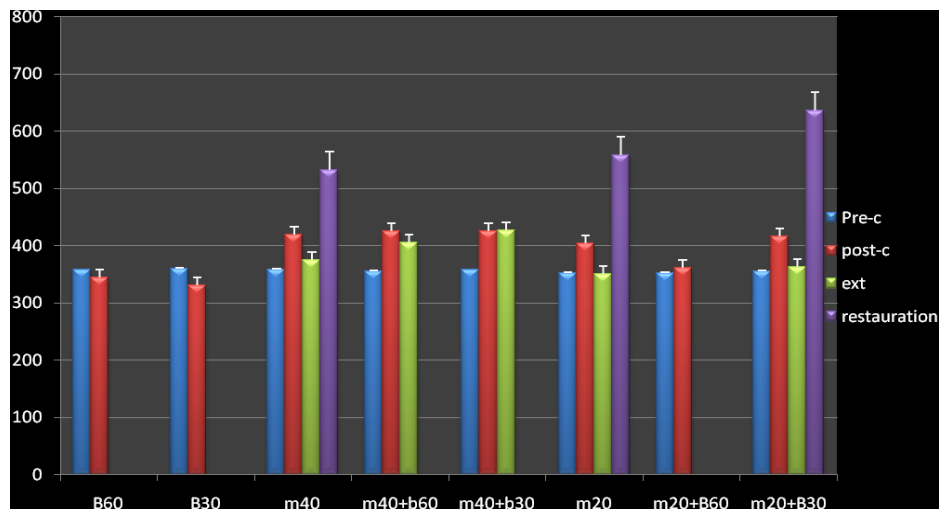


Figura 55. Cpl Brugmansia e morfina

La figura 55 mostra i tempi medi di stazionamento degli animali trattati nelle gabbie dove subiscono il trattamento. Come visibile gli animali che vengono trattati con la sola morfina permangono a lungo nelle gabbie in cui ricevono la morfina e la loro dipendenza da questi luoghi permane per molti giorni, oltre trenta, quando questi valori sembrano estinguersi è sufficiente una dose di morfina pari alla metà di quella che ha indotto la dipendenza per determinare una ricaduta. Gli animali trattati con sola *B. arborea* non mostrano una preferenza di luogo. Gli animali trattati con morfina 40mg/Kg e *B. arborea* restano ancora fortemente legati all'effetto della morfina. Gli animali invece trattati con la morfina a 20 mg/kg e Brugmansia 60 mg/Kg sembrano non subire condizionamenti, questo risultato dimostra la capacità dell'estratto di *B. arborea* ad un dosaggio di 60 mg/Kg di bloccare l'effetto di piacere indotto da morfina a 20 mg/Kg.

Cpl brugmansia e cocaina(Figura.56).

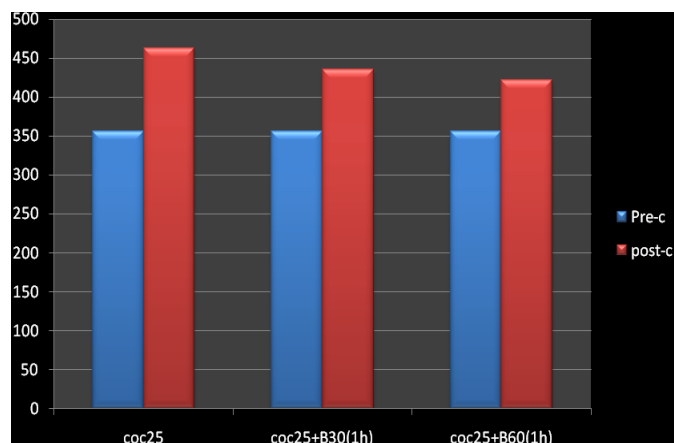


Figura 56. Cpl brugmansia e Cocaina

L'estratto metanolico intero di *B.arborea* non è in grado di ridurre la preferenza indotta da cocaina a 25 mg/Kg. Dunque non può essere ipotizzato l'utilizzo di tale specie vegetale per il divezzamento da cocaina.

DISCUSSIONE:

I Risultati ottenuti dimostrano che l'estratto metanolico intero di *B. arborea* risulta attivo per lo studio della dipendenza da oppiacei. La frazione alcaloidea (FA) è in grado di ridurre sia l'espressione che l'acquisizione della dipendenza da morfina con la stessa efficacia dell'estratto totale. La frazione non alcaloidea (FNA) è risultata inefficace nel modificare sia la tolleranza che la dipendenza da morfina. I Singoli alcaloidi pur conservando una buona attività sono meno attivi del complesso alcaloideo. Il dosaggio della dopamina nelle aree cerebrali descritte dimostra possibili applicazioni farmacologiche differenti dei singoli alcaloidi sia in ambito di divezzamento da oppiacei sia nella possibile applicazione come antiparkinsoniano. Gli studi comportamentali effettuati sulle frazioni metanoliche intere dimostrano la capacità di influenzare l'attività motoria in modo dose-dipendente. I picchi di attività ripetuti nell'arco delle 24 ore hanno il massimo della loro efficacia dopo 1 ora dalla somministrazione per via intraperitoneale. Gli studi di CPL dimostrano che *b. arborea* somministrato a dosaggi di 60 mg/Kg prevengono la dipendenza data da morfina somministrata a 20 mg/Kg. Lo studio dimostra che è possibile utilizzare gli estratti interi o la frazione alcaloidea complessa per determinare una disaffezione dalla morfina.

Ipomea violacea L.



Figura 57. fiori di *Ipomea*

Descrizione botanica

Ipomea violacea L. appartiene alla famiglia delle Convolvulaceae. Il luogo di origine di questa specie è la regione del Centro e Sud America. Questa famiglia include circa 1100 specie distribuite prevalentemente nelle regioni tropicali. Si tratta di piante erbacee, raramente legnose, con fusti spesso volubili.

L'apparato vegetativo è caratterizzato da foglie semplici intere o lobate, spiralate e senza stipole. I fiori sono ermafroditi, attinomorfi, formati da un calice pentamero con i sepali saldati solo alla base, corolla di 5 petali completamente saldati, androceo di 5 stami alternipetali inseriti alla base degli elementi corollini, ovario bicarpellare, supero, sormontato da un unico stilo bilobo. I generi più conosciuti sono *Convolvulus* e *Ipomoea* (Figura 57).

Ipomoea violacea è una pianta perenne, rampicante e glabra. La lamina fogliare può essere circolare o ovale, cordata alla base; possiede foglie con lobi arrotondati o raramente angolari; acuminate all'apice; punte delle foglie mucronate; 7-8 coppie di venature laterali. Presenta infiorescenze; il peduncolo è ispessito e clavato. I fiori

sono imbutiformi, notturni, con sepali circolari, scarsamente coriacei. L'apice è ottuso o emarginato, mucronato e riflesso. Corolla bianca con stami inclusi; filamenti inseriti nel tubo corollino. Pistillo incluso; ovario glabro, stigma bilobato. Il frutto è una capsula di colore marrone chiaro, il seme è nero, tomentoso.

Usi tradizionali

Tradizionalmente usato nella divinazione. A Oaxaca, nel sud del Messico i semi di questa pianta sono considerati come uno dei principali allucinogeni per l'uso nella divinazione e per i rituali magico-religiosi.

I semi di *Ipomea violacea* possono dare un'esperienza tranquilla, sognante e "visionario", una mente chiara e una maggiore sensibilità alla luce e suoni. I semi di alcune varietà contengono LSA (amide dell'acido D-lisergico) e può causare effetti visivi e percettivi simili all'LSD. Ci sono molti tipi di semi di morning glory. Heavenly Blue, e Flying Saucers sono i semi più popolari. Dato che l'uso è orale, vengono consumati dopo i tradizionalmente lontano dai pasti, dopo circa 4-6 ore. La comparsa degli effetti avviene di circa un'ora dopo l'ingestione e può cominciare molto prima che gli effetti totali vengano raggiunti. L'effetto può protrarsi anche per 6-10 ore a seconda del quantitativo assunto. Gli effetti vengono distinti a seconda del numero di semi che vengono assunti. Si parla di visione di luci colorate con l'assunzione di 2-3 semi. Gli effetti sembrano essere molto più gravi e protratti nel tempo con i dosaggi considerati da forti a pesanti con l'assunzione di 6-10 grammi degli stessi.

Studi precedenti

Gli studi effettuati sulla composizione chimica e sull'attività di *Ipomea violacea* non sono molti e dunque questo è uno dei motivi per i quali tale specie ha suscitato il nostro interesse.

L'ergina è l'alcaloide presente in elevata quantità all'interno dei semi della pianta. Secondo bibliografia sono presenti altresì altri alcaloidi, quali l'isoergina, che presenta un'attività molto inferiore al suo epimero, la cianoclavina, il lisergolo e l'ergometrina :[Der Marderosian ;1967]

Sono tutti alcaloidi indolici che agiscono sul Sistema Nervoso Centrale e sulla muscolatura liscia (*Figura 58*)

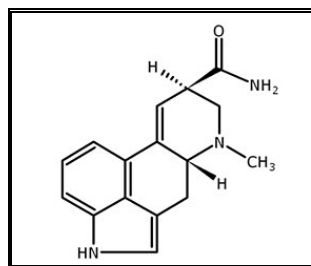


Figura58. Acido lisergico

Weber nel 1976 ha identificato tramite cromatografia su strato sottile i seguenti alcaloidi presenti nelle foglie della pianta in esame: lisergamide, isolisergamide, ergonovina, ergometrina, isoclavina, agroclavina, elimoclavina in seguito caratterizzati tramite spettrometria di massa La presenza degli alcaloidi in esame può subire delle variazioni percentuali dovuti a caratteristiche intrinseche alla pianta stessa, variando tra lo 0,005% e lo 0,0079 in peso fresco [Der Marderosian & Yougken, 1966].

Risultati

La pianta è stata sottoposta ad essiccamento per circa 20 giorni. Il procedimento di estrazione ha visto la macerazione della pianta stessa in solventi a polarità crescente. Sono stati effettuati 8 cicli di estrazione in metanolo; dopo essere stata confermata la presenza di alcaloidi, mediante cromatografia su strato sottile (TLC). La separazione è stata eseguita tramite dibattimento acqua e butanolo per mezzo di un imbuto separatore.

La separazione della miscela alcaloidea è stata effettuata tramite HPLC (*Figura 59*).

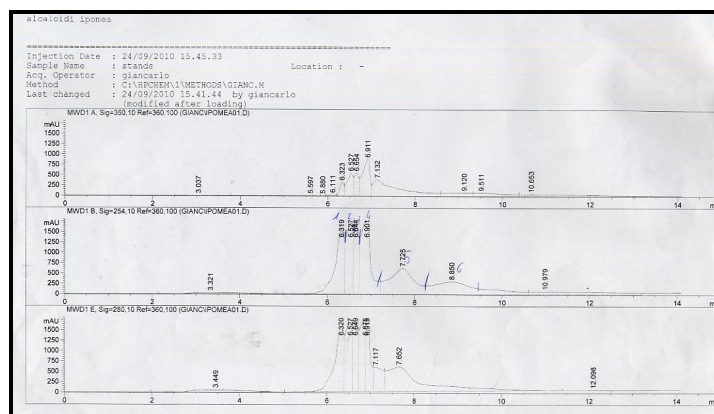


Figura 59. HPLC estratto metabolico Ipomea

L'interpretazione degli spettri ha portato alla identificazione di swainsonina e lisergolo.

La swainsonina (Figura 60) è un alcaloide indolizिनico. E' un potente inibitore delle α -mannosidasi II, enzima coinvolto nella glicosilazione delle glicoproteine. E' un immunomodulatore. Ha un azione antitumorale nel trattamento di glioma [Sun et al., 2009] e carcinoma gastrico [Sun et al., 2007].

In *Swainsona canescens* è stata riscontrata per la prima volta la presenza di questo alcaloide, responsabile del locoismo animale [Panter et al., 1999]. Insieme al suo derivato N-ossido, è presente anche in *Astragalus lentiginosus*, "erba pazza" dei pascoli dello stato nordamericano dello Utah [Stegelmeier et al., 1995]. La presenza di quest'alcaloide in *Ipomea violacea* è confermata in letteratura [Schimming et al., 2005].

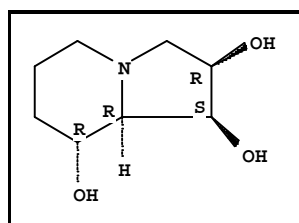


Figura60. Swainsonina

Il lisergolo (*fig. 61*) è un alcaloide indolico di tipo Ergot presente in varie specie appartenenti alla famiglia delle Convolvulaceae e in molte specie di funghi.

Studi su ratti hanno dimostrato l'antagonismo di questo composto sui recettori 5-HT₂ della serotonina [Pertz & Eich, 1992]. Inoltre, somministrato con la rifampicina, comporta una riduzione del dosaggio di questo antibiotico e un aumento della sua efficacia [Khanuja *et al.*, 2003].

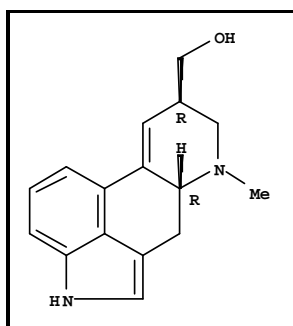


Figura 61. Lisergolo

Dopo il processo di caratterizzazione chimica si è deciso di valutare *in vivo* presso i laboratori del Prof. Minarro l'attività dell'estratto metanolico totale per determinarne la capacità di influenzare l'attività locomotoria (*Figure 62-63*).

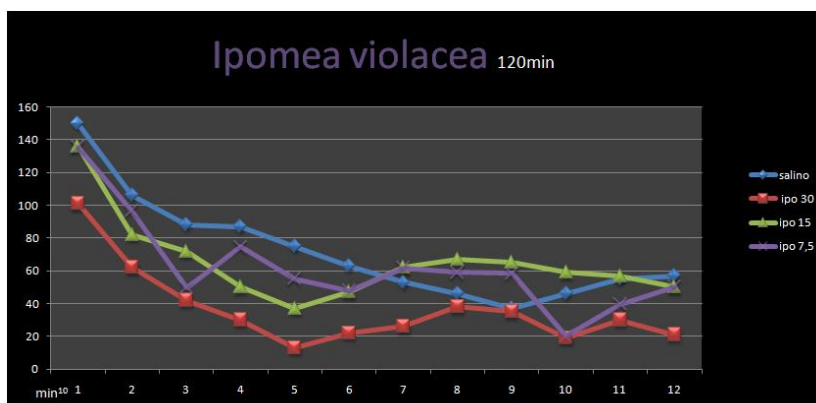


Figura 62. Grafico dell'attività locomotoria nei primi 120 minuti eseguita su topi CD1. In seguito a somministrazione di estratto totale di *Ipomea violacea*.

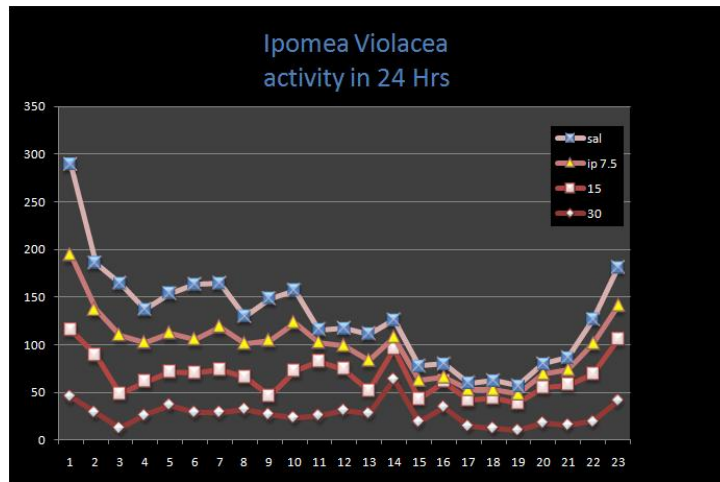


Figura 63. Grafico dell'attività locomotoria in 24 ore eseguita su topi CD1. In seguito a somministrazione di estratto totale di Ipomea violacea.

Discussione

Lo studio dei metaboliti secondari di *Ipomea violacea* hanno dimostrato una riduzione dell'attività locomotoria negli animali trattati in modo dose-dipendente. La riduzione dell'attività locomotoria dimostra una azione sul Sistema nervoso centrale. Gli altri test effettuati sono stati il Lec (labirinto sospeso a forma di croce) e l'interazione sociale non hanno mostrato alterazioni nel comportamento degli animali studiati. Il test dell'head twich non ha avuto esito positivo, pertanto non è confermata l'attività sui recettori 5(HT)_{2b} presente invece in letteratura.

MATERIALI E METODI

Espositoa lanata

Materiale vegetale

La pianta è stata raccolta in Huamcabamba - Piura - Norte de Peru. Dopo la raccolta la pianta è stata tagliata in diversi punti ed essiccata all'aria. Una volta trasportata in laboratorio la pianta è stata polverizzata.

Estrazione

Le diverse parti sono state estratte insieme con solventi a polarità crescente (etere di petrolio, cloroformio, metanolo).

Purificazione dell'estratto metanolico

L'estratto metanolico è stato ripartito fra diclorometano e acqua. Attraverso un'analisi cromatografica su strato sottile (TLC) è stata valutata la presenza degli alcaloidi nella frazione acquosa. Questi composti sono stati poi purificati attraverso cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

Cromatografia su strato sottile

La cromatografia su strato sottile analitica in fase diretta è stata effettuata con lastre di vetro coperte da gel di silice. La rivelazione è stata effettuata sia con la luce UV di 254 e 366 nm sia con i seguenti reattivi spray:

Reattivo di *Dragendorff* composto da due soluzioni. Soluzione A: 0,85 g di nitrato basico di Bismuto, 10 g di acido tartarico in 40 ml di acqua. Soluzione B: 16 g di KI in 40 ml di acqua. Al momento dell'uso si miscelano 5 ml di soluzione A e 5 ml di soluzione B con 100 ml di acqua e 20 g di acido tartarico.

Reattivo composto da 4 g di solfato di cerio, 200 ml di acqua e 70 ml di acido solforico.

Cromatografia liquida ad alta pressione

La purificazione è stata ottenuta per HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna μ -Bondapack C₁₈ semipreparativa (30 cm x 7,8 mm). La frazione

alcaloidea è stata eluita con una miscela acqua : metanolo (80% : 20%) ad un flusso di 2,00 ml/min.

Determinazione strutturale dei composti

La determinazione strutturale dei composti puri è stata compiuta tramite tecniche spettrali (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C DEPT NMR).

Attività motoria

Le apparecchiature dell'attività locomotoria sono ubicate nello stabulario e consistono in un sistema di otto lettori di 16 fotocellule ognuno. Ogni lettore è connesso tramite una interfase che permette la registrazione dei dati su un pc IBM e si trasformano in dati numerici tramite un software disegnato specificamente per questa prova. L'attività motoria viene registrata dopo somministrazione di farmaco e veicolo per 120 minuti. Gli animali vengono posti in gabbie separate già 2 ore prima della prova così da non subire stress al momento della prova stessa.

Brugmansia arborea

Materiale vegetale

La pianta è stata raccolta in piena fioritura, da campioni spontaneizzati in Conca dei Marini (Salerno). Sono stati separati foglie e fiori dai rami e opportunamente pesati. Successivamente sono stati posti in recipienti contenenti adatto solvente e sottoposti ad un processo di macerazione. Saggi preliminari di screening hanno permesso di valutare se esistono differenze nella composizione chimica degli estratti fiori-foglie e dei rami.

Frazionamento

Gli estratti sono stati ottenuti per macerazione con i seguenti solventi:

- Etere di petrolio.
- Cloroformio.
- Cloroformio /Metanolo 9:1.
- Metanolo.

Estrazione e isolamento

Radici, fiori e foglie sono stati essiccati ed estratti con etere di petrolio, cloroformio, cloroformio/metanolo 9:1, metanolo. L'estratto cloroformio/ metanolo (5.0 g circa) è stato sottoposto a cromatografia su gel di silice. Frazioni di circa 8 ml sono state controllate su TLC.

L'estratto metanolico è stato sottoposto a cromatografia su Sephadex LH- 20 (80 x 2 cm). Frazioni di circa 8 ml, ottenute mediante eluizione con metanolo, sono state controllate per TLC in miscele butanolo:acqua:acido acetico (60:15:25) e cloroformio:metanolo:acqua (80:18:2). Le frazioni attive sono state purificate per HPLC su colonna Waters (μ - Bondapak RP-18; 30 cm x 7.6 mm d.i.) usando MeOH:H₂O come eluente per ottenere composti puri.

Metodi cromatografici

Per le TLC sono state usate lastre analitiche di gel di silice stratificato su vetro della Merck, tipo Kieselgel 60 F254 di 0,25 mm. La separazione per HPLC è stata realizzata con un apparecchio Waters 590, costituito da una pompa Waters modello 6000 A, con un iniettore U6K, un rivelatore ad indice di rifrazione Waters R401 e provvisto di una colonna Waters μ -Bondapak RP18. Per la cromatografia su colonna è stata utilizzata una colonna di Sephadex LH-20, con 120 cm x 3 cm d.i., Pharmacia, Upsalla, Sweden. Per la cromatografia di adsorbimento è stato utilizzato gel di silice 60A 6-35 μ m 5kg (SiO₂).

Metodi spettroscopici

La determinazione strutturale è stata realizzata con esperimenti NMR condotti utilizzando uno spettrometro Bruker DRX 600, operante a 599.19 MHz per ¹H e a 150.86 per ¹³C usando il software UX- NMR. Gli spettri dei composti sono stati ottenuti in metanolo deuterato. (CD₃OD). Invece i composti cloroformio deuterato (CDCb).

Valutazione dell'attività biologica della frazione alcaloidea contenuta nell'estratto metanolico.

Gli esperimenti sono stati condotti su topi maschi CD-1 del peso di 30- 35 g. Gli animali sono stati stabulati in locale termoregolati (temperatura 23±2 %, cicli di luce – buio di 12 ore) con umidità dal 45% al 55% ed alimentati con una dieta standard fornita dalla ditta Mucedola Mangimi (Settimo Milanese, Italia). Gli animali, che avevano libero accesso a cibo e acqua, prima di essere utilizzati per gli esperimenti Sono stati lasciati stabulare per un periodo di 6-7 giorni.

L'estratto di *B. arborea* è stato disciolto in acqua al momento dell' utilizzo e somministrato per i.p. alle dosi di 7.5, 15 and 30 mg/kg/5 ml. La stessa procedura è stata utilizzata per il gruppo di controllo. Morfina cloridrato (Salars S.p.a, Como, Italy) è stata disciolta in soluzione salina al momento dell'utilizzo e somministrata

sottocute alla dose di 10 mg/kg/10 ml. Naloxone cloridrato (Sigma, St. Louis, MO), è stato disciolto acqua di fonte e somministrato per i.p. alla dose di 5 mg/kg/5 ml.

Induzione alla tolleranza da morfina

In accordo con Ren et al. (2004) e con Abdel- Zaher et al. (2006) la tolleranza da morfina è stata indotta nei topi somministrando la stessa al dosaggio di 10 mg/kg, s.c. due volte al giorno con intervalli di 12 ore per cinque giorni. La tolleranza è stata valutata tramite il test alla risposta antinocicettiva per la morfina mediante tail- flick test al quinto giorno, 30 min. dopo l'ultima somministrazione di morfina. Per valutare gli effetti dell'estratto metabolico di *Brugmansia arborea* nell'acquisizione (sviluppo) della tolleranza da morfina i topi sono stati trattati somministrando a dosaggi di 7.5, 15 e 30 mg /kg l'estratto due volte al giorno 30 minuti prima del trattamento con morfina. Gli animali di controllo hanno invece subito il trattamento con i soli veicoli (soluzione salina i.p., e acqua di fonte s.c.). Gli effetti della *B. arborea* sulle fasi di espressione della tolleranza da morfina sono stati valutati somministrando agli animali trattati con morfina un'unica somministrazione in acuto (7.5, 15, 30 mg/kg) o con i veicoli, 30 minuti prima dell'ultima iniezione di morfina nel giorno del test (quinto giorno). Gli effetti dell'estratto di *B. arborea* sullo sviluppo della espressione della tolleranza da morfina sono stati valutati mediante il test per l'analgesia (tail-flick). Il test consiste nell'irradiare la porzione inferiore della coda (2 cm dalla base) con un fascio I.R. (Ugo Basile, Comerio, Italia). Il valore basale ha un range che varia tra i 2 e i 3 sec. ed è stato calcolato come media di due misurazioni ad un intervallo di 30 minuti. Dieci animali hanno ricevuto il trattamento o il veicolo 30 minuti prima della somministrazione di morfina (trattati) o della soluzione salina (controlli). L'effetto antinocicettivo è stato valutato al quinto giorno 30 minuti dopo l'ultima iniezione di morfina. Il cut-off è stato stabilito a 12 secondi per minimizzare i danni ai tessuti. L'effetto antinocicettivo è stato espresso come percentuale del massimo effetto possibile (MPE %) in accordo con la seguente formula :

$$\% \text{ MPE} = [(\text{valore dopo trattamento}) / (\text{cut- off valore basale})] \times 100$$

Inoltre l'effetto antinocicettivo dell'estratto di *B. arborea* da sola è stata esaminata in topi non indotti in dipendenza. Gli animali hanno ricevuto somministrazioni

singole o ripetute di dosi differenti di *B. arborea* (7.5, 15 e 30 mg/kg; i.p.) o veicoli (5ml/kg; i.p.). La valutazione della risposta antinocicettiva alla morfina dopo somministrazione della *B. arborea* è stata già descritta in dettaglio.

Induzione alla dipendenza da morfina

Per lo sviluppo della dipendenza i topi sono stati trattati con morfina (10 mg/kg; s.c.) due volte al giorno a intervalli di 12 h per 6 giorni [Ren *et al.*, 2004; Abdel-Zaher *et al.*, 2006].

Due ore dopo l'ultima somministrazione di morfina si va incontro all'astinenza che viene indotta con una somministrazione intraperitoneale di naloxone (5 mg/kg) [Ren *et al.*, 2004; Abdel-Zaher *et al.*, 2006]. L'associazione di morfina con alte dosi di naloxone al sesto giorno di trattamento è risultata efficace nell'indurre gravi sintomi d'astinenza in modo dose-dipendente sia negli animali trattati in acuto che in cronico [Ren *et al.*, 2004]

Dieci minuti dopo il trattamento con il naloxone i topi sono stati collocati in un cilindro acrilico trasparente (20 cm di diametro, 35 cm di altezza) per abituarli al nuovo ambiente. Immediatamente dopo la somministrazione di naloxone ciascun topo è stato collocato nel cilindro e monitorato per 15 min. per valutare i segni dell'astinenza (jumping, rearing, forepaw tremor, teeth chatter).

Per valutare gli effetti della *B. arborea* sulla dipendenza da morfina, l'estratto è stato somministrato a dosi differenti (0, 7.5, 15 e 30 mg/kg; i.p.) 30 minuti prima del trattamento con morfina in cronico (acquisizione) o in acuto dopo naloxone (espressione).

Inoltre l'effetto della pianta sul jumping o indotto dal naloxone è stato esaminato nei topi non dipendenti. Gli animali hanno ricevuto somministrazioni singole o ripetute di dosi differenti di *B. arborea* (7.5, 15 e 30 mg/kg; i.p.) o dei veicoli (5ml/kg; i.p.).

Studi presso Universitat de Valencia

Attività locomotoria

Le apparecchiature dell'attività locomotoria sono ubicate nello stabulario e consistono in un sistema di otto lettori di 16 fotocellule ognuno. Ogni lettore è connesso tramite una interfase che permette la registrazione dei dati su un pc IBM e si trasformano in dati numerici tramite un software (Software ILA Cibertec S.A., Spagna) disegnato specificamente per questa prova. L'attività motoria viene registrata dopo somministrazione di farmaco e veicolo per 24 ore. Gli animali vengono posti in gabbie separate già 24 ore prima della prova affinché non subiscano stress al momento della prova stessa.

CPL

Gli animali sono stati preventivamente manipolati per due giorni prima della prova prima della fase di preconditionamento per ridurre il loro stato di stress.

Per la fase di condizionamento si utilizzano 8 gabbie identiche di plexiglass con due compartimenti di uguale misura (30.7 cm X 31.5 cm X 34.5 cm) separate da una zona di colore grigio. I compartimenti hanno pareti di colori differenti bianchi o neri e suolo di differente fattura (liscio nella zona bianca e rugoso nella zona nera). Entrambi i compartimenti presentano una porta removibile di tipo a ghigliottina che le separa dal compartimento centrale. Ogni gabbia presenta 4 cellule fotoelettriche, mentre la zona centrale ne contiene 6, in modo da consentire la registrazione degli spostamenti dell'animale. L'apparecchio è controllata da due computer IBM tramite l'uso del software MONPRE 2z (Cibertec, Spagna)

Il condizionamento del luogo consiste in tre fasi, svolte durante il ciclo di oscurità eliminando gli animali che dimostrano una preferenza spontanea. (Manzanedo y cols., 2001). Durante la prima fase gli animali hanno libero accesso ad ambo i compartimenti per un periodo di 15 minuti ogni giorno per tre giorni consecutivi. Al terzo giorno i tempi di permanenza per ogni zona vengono registrati per 15 minuti. Gli animali che mostrano una forte avversione (meno del 33% del tempo della sessione) o una forte preferenza (più del 67%) per uno dei due compartimenti vengono scartati. Uno dei compartimenti si sceglie per essere associato al farmaco e l'altro con il veicolo in modo che in ogni gruppo la metà degli animali venga

trattato con l'estratto vegetale, o con soluzione salina, nella zona meno preferita, e la altra metà nella zona preferita, bilanciando in tal modo il colore del compartimento. Non devono esistere differenze significative nel tempo che gli animali hanno trascorso nel compartimento associato al farmaco o al veicolo nella fase di preconditionamento. Questa fase di selezione è di grande importanza per il processo sperimentale in quanto serve ad evitare i falsi positivi o i falsi negativi. Dopo avere associato il compartimento si verifica la tempistica di permanenza grazie all'analisi statistica con ANOVA.

Nella seconda fase (condizionamento) gli animali sono condizionati con il farmaco, o la soluzione salina, mediante 4 associazioni differenti:

Gli animali vengono trattati due volte al giorno somministrando farmaco nel compartimento scelto per questi e soluzione salina nell'altro. Gli animali permangono 60 minuti nella zona associata al farmaco e dopo 4 ore vengono nuovamente trattati con soluzione salina e posizionati nella zona di colore opposto della gabbia dove permangono per lo stesso tempo. Il processo di associazione di effetto della droga e zona della gabbia viene ripetuto per 4 giorni.

La terza fase è quella di post condizionamento. L'ottavo giorno si aprono le ghigliottine e si lascia l'animale, che non è stato trattato, libero di scegliere il compartimento che maggiormente gli interessa per un tempo di 15 minuti. Facendo una analisi delle medie dei tempi pretrattamento e post-trattamento nelle zone di colore differente della gabbia si desume quale sia l'effetto della droga somministrata. Gli effetti possono essere di preferenza quando l'animale associa il colore alla droga e quindi aumenta il tempo di permanenza, oppure di avversione, quando l'animale sceglie la zona opposta a quella in cui ha ricevuto farmaco.

Estinzione

I gruppi di controllo e i gruppi condizionati con farmaco sono soggetti a un controllo della fase di estinzione, che consiste nel collocare l'animale nella gabbia priva di ghigliottine per 15 minuti. Questo procedimento viene ripetuto ogni 4 giorni fino a quando il tempo di permanenza associato con il colore della gabbia in cui si riceve farmaco non scompare. I gruppi che ricevono salino estinguono in una

sola sessione i loro valori di preferenza. I gruppi trattati con farmaco in cui gli animali hanno estinto l'associazione farmaco colore, vengono sottoposti ad una prova di validazione dopo 48 ore [Li et al., 2002].

Ipomea violacea

Materiale vegetale

Il materiale vegetale è stato raccolto nel mese di gennaio 2010 in località Conca dei Marini (Sa). Dopo la raccolta, il materiale è stato essiccato all'aria.

Estrazione

Le diverse parti sono state estratte insieme con solventi a polarità crescente (etere di petrolio, cloroformio, metanolo).

Purificazione dell'estratto metanolico

L'estratto metanolico è stato ripartito fra diclorometano e acqua. Attraverso un'analisi cromatografica su strato sottile (TLC) è stata valutata la presenza degli alcaloidi nella frazione acquosa. Questi composti sono stati poi purificati attraverso cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC).

Cromatografia su strato sottile

La cromatografia su strato sottile analitica in fase diretta è stata effettuata con lastre di vetro coperte da gel di silice. La rivelazione è stata effettuata sia con la luce UV di 254 e 366 nm sia con i seguenti reattivi spray:

Reattivo di *Dragendorff* composto da due soluzioni. Soluzione A: 0,85 g di nitrato basico di Bismuto, 10 g di acido tartarico in 40 ml di acqua. Soluzione B: 16 g di KI in 40 ml di acqua. Al momento dell'uso si miscelano 5 ml di soluzione A e 5 ml di soluzione B con 100 ml di acqua e 20 g di acido tartarico.

Reattivo composto da 4 g di solfato di cerio, 200 ml di acqua e 70 ml di acido solforico.

Cromatografia liquida ad alta pressione

La purificazione è stata ottenuta per HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna □-Bondapack C₁₈ semipreparativa (30 cm x 7,8 mm). La frazione alcaloidea è stata eluita con una miscela acqua : metanolo (80% : 20%) ad un flusso di 2,00 ml/min.

Determinazione strutturale dei composti

La determinazione strutturale dei composti puri è stata compiuta tramite tecniche spettroscopiche (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C DEPT NMR).

Saggi di attività biologica

Nella realizzazione di questo studio sono stati utilizzati 397 topi albini bianchi del ceppo CD-1 acquistati presso Charles River (Barcelona, Spagna); 315 sono stati utilizzati come soggetti sperimentali e i restanti come standard. Gli animali adulti di peso variabile tra i 30-35 grammi al loro arrivo sono stati stabulati in gabbie di plastica (28x28x14,5 cm) in gruppi di 4.

Le condizioni ambientali del laboratorio sono state permanentemente controllate: temperatura costante 21°C, ciclo giorno/notte 12/12 ore. Gli animali hanno ricevuto acqua e cibo *ad libitum*, sono stati alimentati ed idratati durante l'attività motoria. La pulizia delle gabbie è stata realizzata una volta a settimana.

Il procedimento di trattamento e di custodia degli animali è stato realizzato secondo le normative vigenti dettate dalla comunità internazionale descritte in European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 novembre 1986).

Gli animali sono trattati per via intraperitoneale (i.p.) con differenti dosi di Morfina Cloridrato (laboratori Sigma-Aldrich, Spagna) e Cocaina Cloridrato (laboratori Alcaliber, Madrid). Le dosi somministrate sono state proporzionali al peso dell'animale in un volume di 0,01 mg/ml e solubilizzate in soluzione salina fisiologica (NaCl 0,9%). Gli animali di controllo sono stati trattati con la sola soluzione salina.

Gli animali adulti dopo un periodo di adattamento di 7 giorni ricevono soluzione salina (M0), 60, 30, 15, 7,5 mg/Kg di estratto metanolico di *I. violacea* in combinazione con una dose di cocaina di 25 mg/Kg. Le prove conduttuali sono state effettuate dopo 25 minuti dopo il trattamento, tranne che per l'attività motoria, che è stata registrata subito dopo la somministrazione del farmaco.

Attività locomotoria

Le apparecchiature dell'attività locomotoria sono ubicate nello stabulario e consistono in un sistema di otto lettori di 16 fotocellule ognuno. Ogni lettore è connesso tramite una interfase che permette la registrazione dei dati su un pc IBM e si trasformano in dati numerici tramite un software (software ILA Cibertec S.A., Spagna) disegnato specificamente per questa prova. L'attività motoria viene registrata dopo somministrazione di farmaco e veicolo per 24 ore. Gli animali vengono posti in gabbie separate già 24 ore prima della prova affinché non subiscano stress al momento della prova stessa.

LEC (labirinto sospeso a forma di croce)

Il LEC consiste in un labirinto aperto a forma di croce alto 45 cm dal suolo, con bracci aperti (30 cm di lunghezza e 5 di larghezza) e due bracci chiusi di uguale misura ma chiusi per una altezza di 15 cm. Essi convergono in una piattaforma centrale (5x5cm). Il labirinto è costituito di plexiglass nero e le pareti sono trasparenti. Per facilitare l'adattamento dell'animale essi vengono trasportati alla sala sperimentale una ora prima della prova e l'illuminazione è rossa e di bassa intensità. All'inizio di ogni prova il topo è stato posto nel centro della piattaforma con la testa rivolta verso il alto aperto e l'esplorazione viene consentita per 5 minuti. Il labirinto viene ripulito ad ogni prova. Le prove vengono registrate con videocamera e in seguito vengono valutati i seguenti valori: 1 numero di entrate totali, 2 numero di entrate nella zona aperta, 3 numero di entrate nella zona chiusa, 4 percentuale di stazionamento nella zona aperta, 5 percentuale di stazionamento nella zona chiusa, 6 percentuale di tempo nella zona centrale, 7 tempo totale nei bracci aperti, 8 tempo totale nei bracci chiusi e 9 tempo totale nella piattaforma centrale. Si considera come entrata in un braccio quando le 4 zampe sono posizionate sul braccio.

L'incremento di tempo che trascorre il topo nei bracci aperti e la percentuale di entrate nei braccia aperti sono convenzionalmente utilizzati per caratterizzare gli effetti ansiolitici della droga. Il totale delle entrate ai bracci considerata come media di attività degli animali. La permanenza nei bracci chiusi dimostra un forte stato di ansia dell'animale.

Prova di ansietà

La prova costituisce un confronto sperimentale tra un animale trattato ed un opponente standard prelevato da cassa neutrale, cioè non trattato in alcun modo. Durante 10 minuti dopo un periodo di adeguamento di un minuto gli animali vengono posti a contatto. I topi oppONENTI sono resi privi del senso dell'olfatto tramite una soluzione di solfato di zinco al 4% 24 ore prima della prova [Smoothy et al., 1986]. Questa classe di animali induce una risposta di attacco da parte dell'opponente, ma non sono in grado di aggredire o di difendersi in quanto non ricevono i ferormoni presenti nell'urina degli animali sperimentali, i quali sono in condizioni normali, questo effetto determina un aumento della risposta di aggressività degli animali [Mugford e Nowell, 1970; Brain e cols., 1981]. Il comportamento degli animali è stato registrato con videocamera e ottima illuminazione. I video sono stati posteriormente analizzati con un programma informatico (Raton Time) creato specificamente per questa prova. Questo sistema ha permesso di valutare i diversi comportamenti quali esplorazione sociale, ricerca sociale e le differenti categorie conduttuali come la esplorazione non sociale, la minaccia, l'attacco, l'allontanamento caratterizzati da differenti comportamenti e posture [Rodríguez-Arias et al., 1998].

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il sistema della varianza (ANOVA), mediante il sistema di analisi two-ways split-plot utilizzando il trattamento nella varianza tra i gruppi e il tempo come fattore di varianza all'interno del gruppo per analizzare la tolleranza da morfina. La dipendenza da morfina invece è stata analizzata con il sistema della varianza one-way (ANOVA). Quando necessario, per determinare le differenze tra i gruppi, è stata utilizzata l'analisi post-hoc utilizzando il test di Newman-Keuls. La significatività del dato è stata valutata con un $p < 0.05$ e i dati sono stati espressi in media \pm S.E.M.

Bibliografia

- Abdel-Zaher, MM Hamdy, SA Aly, RH,(2006). Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice, *European. Journal of Pharmacology*. 540, 60–66.
- Adovasio, JM, Fry, GF,(1976). Prehistoric Psychotropic Drug use in Northeastern Mexico and Trans-Pecos Texas, *Economic Botany*, vol. 30,. 94-96.
- Bianchi, I, (2005). Le Solanaceae. *Homeopathicum*. La medicina biologica 45-50.
- Bruni, G, Capasso, A, Cavallo, F, De Feo, V, De Martino, L, Giorgi, G, Micheli, L, Nencini, C, (2006).Affinity of *Iresine herbistii* and *Brugmansia arborea* extracts on different cerebrals receptors. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 352-357.
- Bilsky, EJ, Montegut, MJ, Nichols ML, Reid, LD, (1998). CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 59:215-20.
- Bilsky, EJ, Reid, LD,(1991). MDL72222, a serotonin 5-HT₃ receptor antagonist, blocks MDMA's ability to establish a conditioned place preference. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 39:509-12.
- Braida, D, Iosùè, S, Pegorini, S, Sala, M, (2005). 3,4 Methylenedioxyamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) is mediated by endocannabinoid system. *Pharmacology Research*. 51:177-82.
- Brain, PF, Benton, D, Childs, G, Parmigiani, S, (1981). The effect of the type of opponent in test of murine aggression. *Behavioral Process*. 6:319-27
- Campbell, G, (1958). Origin of the mescal bean cult, *American Anthropologist*, vol. 60, 156-160.
- Capasso, A, De Feo, V, (2002). Central Nervous System pharmacological effects of plants from northern Peruvian Andes: *Valeriana adscendens*, *Iresine herbistii* and *Brugmansia arborea*. *Pharmaceutical Biology* 40 (4), 274-293.

- Capasso, A, De Feo, V,(2003). Alkaloids from *Brugmansia arborea* (L.) Lagerheim reduce morphine withdrawal *in vitro*. *Phytotherapy Research* 17, 826-829.
- Capasso, A, De Feo, V, (2007). In vitro binding receptor Studi by *Valeriana adscendes*, *Iresine herbstii* and *Brugmansia arborea* extracts. *Medical Chemistry* 3, 599- 604.
- Capasso, A, De Feo, V, De Simone, F, Sorrentino, L, (1997). Activity-directed isolation of spasmolytic (anti-cholinergic) alkaloids from *Brugmansia arborea* (L.) Lagerheim. *International Journal of Pharmacognosy* 35(1), 43- 48.
- Cole, JC, Sumnall, HR, O'Shea E, Marsden, CA, (2003). Effects of MDMA exposure on the conditioned place preference produced by other drugs of abuse. *Psychopharmacology* (Berl). 166:383-90.
- Der Marderosian, A, (1967). Psychotomimetic indoles in the Convolvulaceae. *American Journal of Pharmaceutical Education Support Public Health.*; 19-26.
- Djerassi, C; Liu, LH, Farkas, E; Lippman, AE; Lemin, AJ, Geller, LE, McDonald, RN, Taylor, BJ, (1955). Terpenoids. XI. Investigation of nine cactus species. Isolation of two new triterpenes, stellatogenin and Machaeric acid, *Journal of the American Chemical Society* , 77 1200-3
- Furst, T, (1986). Shamanism, The Ecstatic Experience, and Lower Pecos Art. Reflections on Some Transcultural Phenomena, in: H.J. Shafer & J. Zintgraff (Eds.), *Ancient Texas. Rock Art and Lifeways along the Lower Pecos*, Texas Monthly, San Antonio, 210-225.
- Heffner, TG, Seiden, LS, (1982). Possible involvement of serotonergic neurons in the reduction of locomotor hyperactivity caused by amphetamine in neonatal rats depleted of brain dopamine. *Brain Research*. 244:81-90.
- Khanuja, J, Shankar A, Santosh K, Srivastava, A, Kuma, S, Tiruppadiripuliyur R, S, Mahendra, P, Da, Sushil K, (2003). Antibiotic pharmaceutical composition with lysergol as bio-enhancer and method of treatment. *PCT, WO/2003/080059 A1*.

- Herzig, V, Capuani, EM, Kovar, KA, Schmidt, WJ, (2005). Effects of MPEP on expression of food-, MDMA- or amphetamine-conditioned place preference in rats. *Addiction Biology* 10:243-9.
- Howard, JH, (1957). The Mescalbean Cult of the Central and Southern Plains: an ancestor of the Peyote Cult, *American Anthropologist*, vol. 59, 75-87.
- Howard, JH, (1960). Mescalism and peyotism once again, *Plains Anthropologist*, vol. 59, 85-86.
- La Barre, W, (1957). Mescalism and Peyotism, *American Anthropologist*, vol. 59, 708-711.
- Li, SM, Ren, YH, Zheng, JW,(2002). Effect of 7-nitroindazole on drug-priming reinstatement of D-methamphetamine-induced conditioned place preference. *European Journal of Pharmacology*. 443:205-6.
- Marona-Lewicka D, Rhee GS, Sprague, JE, Nichols, DE, (1996). Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 53:99-105.
- Marozzi, E, (1980). I “mescal bean”: considerazioni chimico-tossicologiche ed etno-atropologiche sul loro uso rituale tra gli indiani d’America, *Minerva Legale*, vol. 100. 21-34.
- Mc Kenna, T, (2001). *Food of the Gods: The Search for the Original Tree of Knowledge A Radical History of Plants, Drugs, and Human Evolution*
- Merril, WL, (1977). *An Investigation of Ethnographic and Archaeological Specimens of Mescalbeans (Sophora secundiflora) in American Museums*, Museum of Anthropology, The University of Michigan, Ann Arbor.
- Meyer, BN; Mohamed, YA, H,(1980).Cactus alkaloids. Part 43. □ - Phenethylamines from the cactus genus,Opuntia. *Phytochemistry* 19(4) 719-20.
- Meyer, A, Mayerhofer, A, Kovar, KA, Schmidt, WJ, (2002). Rewarding effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxy-methylamphetamine (“Ecstasy”) and 3,4-methylenedioxy-ethylamphetamine (“Eve”) measured by conditioned place preference in rats. *Neuroscience Letterature* 330:280-4.

- Mugford, RA, Nowell, NW, (1970). Pheromones and their effect on aggression in mice. *Nature*. 226:967-8.
- Panter, KE, James, LF, Stegelmeier, BL, Ralphs, MH, Pfister, JA, (1999). Locoweeds: effects on reproduction in livestock. *Journal of Natural Toxins* 8 (1): 53–62.
- Pertz, H, Eich, E, (1992). O-acylated lysergol and dihydrolysergol-I derivatives as competitive antagonists of 5-HT at 5-HT₂ receptors of rat tail artery. Allosteric modulation instead of pseudoirreversible inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Archeological Pharmacology*. ; 345 (4):394-401.
- Ren, Y, Noda, T, Mamiya, T, Nagai, T, Nabeshima, A,(2004) . A neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, prevents the development of morphine dependence and tolerance via c-fos expression linked to the extracellular signal-regulated protein kinase, *Behavioral Brain Research* 152, 243–250.
- Rodríguez-Arias, M, Miñarro, J, Aguilar, MA, Pinazo, J, Simón, VM, (1998). Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *European Neuropsychopharmacol*. 8:95-103
- Schimming, T, Jenett-siems, K, Mann, P, Tofern-reblin, B, Milson J, Johnson R, W, Deroin, T, Austin DF, Eich, E, (2006). Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*.:469-480
- Schechter, MD, (1991). Effect of MDMA neurotoxicity upon its conditioned place preference and discrimination. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 38:539-44.
- Smoothy, R, Brain, PF, Berry, MS, Haug, M, (1986). Alcohol and social behaviour in group-housed female mice. *Physiology & Behavioral*. 37:689-94.
- Stegelmeier, BL, Molyneux, RJ, Elbein, AD, James, LF, (1995). The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. *Veterinary Pathology* 32 (3): 289–98.
- Sun, JY, Yang, H, Miao, S, Li, JP, Wang, SW, Zhu, MZ., Xie, YH, Wang, JB, Liu, Z, Yang, Q, (2009). Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in

vitro and in vivo. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 16 (11): 1070–4.

Sun, JY, Zhu, MZ, Wang, SW, Miao, S, Xie, YH, Wang, JB, (2007). Inhibition of the growth of human gastric carcinoma in vivo and in vitro by swainsonine. *Phytomedicine* 14 (5): 353–9

Troike, RC, (1962). The Origins of Plains Mescalism, *American Anthropology*, . 64 946-963.

Weber, JM, (1976). Microchemical investigation of medicinal plants. XIII. Separation of the alkaloids in the leaves of *Ipomoea violacea* using thin layer chromatography. Ma, T. S. Dep. Chem., City Univ. New York, Brooklyn, NY, USA. *Mikrochimica Acta*. 1(2-3): 217-25

WHO Traditional Medicine Strategy 2002 – 2005