

Osservazioni sulla preparazione dei curari indigeni

G. B. MARINI-BETTÒLO, CORRADO GALEFFI e AMILCARE CARPI

Laboratori di Chimica Biologica e Laboratori di Chimica Terapeutica

Riassunto. — La tossicità acuta degli alcaloidi quaternari estratti da due curari indigeni (Makù e Yanoàma) è stata paragonata a quella degli alcaloidi estratti dal legno di origine (*Chondodendron Bioccai* e *Strychnos* sp. rispettivamente); sono state anche valutate le modificazioni di questa tossicità indotte dalla iodometilazione dei diversi estratti. Gli alcaloidi del curaro Makù sono circa 100 volte più tossici di quelli ottenuti dal legno di *Chondodendron*: la iodometilazione non modifica la tossicità degli estratti del curaro, aumenta notevolmente quella degli estratti ottenuti venti anni fa dal legno fresco di *Chondodendron*, mentre non modifica quella degli estratti ottenuti da campioni dello stesso legno conservati in condizione ambiente per 20 anni. Gli estratti del curaro Yanoàma hanno una tossicità equivalente a quella del legno di *Strychnos* sp.; in entrambi i casi questa tossicità non viene modificata dalla iodometilazione. Il significato di questi dati viene discusso in rapporto ai procedimenti di preparazione dei curari da parte degli indigeni, alla natura delle trasformazioni che i principi attivi subiscono nel corso di queste preparazioni ed ai processi di inattivazione cui gli alcaloidi vanno incontro quando il materiale di origine venga conservato per lungo tempo.

Summary. (*Observations on the preparation of indigenous curares*). — The possible modifications induced in the active principles of *Chondodendron Bioccai* and of *Strychnos* sp. during the preparation of indigenous curares (Makù and Yanoàma resp.) were studied.

The following materials were used: 1) quaternary alkaloids extracted from the Makù curare; 2) quaternary alkaloids extracted, twenty years ago, from fresh wood of *Chondodendron Bioccai*; 3) quaternary alkaloids extracted from samples of the same *Chondodendron* wood, stored for twenty years at room temperature; 4) quaternary alkaloids extracted from Yanoàma curare, and 5) quaternary alkaloids extracted from the wood of *Strychnos* sp. In order to study the effects of this procedure on the toxicity

of the alkaloids, an aliquot of them was subjected to iodomethylation. The toxicity of the alkaloids obtained from the Makù curare is about 100 times higher than the toxicity of the alkaloids extracted from the original wood. Iodomethylation does not modify the toxicity of the Makù alkaloids; it clearly increases the toxic action of the alkaloids obtained from the fresh wood of *Chondodendron*; no changes are induced by iodomethylation on the toxicity of the alkaloids extracted from the stored wood of *Chondodendron*. The toxic activity of the alkaloids of Yanoàma curare is similar to that of the alkaloids obtained from the original bark of *Strychnos*; in both types of the extracts the toxicity was not modified by iodomethylation (Table 1). These data confirm the previous hypothesis (BIOCCA, 1954) that the complex preparation of the Makù curare increases substantially the toxicity of the active principles present in the wood of *Chondodendron*. In particular the effects of methylation, here referred to, indicate that this increase may be dependant on the formation of methylated ammonium groups which are responsible for the curarizing effects. On the contrary, the more simple preparation of the Yanoàma curare could find an explanation in the fact that the alkaloids, which are present in the original bark, cannot be transformed in more active principles by means of iodomethylation. Finally it is evident that a long lasting storage of the wood of *Chondodendron* leads to a substantial loss in the active principles. This loss and the structural changes in the active principles which may occur during the preparation of the indigenous curare, must be taken into account when the observations, which differ from the geographical or the ethnological point of view, are compared.

Le elevate proprietà curarizzanti di alcuni curari indigeni superiori a quelle di estratti da piante che presumibilmente venivano impiegate nella loro preparazione aveva indotto alcuni studiosi, anche prima che fosse stabilita la natura chimica dei componenti attivi dei curari, ad attribuire alla tecnica di preparazione un valore determinante nell'esaltare questa attività (BIOCCA, 1954).

In effetti, numerosi sono gli ingredienti utilizzati nella complessa preparazione dei curari da parte degli indigeni (HUMBOLDT, 1814 e 1819, SCHOMBURGK, 1847). Accanto a *Strychnos* ed a *Chondodendron*, che contengono alcaloidi quaternari ad azione curarizzante, vengono impiegate piante della famiglia delle Apocinacee, delle Rubiacee, delle Piperacee e delle Malpighiacee ed anche veleni animali (VELLARD, 1938, 1965). A questi componenti accessori BIOCCA (1947) e LAZZARINI-PECKOLT (1950) attribuiscono una particolare funzione nel processo di preparazione dei curari. In particolare BIOCCA (1947) e BIOCCA & IPPOLITO (1947 a; b), a seguito di un lungo studio effettuato nel Bacino del Rio Negro, hanno avanzato l'ipotesi che le piante

per l'elaborazione del curaro dovessero essere classificate in tre gruppi: quelle che contengono gli alcaloidi, quelle che consentono di liberare alcaloidi e quelle che aumenterebbero l'attività degli alcaloidi fornendo materiale per una loro metilazione esauriente e quindi per la formazione di nuovi gruppi quaternari.

Dal 1947 ad oggi le conoscenze sui curari si sono notevolmente chiarite a seguito di numerosi studi chimici effettuati sulle piante e sugli stessi curari da WIELAND & MERZ (1953), BOEKELHEIDE *et al.* (1959), KARRER (1959), KING (1940, 1949), MARINI-BETTÒLO & BOVET (1956) e recentemente ancora da BIOCCA *et al.* (1965). In base a queste acquisizioni oggi si ha un quadro abbastanza completo della natura dei curari e degli alcaloidi presenti. Si può dire che la loro preparazione differisca da regione a regione a seconda della materia prima di cui dispongono gli indi e che le tecniche stesse sono più o meno elaborate a seconda dei casi. Ai tre tipi fondamentali di curari fino ad oggi classificati in base al tipo di recipienti in cui vengono conservati cioè curari in tubo o tubocurari, curari di calebassa e curari in vaso (« pot » curare), che rispondono a vari tipi di culture oltre che a diversi metodi di preparazione, si deve aggiungere un quarto tipo di curaro che non viene conservato ma applicato direttamente sulle frecce ritrovato da BIOCCA (1966) presso gli Yanoàma dell'Alto Orinoco e del Bacino del Medio Rio Negro.

Con la scoperta di questo curaro la cui elaborazione è essenzialmente primitiva consistendo in una torrefazione della corteccia della pianta seguita da una percolazione, si completa, per così dire, il ciclo dei metodi di preparazione dei curari, che viene effettuato con modalità diverse da parte delle diverse tribù di Iridi. Nella maggior parte dei casi questi metodi sono basati su una lunga ebollizione degli estratti acquosi delle piante stesse fino ad ottenere una consistenza sciropposa. Fino ad oggi i chimici non hanno dato lo stesso rilievo alle ricerche sui componenti secondari dei curari; probabilmente si tratta in molti casi di sostanze capaci di aumentare la viscosità del preparato, mentre poco si può dire sulla natura e la funzione di altri ingredienti vegetali che vengono aggiunti. Resta dimostrato dagli studi effettuati che ogni gruppo etnico risolve a suo modo il problema della preparazione di queste sostanze, dalle più semplici come si è visto degli Yanoàma ai metodi complicati usati dai Nambicuaras e dai Makù.

Inoltre si può dire che mentre i curari degli Indi che vivono nell'alta Amazonia sono prevalentemente costituiti da alcaloidi di *Chondodendron*, quelli invece dell'Orinoco e del basso bacino amazonico sono prevalentemente costituiti da *Strychnos* seppure in molti casi si trovino curari che contengono nello stesso tempo i principi attivi di *Chondodendron* e di *Strychnos*.

Prendendo spunto da queste osservazioni e potendo disporre sia dei curari indigeni che dei materiali dai quali questi vengono preparati, ci siamo proposti di controllare: a) se la iodometilazione degli alcaloidi quaternari

estratti dal curaro Makù e Yanoàma provocasse modificazioni delle attività biologiche o se ciò non fosse più possibile sul prodotto preparato dagli Indi ; b) se la iodometilazione delle basi ammoniche quaternarie di *Chondodendron* e di *Strychnos* fosse in grado di modificare le proprietà biologiche degli stessi confermando eventualmente l'efficacia in questo senso del trattamento indio, e, c) se l'invecchiamento di oltre 25 anni del legno di *Chondodendron* provocasse la perdita delle proprietà biologiche degli estratti.

MATERIALI E METODI

Le presenti osservazioni si riferiscono ai seguenti materiali :

1) Curaro Makù raccolto nel 1944 da Biocca presso i Makù dell'Alto Rio Negro.

2) Alcaloidi terziari e quaternari estratti nel 1947 dal legno fresco di *Chondodendron Bioccai* (*), dei quali parte è stata iodometilata.

3) Frammenti di legno secco appartenenti allo stesso materiale dal quale erano stati estratti gli alcaloidi.

4) Curaro Yanoàma raccolto da Biocca nel 1963 nel Rio Canaburì durante la preparazione del curaro da parte dei Kohorosciwetari (Yanoàma).

5) Trucioli di legno di *Strychnos* sp., pianta principale usata nella preparazione del curaro Yanoàma, raccolti da Padre L. Cocco presso gli Yanoàma del Rio Ocamo (Alto Orinoco) che usano una tecnica di preparazione identica a quella degli Yanoàma del Rio Canaburì.

Isolamento degli alcaloidi dai curari e dalle piante.

Curaro Makù. Il curaro si presenta come una massa nera picea. Grammi 3 di curaro vengono agitati con 80 ml di acido acetico acquoso al 2 % per 3 volte fino a soluzione completa. La soluzione, portata a pH 1 con HCl 2N, viene estratta con CHCl_3 (circa 100 ml). Si porta a pH 8 - 8,2 con carbonato e bicarbonato di sodio e si estrae nuovamente con cloroformio, centrifugando eventualmente per rompere le emulsioni. Gli estratti cloroformici riuniti, si lavano con acqua e si evaporano a pressione ridotta. Si ottengono come residuo 48 mg di alcaloidi terziari. La fase acquosa è portata a pH 2 con HCl 1 : 1. Si ottengono così circa 150 ml di liquido che vengono trattati con una soluzione satura di acido picrico fino a completa precipitazione. Si filtra, si lava con acqua il picrato, poi si discioglie in 5 ml di acetone acqua (9 : 1) e si passa su colonna di resina IRA 400 (2 cm diametro, altezza 35 cm) in forma

(*) Si tratta di una pianta raccolta da Biocca nell'Alto Rio Negro durante la preparazione del curaro da parte degli Indi Makù del Rio Tiquià ed identificata da Lusina come appartenente a una specie nuova da lui denominata *Chondodendron Bioccai*.

cloridrica. Per evaporazione si ottengono 433 mg di cloridrati quaternari. Questi alcaloidi danno reazione cromatica con $Ce(SO_4)_2$ in acido solforico.

Curaro Yanoàma. Si presenta come una pece nera. Effettuando l'estrazione degli alcaloidi come sopra riportato, da g 1,35 di curaro si ottengono mg 177 di alcaloidi terziari, mg 107 di alcaloidi quaternari. Questi alcaloidi danno la reazione cromatica con $Ce(SO_4)_2$ in acido solforico.

Legno secco di Chondodendron Bioccai. L'estrazione già descritta per il curaro Makù è stata eseguita su 3,7 g di durame polverizzato. Si ottengono 31 mg di alcaloidi terziari e 23 mg di alcaloidi quaternari. Per la precipitazione di questi ultimi con acido picrico è necessario concentrare previamente la soluzione a 20 ml, si procede poi come descritto precedentemente.

Legno di Strychnos sp. L'estrazione è stata effettuata con le già descritte modalità su 5 grammi di corteccia. Si ottengono 17 mg di alcaloidi terziari e 165 mg di alcaloidi quaternari. Per la precipitazione dei picrati la soluzione va concentrata nel vuoto a 40 ml. Gli alcaloidi danno intensa colorazione con solfato cerico in acido solforico.

Metilazione degli alcaloidi dei curari e delle piante.

21,1 mg di alcaloidi del curaro Makù, sciolti in 2 ml di metanolo, si addizionano con 100 mg di ioduro di metile e si riscaldano per due ore a ricadere a b.m. La soluzione si evapora nel vuoto; si ha un residuo di 30 mg. La metilazione è stata eseguita con le stesse modalità su 13,2 mg di alcaloidi del curaro Yanoàma (mg 25 di prodotto metilato), su 4,5 mg di alcaloidi del legno di *Chondodendron* (mg 12,1 di prodotto metilato), su 19,3 mg di alcaloidi di legno Yanoàma (36 mg di prodotto metilato).

Tossicità acuta dei diversi estratti.

La tossicità è stata valutata per via i.v. nel topo albino. Dai diversi estratti è stata preparata una soluzione madre in NaCl 0,9 % contenente 2 mg/ml di alcaloidi quaternari. Da questa soluzione sono state preparate diluizioni scalari nel rapporto 1/2. È stata definita come dose tossica quella che ha portato a morte l'animale entro 2-5 min. dall'iniezione.

RISULTATI

La Tab. I riporta le dosi tossiche dei diversi estratti. Le manifestazioni tossiche osservate con gli estratti più attivi erano chiaramente riferibili ad azione curarica; esse erano caratterizzate da immediata paralisi flaccida con arresto del respiro, esoftalmo ed emissione terminale di urine. Per gli estratti meno attivi, le manifestazioni tossiche, pur presentando una evidente

componente curarica (paralisi dei muscoli cervicali, paresi degli arti), si associava a scosse cloniche cegli arti posteriori, a contrazione nei muscoli pellicciati che si possono riferire ad una attività parossistica del sistema motorio di origine asfittica e capace di manifestarsi solo a livello di quelle strutture non totalmente bloccate dal curaro. Simili manifestazioni si avevano

TABELLA I.

Effetti della idometilazione sulla tossicità dei diversi estratti nel topo albino

Materiale originale	Dose tossica mg/kg i.v. degli alcaloidi quaternari	Dose tossica mg/kg i.v. dopo idometilazione degli alcaloidi quaternari
1. Curaro Makù	0,3	0,3
2. <i>Chondodendron Bioccai</i> (*)	25,0	1,25
3. <i>Chondodendron Bioccai</i> (**)	30,0	30,0
4. Curaro Yanoàma	1,2	2,5
5. <i>Strychnos</i> sp.	0,3	1,25

(*) Alcaloidi estratti 20 anni fa dal legno fresco; tossicità determinata nelle presenti ricerche.

(**)Alcaloidi estratti nelle presenti ricerche da frammenti di legno conservato in condizioni ambientali per 20 anni ed appartenenti allo stesso materiale dal quale erano stati estratti gli alcaloidi di cui alla voce 2.

anche con gli estratti tipicamente curarizzanti quando questi venivano iniettati in dosi subletali.

Per quanto riguarda l'influenza della idometilazione, questa ha chiaramente aumentato la tossicità solo nel caso dell'estratto di legno fresco di *Chondodendron*.

DISCUSSIONE

L'elevata tossicità, legata ad azione paralizzante muscolare degli alcaloidi quaternari estratti dal curaro Makù contrasta con la scarsa tossicità degli alcaloidi quaternari estratti dal legno fresco di *Chondodendron*. Questo conferma che, nel processo di estrazione operato dagli indigeni, gli alcaloidi presenti nel legno subiscono trasformazioni atte ad aumentarne l'attività paralizzante. Sulla natura di queste trasformazioni le esperienze di idometilazione forniscono qualche indicazione. Gli alcaloidi del curaro Makù si

debbono infatti ritenere completamente metilati sia nell'azoto che negli eventuali ossidrilici in quanto non subiscono apprezzabili variazioni della tossicità dopo esauriente metilazione. Viceversa gli alcaloidi ottenuti dall'estratto di legno fresco di *Chondodendron* contengono evidentemente gruppi la cui metilazione porta a un netto incremento dell'attività curarica che si avvicina notevolmente a quella degli alcaloidi presenti nel curaro Makù. Questo fatto si può spiegare con la trasformazione della tubocurarina in dimetiltubocurarina e di altri alcaloidi quaternari nei rispettivi derivati metilici.

L'assenza di analoghi effetti della iodometilazione eseguita sugli alcaloidi estratti da un campione dello stesso legno di *Chondodendron* conservato per oltre 20 anni può essere spiegata con la progressiva alterazione degli alcaloidi che si osserva con la prolungata conservazione del legno (WINTERSTEINER, 1959; KRUKOFF, 1967, comunicazione personale).

La tossicità presso a poco uguale o addirittura superiore degli alcaloidi estratti dal legno di *Strychnos* sp. nei confronti di quelli del curaro Yanoàma ha un duplice significato. Innanzitutto permette di escludere che gli alcaloidi presenti nel legno avessero subito un processo di inattivazione e in secondo luogo indica che, nella preparazione di questo curaro da parte degli indigeni, gli alcaloidi non subiscono modificazioni capaci di accentuarne l'attività curarizzante. Il fatto è indirettamente confermato dal mancato aumento dell'attività curarizzante in seguito a iodometilazione. Evidentemente la metilazione porta a modificazioni non sostanziali (metilazione di gruppi ossidrilici) degli alcaloidi della pianta del curaro Yanoàma (*Strychnos*).

Le considerazioni esposte nell'introduzione, confermate dai dati qui riportati, permettono di proporre una nuova suddivisione dei curari indigeni in base alla tecnica della loro preparazione. Un primo gruppo di curari *semplici* comprenderebbe i curari Yanoàma elaborati per semplice torrefazione e percolazione della miscela delle cortecce di piante di cui probabilmente una *Strychnos* sp. è particolarmente attiva. Da questi si distinguono i *curari complessi* cui appartengono tutti i curari fino ad oggi noti (tubocurari, curari di calebasse e curari in vaso).

Probabilmente il metodo di preparazione del curaro Yanoàma è estremamente semplice in quanto non è possibile ottenere artificialmente modificazioni della sua attività biologica. Al contrario i curari come il Makù, ottenuti da *Chondodendron*, sarebbero preparati con un metodo lungo e complesso per ottenerne l'esaltazione dell'attività curarizzante. Questo spiegherebbe la ragione di metodi così diversi di preparazione e delle apparenti discordanze tra ricercatori che hanno creduto di poter generalizzare le osservazioni da loro fatte in zone geografiche e presso gruppi Indi diversi. Ad esempio il curaro Makù, molto attivo ed elaborato, viene usato soprat-

tutto per piccolissime frecce di cerbottana, mentre il curaro Yanoàma viene usato solo nelle grandi frecce, non esistendo la cerbottana fra gli Yanoàma.

Siamo grati al Prof. E. Biocca dell'Università di Roma per averci fornito il materiale sperimentale, proveniente dalle sue spedizioni in Amazonia del 1947 e del 1964-65, e per il contributo critico dato a queste ricerche.

15 luglio 1967.

BIBLIOGRAFIA

- BIOCCA, E., 1947. Preparazione del curaro da parte degli Indi Makù. Piante usate. Attività (regione dell'Alto Rio Negro-Amazzoni). Nota I. *Atti Accad. Nazl. Lincei Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat.*, (8), **2**, 689.
- BIOCCA, E., 1954. Pesquisas sôbre o método de preparacão do curare pelos indios. *Rev. Museu Paulista*, **8**, 165, 226.
- BIOCCA, E., 1966. *Viaggi tra gli Indi - Alto Rio Negro, Alto Orinoco*. Vol. IV, CNR (Roma).
- BIOCCA, E., D. BOVET, C. GALEFFI & G. B. MARINI BETTÒLO, 1965. Sul curaro Janoàma. Un nuovo tipo di curaro indigeno; curaro di torrefazione e percolazione. *Atti Accad. Nazl. Lincei Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat.* (8) **38**, 34.
- BIOCCA, E. & M. IPPOLITO, 1947 a. Ricerche chimico-biologiche sulla composizione del curaro Makù. *Atti Accad. Nazl. Lincei Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat.* (8) **2**, 872.
- BIOCCA, E. & M. IPPOLITO, 1947 b. Ricerche chimico-biologiche sul metodo indio di preparazione del curaro. *Atti Accad. Nazl. Lincei Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat.*, (8) **3**, 162.
- BOEKELHEIDE, V., O. CEDER, M. NATSUME & A. ZÜRCHER, 1959. Single Hofmann degradation of C-curarine-I and its structural implications. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2256.
- HUMBOLDT, A. VON., 1814. e 1819. *Voyage aux régions équinoxiales*. Humboldt et Bonpland VII e VIII. Paris.
- KARRER, P., 1959. Alkaloids of calabash curare and *Strychnos* barks, in: *Curare and Curare-like agents*. D. Bovet, F. Bovet-Nitti & G. B. Marini-Bettòlo, Eds. Elsevier, Amsterdam, p. 125.
- KING, H., 1940. Curare alkaloids. Alkaloids of some *Chondodendron* species and the origin of *Radix Pareirae Bravae*. *J. Chem. Soc.*, 737.
- KING, H., 1949. Curare alkaloids. Examination of some *Strychnos* species from British Guiana: characterization of Diaboline, an alkaloid from *Strychnos diaboli* Sandwith. *J. Chem. Soc.*, 955.
- LAZZARINI-PECKOLT, O., de, 1950. The formation of the curarizing factors of curare. *Rev. Soc. Brasil. Quim.*, **19**, 109.
- MARINI-BETTÒLO, G. B. & D. BOVET, 1956. Chemical and pharmacological studies of the alkaloids of *Strychnos* sp. from Brazil. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **1**, 26.
- SCHOMBURGK, R., 1847. *Reisen in British Guiane in den Jahren 1840-1*, J. J. Weber, Leipzig.
- VELLARD, J., 1938. Le curare des indiens Nambikwara. *Compt. Rend.*, **208**, 2104.
- VELLARD, J., 1965. *Histoire du curare*. Gallimard, Paris.
- WIELAND, TH. & H. MERZ, 1953. Über die Alkaloide aus Calebassen-Curare. VII. *Ann. Chem.* **580**, 204.
- WIELAND, T., H. REINSHAGEN & H. FRITZ, 1961. Zur Structur des C-Curarins I. *Naturwissenschaften*, **48**, 50.
- WINTERSTEINER, O., 1959. The chemistry of the *Chondodendron* alkaloids, in: *Curare and Curare-like agents*. D. Bovet, F. Bovet-Nitti & G. B. Marini-Bettòlo, Eds. Elsevier, Amsterdam p. 153.