



Foto di Matthias Liffers

Gli anuri comprendono rospi, rane e specie affini per un totale di circa 5420 specie

Etnofarmacologia degli Anuri

Quattro decenni di ricerca sugli alcaloidi estratti dalla pelle di anuri - rane e rospi - hanno portato alla luce più di 800 composti, molti dei quali ancora sconosciuti. La maggioranza di questi alcaloidi presenti in ghiandole epiteliali anure, sembra provenire in forma immutata da fonti alimentari. Sono stati ottenuti risultati che attestano tale ipotesi e ammettono come fonti principali formiche, acari, scarafaggi e millepiedi. Tuttavia, le strutture e le origini alimentari dei numerosi alcaloidi rimane una sfida per il futuro.

*** Francesca Soddu**
*** Stefania Preda**
**** Patrizia Cotroneo**
,Francesco Saverio Robustelli della Cuna**

Introduzione

Gli anuri (classe *Amphibia*), sono rappresentati da 6150 specie distinte in urodeli (caudati), anuri (privi di coda) e cecilie o apodi (privi di arti). Il termine anfibio, da ἀμφί (doppio) e βίος (vita), si riferisce al ciclo biologico che inizia nell'acqua e prosegue sulla terraferma. Esistono circa 550 specie di urodeli, alcuni dei quali interamente acquatici, mentre altri vivono sulla terraferma una volta adulti o per tutta la durata del ciclo vitale. La maggior parte degli urodeli adattati alla vita nell'ambiente subaereo si sposta con movimenti ondulatori laterali del corpo, un carattere ereditario dai primi tetrapodi terrestri [1]. Gli anuri comprendono rospi, rane e specie affini e annoverano circa 5420 specie, ripartite in generi che popolano tutte le regioni temperate e tropicali, ad eccezione della vette dei monti ricoperte di neve, dei deserti privi di acqua e di alcune isole del Pacifico. Il gelo permanente delle regioni artiche e antartiche ne limita la presenza a tali latitudini. Gli antenati delle rane e dei rospi furono i primi vertebrati adattati alla vita subaerea, pur non riuscendo ad infrangere del tutto le catene che li legavano alla vita acquatica.

Genus *Bufo*

Fanno parte del genere *Bufo* *Bufo marinus* (rospo delle canne o rospo marino comune), noto anche come *Bufo aqua* e altre specie affini, tra cui *Bufo vulgaris* europeo, *Bufo gargarizans* asiatico e *Bufo alvarius* nordamericano. Le specie meno conosciute includono *Bufo arenarum*, *Bufo asper*, *Bufo blombergi*, *Bufo formosus*, *Bufo fowerii*, *Bufo quercicus* e *Bufo valliceps*. *Bufo marinus*, nativo del Nuovo Mondo, diffuso in un'area che va dal Texas meridionale sino all'Amazzonia e al Perù sud-orientale. È stato introdotto con intenti di lotta biologica in vari paesi del mondo, con risultati non sempre brillanti. In particolare la sua introduzione in Australia, per la lotta biologica contro alcune specie di insetti infestanti, ha avuto un impatto fortemente negativo sulla biodiversità. La rapida moltiplicazione ha portato a una drammatica riduzione del numero di numerose specie di roditori, anuri e rettili, con cui compete per il cibo e che spesso preda. Ha avuto ricadute sulla intera catena alimentare, riducendo il numero di predatori a causa dell'effetto letale della bufotossina per molti di essi. Per questa ragione è stato inserito nell'elenco delle 100 specie invasive più dannose al mondo. *Bufo vulgaris* presenta pelle verrucosa, pupille orizzontali e grandi ghiandole parotidi situate posteriormente agli occhi. La colorazione è giallo-grigiastro o bruno-verdastra, priva di un vero e proprio disegno, ma può variare con le stagioni, il sesso e l'età. Le zampe posteriori sono corte e tozze, mentre il muso appare appiattito. Nei maschi, di solito un po' più piccoli delle compagne, durante il periodo dell'accoppiamento è possibile apprezzare la formazione di cuscinetti nuziali scuri interdigitali sulle zampe ante-

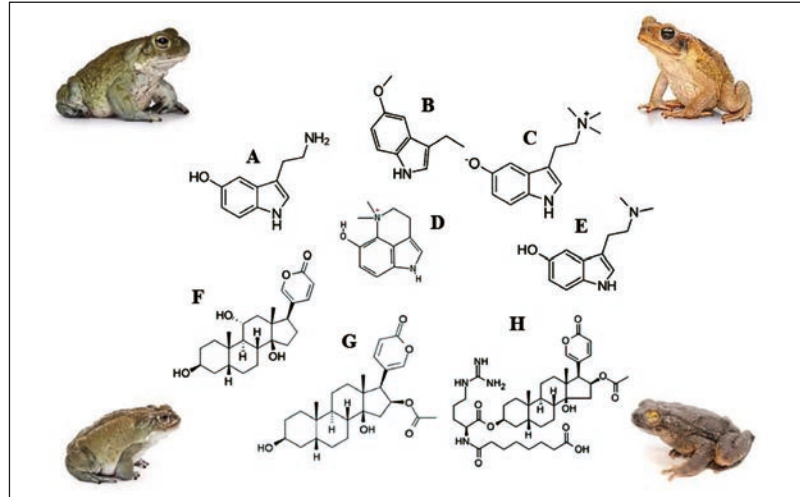


Figura 1: struttura chimica di serotonina (A), 5-metossi-dimetriptamina (B), bufotenina (C), deidrobufotenina (D), bufotenina (E), gamabufotalina (F) bufotalina (G), bufotossina (H)

rriori. Le ghiandole parotidi producono una secrezione che può essere recuperata senza nuocere all'animale. Tale secrezione è un veleno e contiene steroidi (bufadienolidi) con effetto farmacologico simile a quello dei glicosidi cardioattivi della digitale. Prima dell'introduzione in terapia delle foglie di *Digitalis purpurea*, la pelle di rospo essicata e polverizzata era impiegata nella cura dell'idrope. In Giappone e in Cina, la pelle essicata di rospo, nota come "chan su" (Cinese) o "senso" (Giapponese) è utilizzata da tempo immemore. Secrezioni di questo tipo sono prodotte da varie specie di rospi. Il costituente più attivo della secrezione di *Bufo vulgaris* è la bufotossina, un estere della bufotalina con suberil-arginina. Esistono oltre 200 specie conosciute, tutte dotate di ghiandole parotidi che producono un'ampia varietà di sostanze biologicamente attive. A seconda della specie, tali sostanze includono: dopamina, adrenalina, norepinefrina, serotonina e molte altre, in varie combinazioni, nonché analoghi e congeneri [2, 3]. Una sostanza che si ritrova sia nell'uomo che nel *Bufo* è la serotonina (5-idrossitriptamina). In alcune specie di *Bufo* la serotonina è O- e/o N-metilata. Le molecole risultanti includono 5-metossi-di-

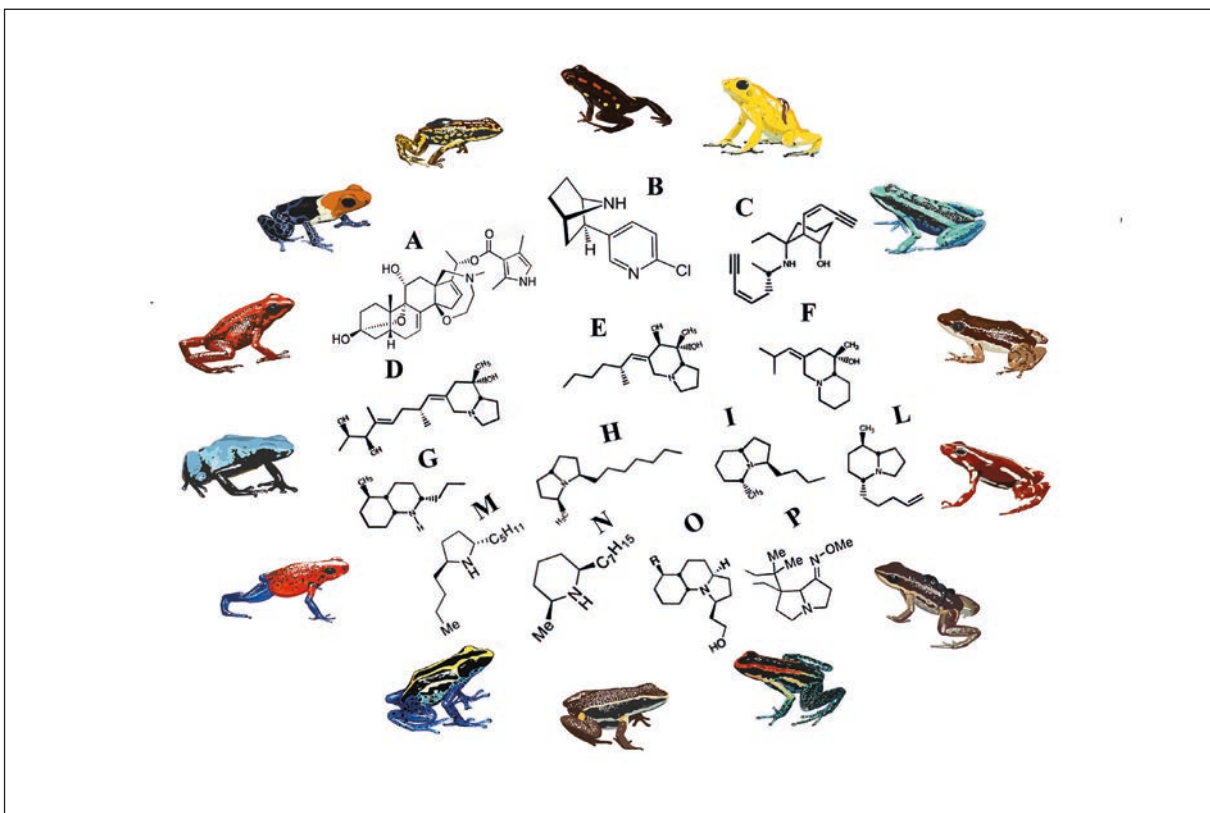
Erbe ed estratti da agricoltura biologica

BIOPLANTA

Garanzia BIO!

www.bioplanta.it
Tel: 393 3547527 - 329 9211379

Figura 2: struttura chimica di batracotossina (A), epibatidina (B), istrionicotossina (C), pumiliotossina (D), allopumiliotossina (E), omopumiliotossina (F), decaidrochinolina (G), pirrolizidina (H), 3,5-indolizidina (I), 5,8-indolizidina (L), pirrolizidina (M), piperidina (N), gefirotossina (O), spiropirrolizidina (P)



metiltriptamina (5-MeODMT), bufotenidina, deidrobufotenina e bufotenina. Tali analoghi si ritrovano in numerosi veleni del *genus*. La bufotenina (5-idrossidimetiltriptamina) è presente in tutte le specie *Bufo*, sebbene in diverse concentrazioni, così come i congeneri variano a seconda della specie considerata. La presenza simultanea di bufotenina e 5-MeO-DMT si ritrova in meno dell'1% delle specie conosciute, in particolare in *Bufo alvarius*. Sono presenti nei veleni del *genus Bufo* anche steroidi cardioattivi estremamente tossici chiamati gamabufotalina, bufotalina e bufogenina, (Figura 1) [4].

Rane velenose (Poison frogs)

Si tratta di rane delle foreste pluviali neotropicali dell'America Centrale (Panama, Costa Rica, Suriname, Nicaragua, Guyana francese ed altri) e dell'America

Meridionale (Venezuela, Bolivia, Colombia, Brasile e Perù). Sono piccoli animali, con dimensioni che variano tra i 3 e i 6 cm. Manifestano caratteristiche comportamentali uniche e colori vivaci al pari di molte specie di pesci tropicali. A seconda della provenienza geografica, la colorazione comprende giallo, rame, rosso, verde, blu o nero. Gli elaborati disegni sulla pelle e i colori sono volutamente appariscenti per scongiurare potenziali predatori, tattica nota come colorazione aposematica. Sono chiamate in molti modi, ognuno ad indicarne una peculiarità: rane tossiche, rane da freccia, rane diurne pluviali o rane parentali. Quest'ultima denominazione rivela la presenza di cure parentali in quasi tutte le specie. L'appellativo di rane tossiche o da freccia è dovuto alla presenza di numerosi alcaloidi tossici, presenti nella cute di questi anfibi. Alcune vengono chiamate

poison frog (PF) per la capacità di produrre sostanze velenose di natura alcaloidea [5]. Le più velenose risultano essere le rane appartenenti al genere *Phylllobates* (*aurotaenia*, *bicolor* e *terribilis*), utilizzate dagli Indios sudamericani Chocho, per estrarne il veleno e inserirlo in dardi e frecce utilizzati per cacciare. Tale tossicità, legata molto probabilmente alle abitudini alimentari, è nulla se l'animale vive in cattività. Nelle PF la maggior parte delle sostanze chimiche di difesa consiste in alcaloidi lipofili, che vengono prodotti a livello endogeno attraverso la biosintesi, o che provengono dall'assunzione attraverso la dieta a base di artropodi. Negli ultimi quarant'anni sono stati identificati nelle diverse famiglie di PF di tutto il mondo più di 800 alcaloidi, organizzati in 28 classi strutturali. Originariamente, si riteneva che la presenza di alcaloidi fosse il risultato di un mec-

canismo di biosintesi, tuttavia le ricerche, effettuate in gran parte da John W. Daly, hanno portato alla luce una nuova ipotesi legata alla dieta. Da tali ricerche è emerso come le PF ottengano la maggior parte degli alcaloidi lipofili dalla dieta, in particolare dagli artropodi, da qui l'ipotesi alimentare, che si affianca all'ipotesi biosintetica. Tra gli alcaloidi, i più importanti si ritrovano: batracotossina, presente unicamente nel *genus Phyllobates* e epibatidina, nel *genus Epipedobates*. I primi alcaloidi identificati furono le batracotossine, originariamente isolate dalla pelle di tre specie colombiane di *Phyllobates* (*Dendrobatidae*). A seguito delle recenti scoperte riguardanti la struttura degli alcaloidi nei dendrobatidi,

questi ultimi sono stati suddivisi nelle seguenti classi: batracotossine, istrionicotossine, indolizidine, pumiliotossine, a loro volta ripartite nelle sottoclassi: allopumiliotossine e omopumiliotossine, decaidrochinoline, gefirotossine, piperidine 2,6-disostituite, pirrolidine 2,5-disostituite, piridil-piperidine, alcaloidi indolici, e alcaloidi ammidici (Figura 2).

Batracotossine: i tre alcaloidi principali appartenenti a questa classe sono batracotossina (BTX), omobatracotossina, e batracotossinina A. La tossicità è conseguenza della depolarizzazione dei canali del sodio delle fibre nervose e muscolari. Ad opera delle batracotossine, il meccanismo di apertura/

chiusura stabile di tali canali, passa ad una forma aperta. Le batracotossine sono state ampiamente utilizzate nel campo della ricerca sui canali del sodio voltaggio-dipendenti. Studi *in vivo* indicano che BTX induce un massiccio rilascio di serotonina dal nucleo caudato e dai nuclei del rafe, con aumento della sintesi di cAMP. BTX rende le fibre muscolari non eccitabili, favorendo la comparsa di contrazioni muscolari. Le contrazioni compaiono nei primi minuti dopo la somministrazione della tossina e dipendono l'effetto diretto della tossina sulle membrane muscolari. Contrazioni muscolari tardive si verificano 20 minuti dopo la somministrazione della tossina e sono probabilmente dipendenti dal

UNA MENTE SEMPRE IN FORMA.



Gli impegni di lavoro, di studio, lo stress della vita quotidiana o anche solo il progredire dell'età possono affaticare la nostra mente compromettendo memoria, concentrazione e capacità di elaborazione. Gli estratti di Goji, Bacopa e Melissa che caratterizzano la nuova formulazione di Cognimind OMEOSTAT, potenziata con vitamine del gruppo B da grano saraceno, aiutano la mente a rimanere naturalmente lucida e attiva ad ogni età.

Scopri qui



info@fitomedical.com www.fitomedical.com



FITOMEDICAL
star bene è naturale

rilascio di Ca⁺⁺ dai depositi intracellulari. BTX provoca anche blocco atrioventricolare e una vasta gamma di aritmie ventricolari (fibrillazione ventricolare) che portano alla morte [6].

Istrionicotossine: attualmente sono state riconosciute 16 istrionicotossine, in grado di determinare blocco dei recettori nicotinici (nAChR). Le istrionicotossine sono state ampiamente utilizzate nella ricerca come bloccanti non competitivi dei nAChR.

Pumiliotossine, allopumiliotossine e 8-deossipumiliotossine: appartengono alle pumiliotossine oltre 30 alcaloidi mentre circa 20 sono considerati allopumiliotossine. Le pumiliotossine presentano una marcata attività cardiotonica e sono in grado di prolungare il tempo di apertura dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, innescando la formazione del secondo messaggero inositolo trifosfato a livello cardiaco e neuronale. Pumiliotossine e allopumiliotossine sono estremamente tossiche, con valori di LD50 pari a circa 50 Qg in modelli murini.

Omopumiliotossine: non esistono, ad oggi, dati riguardanti la tossicità e la bioattività di questi composti, e non esiste un riscontro certo della loro provenienza dagli artropodi assunti con la dieta, anche se questa sembra essere l'ipotesi più plausibile. Le omopumiliotossine, al pari delle pumiliotossine, sembrano avere effetto sui canali del sodio, con conseguente attività cardiotonica.

Decaidrochinoline: il composto principale cis-195A della classe di alcaloidi decaidrochinoline.

Riguardo alla tossicità, la LD50 nei topi per i composti cis-195A e 219A è di 250 Qg. Le decaidrochinoline sono bloccanti non competitivi dei nAChR. La fonte dietetica di questi alcaloidi è la formica myrmicina.

Pirrolizidine: la fonte alimentare è senza dubbio la formica myrmicina. Ad oggi non sono disponibili dati sufficienti a dimostrazione della tossicità di questi alcaloidi.

Indolizidine 3,5-disostituite: attualmente, si annoverano in questa classe circa 30 alcaloidi che agiscono come bloccanti non competitivi dei nAChR. La fonte alimentare è senza dubbio la formica myrmicina. Non sono disponibili dati relativi alla tossicità per le indolizidine 3,5-disostituite. L'indolizidina 239CD ha una dose letale minima che è superiore a 200 Qg in modello murino.

Indolizidine 5,8-disostituite: non sono disponibili dati relativi alla tossicità di questa classe. Alcuni composti sono potenti antagonisti non competitivi dei nAChR.

Pirrolidine: i composti pirrolidinici derivano dalla formica myrmicina. Agiscono come bloccanti non competitivi dei nAChR. Attualmente, non sono disponibili dati riguardo la tossicità di questa classe.

Piperidine: sono state scoperte nel veleno prodotto dalla formica myrmicina nel 1971.

Le piperidine 2,6-disostituite si ritrovano raramente nelle rane dendrobatidi, nelle rane mantellidi e in entrambi i gruppi solo in traccia. Sono dei potenti bloccanti non competitivi dei nAChR.

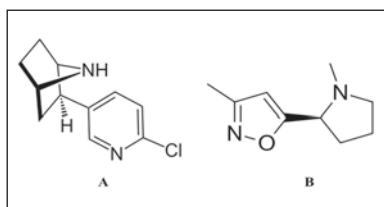
Gefirotossine: le gefirotossine si ritrovano raramente in rane dendrobatidi e solo in esemplari in cui le istrionicotossine sono presenti in elevate quantità. Agiscono come bloccanti non competitivi dei nAChR.

Spiropirrolizidine: attualmente nove sono gli alcaloidi asse-

gnati alla classe delle spiropirrolizidine, presenti nella pelle di anuri. I millepiedi sono considerati la fonte alimentari di tali alcaloidi. Non sono attualmente disponibili dati riguardanti la tossicità, tuttavia è noto che agiscono come antagonisti non competitivi dei nAChR [7].

Piridine: l'alcaloide principale di questa classe è l'epibatidina, un agonista dei nAChR. Tale composto ha suscitato particolare interesse per la ricerca farmacologica in quanto possiede attività analgesica da 100 a 200 volte superiore a quella della morfina, ragion per cui si è ipotizzato un possibile utilizzo come analgesico non oppioide. Di fatto l'epibatidina manifesta una tossicità troppo elevata per essere impiegata in terapia, tuttavia la ricerca sta sviluppando derivati di sintesi che conservino l'attività analgesica e siano dotati di bassa tossicità, così da poter introdurre nuovi trattamenti nella terapia del dolore che non prevedano l'utilizzo di oppioidi. Inoltre, poiché i nAChR sono coinvolti in numerosi meccanismi cellulari essenziali del SNC, tra cui apprendimento, ansia, memoria e funzione cognitiva, sono stati sviluppati diversi ligandi nAChR per il trattamento di patologie, quali la malattia di Alzheimer (AD). È stato dimostrato che i pazienti affetti da malattie neurodegenerative quali AD hanno una grave carenza nei livelli di nAChR, suggerendo il ruolo nella perdita di nAChR nel declino cognitivo correlato alla patologia. Sulla base di queste osservazioni è stato sviluppato un analogo di epibatidina, ABT-418 (Figura 3), il cui uso clinico è stato testato nell'AD moderato. Dal momento che i nAChR giocano un ruolo importante anche nel disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), ABT-418 è stato testato nell'ADHD moderata negli adulti [8].

Figura 3:
struttura
chimica
di epiba-
tidina (A),
ABT-418
(B)



Ipotesi biosintetica e ipotesi alimentare.

L'ipotesi biosintetica prende in considerazione lo stress quale causa principale nella produzione di alcaloidi da parte delle PF. Lo stress, causato dalla vicinanza e/o presenza di predatori, attiva la produzione di tossine alcaloidee. Un ulteriore supporto all'ipotesi biosintetica è stato fornito dalle osservazioni di alcuni dendrobatidi in cattività: i profili degli alcaloidi in esame erano rimasti relativamente costanti nella maggior parte dei casi. Inoltre, la quantità di alcaloidi e la relativa tossicità nelle rane in cattività diminuiva nel tempo.

Riferendosi alla diminuzione osservata in termini di quantità di alcaloidi nel genere *Phyllobates terribilis* in cattività [9], si arrivò alla conclusione che:

“La ragione della diminuzione della tossicità non è chiara, potrebbe essere legata allo stress. La tossicità nelle rane, tuttavia, permane anche dopo lunghi periodi di cattività. Ciò dimostra che le tossine non derivano da qualche alimento naturale”

La diminuzione della quantità di alcaloidi osservati nei dendrobatidi in cattività era ampiamente attribuita allo stress. In altre parole, la mancanza di stress naturali e la diminuzione dello stress associato alla vita in cattività, possono essere considerati la causa della mancata attivazione della biosintesi alcaloidee. Per molti anni, la presenza di alcaloidi nelle PF è stata interamente attribuita alla biosintesi. Tuttavia, alcune supposizioni erano difficili da spiegare con tale ipotesi. Queste riflessioni non sono passate inosservate, al contrario, sembravano essere argomenti validi per una possibile ipotesi alimentare, che ha suscitato l'interesse di molti ricercatori. L'ipotesi alimentare è il risultato di numerose ricerche e collaborazioni, esperimenti ac-

curati, e in alcuni casi, serendipità. Gli esperimenti ebbero inizio nel 1980, quando Daly cercò di indurre la biosintesi di alcaloidi ricreando situazioni di stress. Attraverso una serie di prove molto elaborate, nonché fantasiose, (frequenti cambiamenti di terrario, integrazione dei terrari acquosi con adrenalina, modifica delle diete, maggiore illuminazione, cambiamenti di suono e temperatura, ed una varietà di minacce visive, come il posizionare un serpente artificiale o reale, nel terrario), non fu possibile indurre la produzione di alcaloidi nelle rane velenose in cattività. Una data storica per tali ricerche l'incontro tra Daly e Donnelly che iniziarono una proficua collaborazione. Donnelly suggerì che la variazione nei profili alcaloidei potesse essere correlata alla dieta, descrivendo la variazione nel consumo di formiche, acari e altri artropodi da parte delle rane, all'interno di una popolazione della stessa specie nel nord-est Costa Rica, durante un periodo di osservazione di 15 mesi. La composizione della dieta variava nel tempo, per età (adulto vs giovane) e sesso. Dall'analisi del contenuto dello stomaco di alcuni esemplari di *Oophaga histrionica* e di *Dendrobates trivittata*, allo stato brado, non trovò traccia di tossine o potenziali precursori di alcaloidi [8]. Di conseguenza, considerando improbabile la connessione tra dieta e tossicità, come la maggior parte delle prove disponibili fino quel momento, sostenne l'ipotesi biosintetica. Nel medesimo periodo Cover, dirigeva con successo un programma di riproduzione in cattività per dendrobatidi, in particolare di *Dendrobates auratus*. Durante gli esperimenti uno degli esemplari fuggì dall'area di allevamento e si stabilì nella foresta pluviale tropicale, nutrendosi di artropodi autoc-toni. La rana fuggita venne ritro-

vata morta, e la pelle fu inviata a Daly. Dalle analisi emerse che la pelle dell'esemplare, conteneva monomorina -3-butil-5-metilindolizidina e tracce di 2-pentil-5-butilpirrolidina, entrambi presenti negli artropodi cui, probabilmente, si era nutrita. Per la prima volta, alcaloidi presenti negli artropodi vennero ritrovati in questo esemplare. In aggiunta la prole di rane hawaiane alimentata a base di grilli e moscerini non contenevano alcaloidi, mentre la prole di rane nutrite con termiti e moscerini produceva alcaloidi simili a quelli ritro-

Herbo Veneta
Azienda Artigianale
di prodotti fitoterapici e cosmetici



Herbo Veneta

Via Umbria, 24 - 35043 Monselice -PD-
www.herboveneta.it info@herboveneta.it

Il fascino legato alla figura, al comportamento e alle proprietà del veleno delle rane, considerati dai popoli antichi soprannaturali e magici, ha permesso la genesi di miti e rituali che sono stati tramandati sino ai nostri giorni



Foto di Jean-Francois Brousseau



Foto di Matthew Ireland



Foto di Tjflex2



Foto di John Munt



Foto di Mike Keeling



Foto di Pepijn Jansen

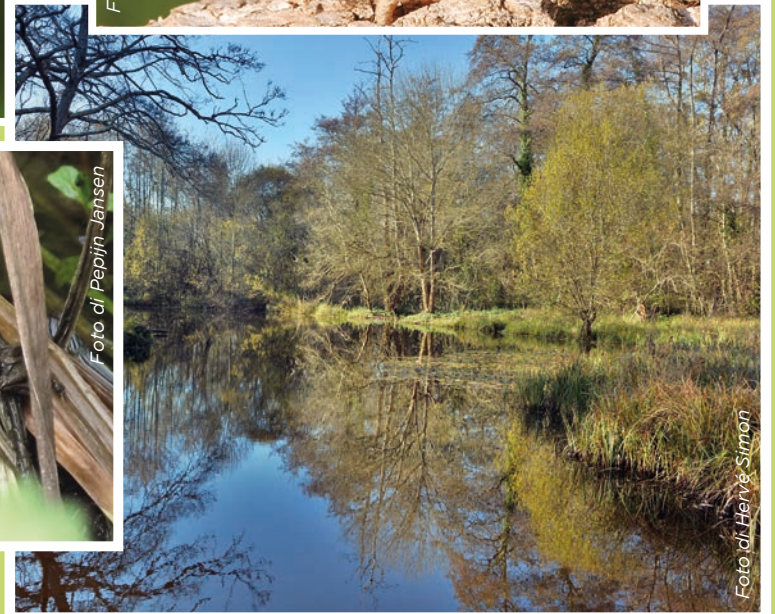


Foto di Henry Simon

vati nei genitori catturati in natura. Daly concluse che i fattori ambientali giocassero un ruolo fondamentale nell'innescare o sostenere la produzione alcaloidea. Nello stesso periodo, furono scoperti altri alcaloidi derivati da artropodi in rane velenose (*Bufo* e *Melanophryniscus* e *Mantella*). In particolare, alcuni alcaloidi ritrovati nella pelle del rospo *Melanophryniscus stelzneri* (Argentina) e in altre diverse specie di *Mantella* (Madagascar) vennero classificati come provenienti da formiche o coleotteri. Ciò suggerì una possibile fonte alimentare per gli alcaloidi presenti nelle PF, e il fatto che le formiche e altri insetti rappresentavano la dieta di rospi bufonidi e rane dendrobatidi, aumentava la possibilità di ritrovare alcaloidi in tali rospi e rane [10]. Per verificare l'ipotesi che le PF potessero sintetizzare alcaloidi, si diede inizio ad una serie di esperimenti su rane sia in cattività che in natura, alimentate con insetti in grado di fornire alcaloidi. Rane della famiglia *Dendrobatidae*, furono catturate e allevate in cattività, nutrite con una dieta a base di mosche della frutta, che contenevano uno o più alcaloidi. Si dimostrò che alcuni alcaloidi venivano accumulati non modificati nella pelle della rana. Nell'autunno del 1994, Daly avviò un ulteriore progetto riguardante la sintesi degli alcaloidi nei dendrobatidi. Questi ed altri esperimenti dimostrarono la presenza di un sistema di captazione degli alcaloidi da parte dei dendrobatidi in particolare per pirrolizidine, indolizidine, chinolizidine, decaidroquinoline, istrionicotossine, pumiliotossine, e batracotossine. Sulla base degli studi appena citati, si capì che il sistema di assorbimento di alcaloidi era proprio delle rane della famiglia *Dendrobatidae*, nei generi, *Dendrobates*, *Epipedobates*, e *Phylllobates*,

ma risultava assente nelle rane del genere *Colostethus*. Successivamente, studi di alimentazione rivelarono che la capacità di sequestrare alcaloidi era presente anche nei membri del genere *Adelphobates*. Daly stabilì che tale sistema di assorbimento alimentare, era proprio anche dei mantellidi del Madagascar. Entrambi i generi erano in grado di accumulare pumiliotossine dalla dieta. Daly rivolse la sua attenzione alla sperimentazione in campo, nel tentativo di trovare un collegamento tra gli alcaloidi contenuti negli artropodi e gli alcaloidi ritrovati nella pelle delle PF. Giunse alla conclusione che nelle rane alimentate con una dieta priva di insetti mancavano degli alcaloidi caratteristici delle rane selvatiche. Al contrario, in rane nutrite con artropodi dell'humus, erano presenti gli alcaloidi, anche se in quantità inferiore rispetto a quelle selvatiche. Appariva ormai chiaro che le PF erano in grado di ricavare alcaloidi da fonti alimentari e che queste fossero artropodi contenenti alcaloidi disponibili nell'ambiente.

Identificazione delle fonti alimentari.

Per completare l'ipotesi alimentare è necessario identificare le fonti alimentari da cui vengono sintetizzati gli alcaloidi presenti nelle PF [11]. Anche se gli artropodi erano stati considerati la fonte principale per alcune delle classi di alcaloidi, per oltre 500 composti non è ancora stata proposta una possibile fonte alimentare. Fino a pochi decenni fa, si pensava che la dieta di alcuni dendrobatidi fosse in gran parte composta da formiche e acari (sei delle 28 classi strutturali di alcaloidi furono identificate nelle formiche *myrmicinae*). Dalle ricerche emerse come le formiche rappresentassero una fonte importante di alcaloidi per le PF. Altre due classi

di alcaloidi presenti nella pelle delle rane vennero identificate negli artropodi: la classe delle coccinelline tricicliche, prodotte da coleotteri coccinellidi, e la classe delle spiroirrolizidine da millepiedi. Per approfondire gli studi, Daly esaminò i profili degli alcaloidi di *Oophaga pumilio* (Panama), scoprendo numerosi nuovi alcaloidi. Fu una sorpresa scoprire le pumiliotossine in formiche *Formicinae*, note per l'uso di acido formico come metabolita difensivo. Nel 2005 numerosi alcaloidi comuni nelle PF vennero identificati in diverse specie di artropodi. Nonostante ciò, anche dopo numerose raccolte dettagliate di artropodi in natura, era stata identificata solo una frazione (26 alcaloidi da formiche, 5 da coleotteri, e 6 da millepiedi) degli oltre 800 alcaloidi presenti nelle PF. Uno studio fondamentale, svolto nel 2005, riguardo la presenza di alcaloidi in acari oribatidi in Giappone, portò all'identificazione di più di 80 alcaloidi estratti da acari oribatidi, tra cui indolizidina 5,8-disostituita e 5,6,8-trisostituita (gli alcaloidi più abbondanti nella pelle di rana in tutto il mondo), pumiliotossine, chinolizidina 1,4-disostituita, chinolizidina 4,6-disostituita, indolizidina 3,5-disostituita, 2-pirrolidine e spiroirrolizidine [5]. In ultima analisi, le formiche rappresentano la fonte dietetica più probabile di alcaloidi a struttura lineare, mentre gli acari per gli alcaloidi ramificati. Delle 28 classi strutturali di alcaloidi presenti nelle PF, 17 provengono da fonti alimentari, compresi acari, formiche, scarafaggi e millepiedi. Il gran numero e la varietà di alcaloidi presenti negli acari sembrerebbe spiegare alcune delle difficoltà iniziali nell'individuazione delle fonti alimentari, ma getta le basi per nuove speculazioni. Molti degli alcaloidi (pumiliotossine) che sono stati identificati negli acari, si ritrova-

no anche in altri taxa. Ciò suggerisce come le fonti alimentari di alcaloidi nelle rane velenose siano molteplici e possano avere un precursore acaro-formica comune. Le diverse specie di PF sono solite cibarsi di formiche e acari, che rappresentano più del 20% della dieta. *Allobates femoralis* è un genere che si distingue tra i dendrobatidi, a causa delle diverse abitudini alimentari rispetto alle altre specie esaminate. Nonostante si cibi di una vasta gamma di prede, non evita totalmente le formiche, che

rappresentano il 6% della dieta. Anche le specie di *Colostethus* si cibano di una notevole varietà di artropodi, e formiche. E' stato osservato che i vertebrati, che si cibano di artropodi, tendono ad avere una dieta varia. La presenza di pumiliotossine in formiche dei generi *Brachymyrmex* e *Paratrechina*, e la presenza di queste formiche, nella dieta di *Dendrobates pumilio* influenza la produzione di tossine alcaloidee. Le formiche del genere *Brachymyrmex* e *Paratrechina* rappresentano le sole fonti ali-

mentari note di tali alcaloidi. Le rane appartenenti ai generi *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Phyllobates* e *Mantella*, allevate in cattività non producono quantità di alcaloidi rilevabili, ma possiedono la capacità di accumularli attraverso la dieta. E' interessante notare come il livello di tossicità degli alcaloidi non sia lo stesso tra i dendrobatidi. Alcune specie e alcune popolazioni all'interno di una stessa specie, risultano meno tossiche rispetto ad altre. I coleotteri della famiglia *Staphylinidae* sono noti per la produzione di alcaloidi e sono presenti nelle diete delle quattro specie di PF. Da ulteriori studi è emerso che insetti quali coleotteri, imenotteri, tricotteri, e neurotteri sono in grado di produrre alcaloidi difensivi. Gli alcaloidi possono persistere per anni nella pelle delle rane, e il loro profilo tossicologico è dipendente dall'accumulo di tali composti nel corso dell'intera vita dell'animale [12]. Generalmente le PF non alterano la struttura chimica degli alcaloidi assunti con la dieta, ma esistono alcune specie in grado di modificarne la struttura, anche se non è stato possibile dimostrare come e perché alcuni alcaloidi subiscano un processo di modificazione strutturale mentre altri rimangano invariati. Un esempio interessante di questo fenomeno coinvolge pumiliotossina e allopumiliotossina. Esistono alcune specie di PF che si nutrono di artropodi contenenti una specifica pumiliotossina su cui sono in grado di effettuare un'idrossilazione selettiva, così da ottenere un'allopumiliotossina. La reazione viene effettuata solo sull'enantiomero D della pumiliotossina. Nonostante non sia ancora chiaro dove di fatto avvenga tale idrossilazione (potrebbe avvenire nel fegato, subito dopo l'ingestione, oppure dopo averlo depositato all'interno delle ghiandole), si è certi che la rea-



Foto di Corine Bliet

Gli elaborati disegni sulla pelle e i colori sono volutamente appariscenti per scongiurare potenziali predatori, tattica nota come colorazione aposematica.

zione avvenga per mezzo di uno specifico enzima che determina un incremento della tossicità della sostanza di circa 5 volte. Probabilmente l'aumento della tossicità permette alla rana una maggior protezione nei confronti dei predatori [13].

I canali del sodio voltaggio dipendenti

I canali del sodio voltaggio-dipendenti giocano un ruolo chiave nella fisiologia delle cellule eccitabili. Rappresentano il bersaglio di numerose classi di tossine e farmaci (Figura 4). Le tossine più pericolose presenti in natura sono batracotossina (BTX) e tetradotossina che presentano un meccanismo d'azione che coinvolge tali canali. Esempi di farmaci che interagiscono con i suddetti canali includono anestetici locali, antianginosi, e farmaci per il trattamento della schizofrenia e dell'epilessia. Un'altra importante applicazione di leganti il canale del sodio è rappresentata dagli insetticidi. Nonostante in letteratura siano presenti numerosi studi farmacologici, tossicologici e una vasta gamma di applicazioni pratiche, i siti di legame e i meccanismi di azione dei ligandi dei canali del sodio sono ancora oggetto di ricerca. Si tratta di canali ionici che permettono l'ingresso di ioni Na^+ all'interno delle cellule (cellule eccitabili). Sono presenti in gran numero a livello del cono d'emergenza dell'assone nei motoneuroni, dove generano il potenziale d'azione, e a livello dei nodi di Ranvier dove garantiscono la progressione dell'impulso nervoso. Si ritrovano anche a livello del sistema di conduzione cardiaco ove permettono la generazione e la trasmissione di stimoli pacemakers. Caratterizzati da cinetiche di attivazione e inattivazione estremamente rapide (1-10 ms), sono formati da una subunità fondamentale

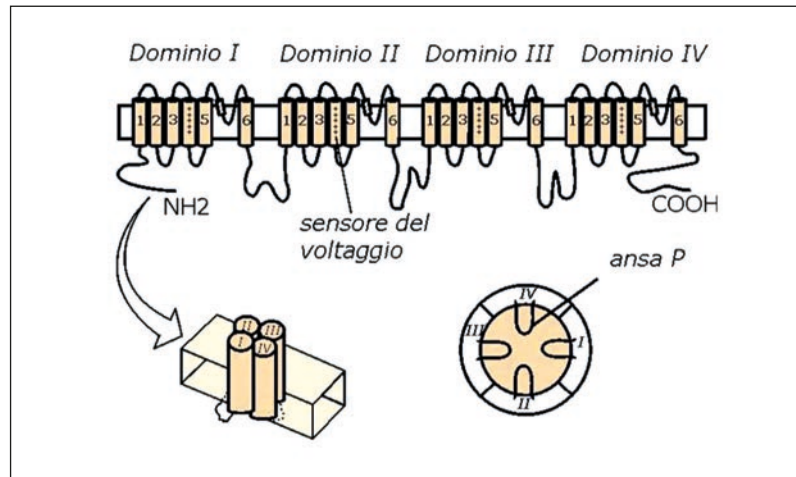


Figura 4: rappresentazione dei canali del Sodio voltaggio-dipendenti e relativi domini (Mod. da D'Angelo, 2011) [14]

(subunità α) e da subunità accessorie (subunità β). La subunità α è responsabile di tutte le proprietà farmacologiche ed elettrofisiologiche. Contiene dei siti di fosforilazione intracellulari utilizzati da *protein-chinasi* che possono favorire lo stato di inattivazione del canale voltaggio-dipendente. E' formata da 4 domini identici che si associano a formare un tetramero. Ciascun dominio è formato da 6 α -eliche transmembrana (S1-S6)v e da un'ansa interna che collega la S5 con la 6a α -elica transmembrana. Tale sequenza delimita la parete interna del poro-canale e rappresenta il filtro di selettività del poro ovvero il gate di attivazione.

Altra proprietà importante dei canali voltaggio-dipendenti riguarda le variazioni del potenziale di membrana, controllate dalla quarta α -elica transmembrana che presenta residui di arginina carichi positivamente ogni tre aminoacidi idrofobici lungo la spirale, che si affaccia sul lume del canale. In tal modo si costituisce una struttura ad α -elica le cui cariche positive, interagendo con il potenziale negativo intracellulare, mantengono il segmento ancorato verso l'interno della membrana. Al verificarsi di variazioni del potenziale di membrana si assi-

ste ad una depolarizzazione per cui i residui di arginina vengono respinti dall'interno con conseguente apertura del poro. Altra parte importante è la sequenza aminoacidica formata da aminoacidi idrofobici che collega l'ultima α -elica del III dominio con la prima α -elica del IV dominio. Questa sequenza di aminoacidi idrofobici corrisponde al gate di inattivazione del canale, cioè quella sequenza di aminoacidi che durante il ciclo di depolarizzazione e ripolarizzazione assume una conformazione che chiude il canale interno, impedendo il passaggio ionico. Lo stato di chiusura del canale è determinato dal gate di attivazione chiuso e dal gate di inattivazione aperto. Lo stato di apertura del canale è determinato dall'apertura dei gates di attivazione e inattivazione.

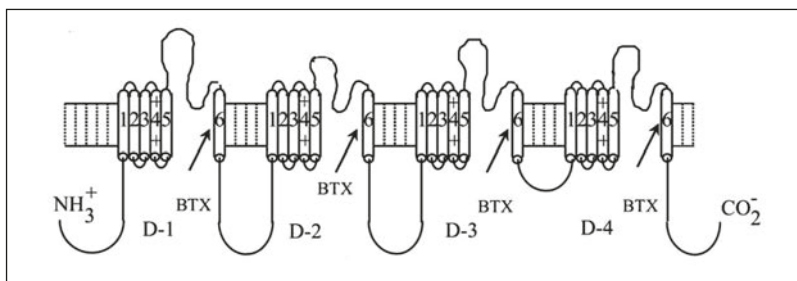
Lo stato di inattivazione del canale è determinato dall'apertura del gate di attivazione e dalla chiusura del gate di inattivazione che resta chiuso fin quando non avviene una nuova ripolarizzazione prodotta dall'uscita di K^+ dalla cellula [14-5]. BTX, aconitine, veratridine e grai-notossine sono composti noti come attivatori del canale del sodio (agonisti). In presenza di tali composti la soglia di attivazione è spostata verso valori

negativi in prossimità del potenziale di riposo, l'inattivazione è abolita e i canali rimangono costantemente aperti. Le BTX si legano specificatamente ai canali del sodio voltaggio-dipendenti delle membrane nervose e muscolari e alterano significativamente la funzione del canale mediante quattro modalità:

nale (aperto, chiuso, e inattivato) favorendo lo stato di apertura. L'attivazione del canale del sodio è irreversibile.

Dalle evidenze sperimentali è possibile assumere che tutti e quattro i segmenti S6 da D1-D4 possono formare il recettore per BTX nella cavità interna (Figura 5).

Figura 5:
legame della
batracotossina
al segmento S6
dei canali del
sodio



- 1 variazione della soglia di attivazione del canale, portandola ad un valore di 30-50 mV, con conseguente iperpolarizzazione di membrana;
- 2 oppressione o riduzione dell'inattivazione del gating. Ciò comporta che i canali rimangono nella conformazione aperta per ore;
- 3 riduzione della conduttanza singolo canale fino al 50%;
- 4 alterazione della selettività ionica dei canali del sodio voltaggio-dipendenti.

BTX può legarsi ad un canale del sodio solo quando il canale è nella sua conformazione aperta. La capacità delle BTX di costituire un legame con la proteina-canale dipende dalla sequenza amminoacidica della proteina Q. L'ammina terziaria protonata della tossina si lega al gruppo aromatico di un residuo di fenilalanina.

Le sostituzioni amminoacidiche impediscono questo tipo di interazione elettrostatica, e quindi la capacità di legame di BTX con i canali del sodio. La tossina, una volta legata, agisce sulle possibili conformazioni del ca-

Come fanno le PF a non avvelenarsi?

Se le rane velenose sono ciò che mangiano, come fanno a non avvelenarsi durante il processo? Qualsiasi pianta o animale che utilizza composti chimici per la difesa deve sviluppare delle modalità per impedire a tali sostanze di intossicare se stesso. Ad esempio, stoccando le stesse al proprio interno, isolandole da funzioni importanti per la propria sopravvivenza. Nelle PF, gli alcaloidi vengono trasportati e immagazzinati in ghiandole velenifere a livello della pelle dove sono pronti a difendere l'animale da predatori e/o agenti patogeni. Tuttavia, isolare gli alcaloidi in una parte del corpo non è l'unico modo per prevenire l'avvelenamento. Per evitare gli effetti tossici delle proprie secrezioni, le PF hanno effettuato dei cambiamenti al proprio corredo genetico. I canali ionici nei sistemi nervoso e muscolare sono il bersaglio più comune degli alcaloidi delle rane ed è all'interno di questi canali proteici che le PF hanno sbloccato la capacità di nutrirsi prede tossiche.

Tuttavia, nutrirsi di prede tossiche senza subirne gli effetti dannosi non è così semplice quando ogni singolo alcaloide possiede diversi effetti fisiologici che devono essere evitati. Ad esempio, le BTX, agiscono sul tessuto nervoso e muscolare legandosi permanentemente ai canali del sodio sulla membrana cellulare e mantenendoli aperti. Ciò provoca una depolarizzazione della cellula e impedisce l'invio di ulteriori segnali. Allo stesso modo, le pumiliotossine possono influenzare il muscolo cardiaco prolungando l'apertura dei canali del sodio. Le 5,8-indolizidine, decaidrochinoline e spiroirrolizidine sono bloccanti non competitivi dei recettori nAChR, in grado di interrompere la normale funzione delle cellule nervose e muscolari. La maggior parte degli animali che producono metaboliti difensivi, come il pesce palla (tetrodotossina) o i rospi (bufadienolidi), devono evitare la tossicità di un esiguo numero di composti, al contrario le PF devono contemporaneamente proteggersi da numerosi alcaloidi. Non è completamente noto il meccanismo mediante il quale le PF sono in grado di evitare gli effetti tossici dei loro stessi alcaloidi, tuttavia è noto come siano in grado di influenzare i canali del sodio e i nAChR. Quando un predatore attacca una PF, gli alcaloidi trovano immediatamente la strada verso i canali del sodio o i nAChR del predatore, che sono fondamentali per mantenere i muscoli in movimento e i neuroni attivi. Tuttavia, le PF sembrano aver trovato un modo intelligente per aggirare gli effetti del loro stesso veleno. Sebbene alcuni dettagli siano ancora oscuri, sembra che queste rane abbiano apportato modifiche specifiche ai propri canali del sodio e ai nAChR nelle cellule nervose e muscolari (Figura 6) [5].

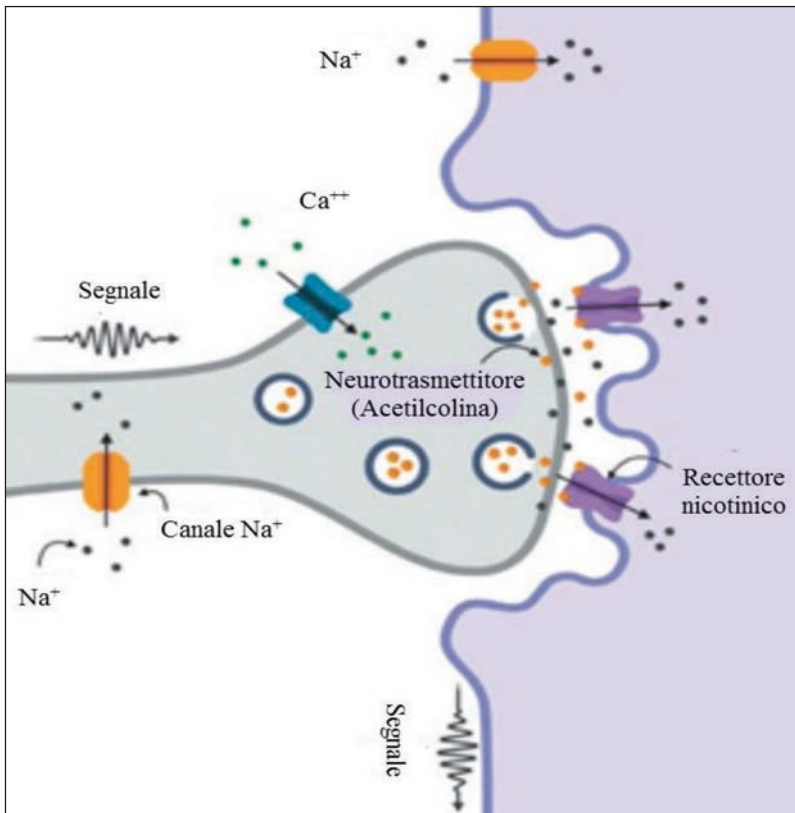


Figura 6: struttura della giunzione neuromuscolare (Mod. da Brooks, 2019) [13]

I canali del sodio e i nAChR delle rane velenose sono proteine costituite da una combinazione unica di aminoacidi. Sostituendo alcuni aminoacidi specifici con altri, le PF sono in grado di evitare gli effetti dei propri alcaloidi perché non sono più in grado di legarsi a tali canali [15]. Tuttavia, anche all'interno delle PF, non tutte le specie hanno le stesse sostituzioni. Gli alcaloidi assunti con la dieta svolgono un ruolo importante nell'evoluzione dei canali del sodio, dei nAChR e della sequenza aminoacidica. Scoprire come le PF evitano di avvelenarsi richiederà ulteriori studi, ma sembra probabile che implichi un meccanismo simile a quello già scoperto.

Bufo nella storia

Bufo fa parte della storia e della cultura dell'umanità da tempo immemorabile: secondo Furst l'utilizzo del veleno di *Bufo* ha avuto inizio con l'uomo di Ne-

anderthal [16]. Il fascino legato alla figura, al comportamento e alle proprietà del veleno, considerati dai popoli antichi soprannaturali e magici, ha permesso la genesi di miti e rituali che sono stati tramandati sino ai nostri giorni. Tra le prime testimonianze riguardanti l'utilizzo di *Bufo* per le proprietà psicoattive, vi sono iconografie religiose appartenenti al popolo azteco, dove sono raffigurati rospi con le ghiandole parotidi molto accentuate. Questo fatto fa pensare che gli Aztechi fossero consapevoli che il veleno contenuto fosse responsabile dello stato di trance raggiunto durante i rituali sciamanici. Gli usi *Bufo* si estendono anche agli Olmechi e ai Maya e che ne utilizzavano il veleno per indurre allucinazioni [17]. I resti di *Bufo marinus* rinvenuti nei luoghi di culto non potevano essere componenti della normale alimentazione perché decisamente troppo tossici. Questo

ha portato a pensare che fossero impiegati saltuariamente in occasione di rituali religiosi [18, 19]. A tale proposito l'esploratore e frate Domenicano Friar Thomas Gage riporta che i Maya Potomam producevano una bevanda rituale fermentata chiamata "Chacha", che conteneva acqua, melassa, miele e radici. Alla bevanda veniva aggiunto un rospo ancora vivo e mantenuto chiuso nel vaso per 15-30 giorni. Secondo Furst, l'animale veniva inserito nella bevanda al fine di conferire ulteriore potenza al preparato

Stagni e piccoli specchi d'acqua rappresentano l'habitat ideale di rane e rospi



[20]. L'utilizzo di *Bufo* è stato documentato anche in Africa, presso le tribù nigeriane Yoruba, che erano solite cospargere il corpo di veleno prima della processione celebrativa del culto di Enungan, al fine di alleviare la fatica e aumentare la resistenza fisica. Durante la processione cadevano in uno stato di frenesia ma senza mostrare segni di dolore: secondo la tradizione l'azione analgesica era data dal veleno utilizzato come unguento [21]. Il misticismo legato a *Bufo* assume un significato completamente differente nella cultura medievale europea: rappresentava un elemento demoniaco, utilizzato nelle pratiche e nei riti di stregoneria. Risulta necessario precisare che la connessione tra *Bufo* e mondo delle stregoneria risale a tempi ben più antichi. Sono riportate numerose testimonianze legate all'uso di *Bufo* all'interno di pozioni e filtri (preparate da coloro che venivano definite streghe), considerato un animale dotato di poteri soprannaturali. Estremamente popolare era il cosiddetto "unguento per il volo" usato dalle streghe per volare ai sabba. L'illusione del volo e altri effetti magici sperimentati dalle streghe avevano, con tutta probabilità, una base puramente farmacologica. Probabilmente, bufotenina e analoghi venivano combinati con altre erbe magiche fra cui erano presenti Belladonna, Mandragora e Giusquiamo, per sfruttarne le proprietà allucinogene e potenziare l'effetto della bufotenina. La teoria legata alla psicofarmacologia ha origine nel 1451, quando il Vescovo Cattolico di Avila Alfonso de Torado affermava che:

"Il volo e la trasfigurazione non erano né poteri soprannaturali, né menzogne, ma semplicemente erano effetti allucinogeni dati dalle sostanze presenti negli unguenti".

Gli effetti del "trip" provocato

da *Bufo* e Belladonna [22] includevano:

"La sensazione di volare e di essere trasformati in un uccello o un altro animale [...]. La sensazione che la pelle si trasformasse in pelliccia o piume o nella pelle verrucosa di un rospo"

È interessante osservare come il fascino e la curiosità suscitati dalle proprietà allucinogene di *Bufo* non siano rimasti confinati a epoche lontane, ma abbiano ispirato anche le generazioni più moderne. Tra il 1988 e il 1992 prese piede un nuovo fenomeno conosciuto come "Toad licking", pratica che consiste nel leccare il veleno dal dorso del rospo al fine di cadere in uno stato di trance, come accadeva nella cultura sciamanica. A causa dell'esposizione mediatica, questo fenomeno rischiò di trasformarsi in una potenziale epidemia. Come contromisura, la bufotenina fu inclusa dalla Food and Drug Administration tra le sostanze controllate, e successivamente considerata illecita da Stati Uniti, Canada, Sud America, Centro America e Australia. L'attività allucinogena della bufotenina è correlata alla analogia strutturale con la psilocibina e il neurotrasmettitore serotoninico. Questa similarità impartisce alla bufotenina una buona affinità con i recettori serotoninergici. Considerando che la bufotenina e la 5-MeO-DMT sono entrambi inattivi per via orale, ci si interroga su cosa induca l'azione allucinogena. Secondo studi condotti da Jonathan Ott, bufotenina e 5-MeO-DMT presentano un'azione equivalente sia se somministrate per via intranasale che per via sublinguale. Si può, quindi, ipotizzare che una percentuale di queste due sostanze venga assorbita per via sublinguale, scatenando in tal modo, l'esperienza allucinogena [23].

In conclusione, quattro decenni di ricerca sugli alcaloidi estratti

dalla pelle di anuri hanno portato alla luce più di 800 composti, molti dei quali ancora sconosciuti. La maggioranza di questi alcaloidi presenti in ghiandole epiteliali anure, sembra provenire in forma immutata da fonti alimentari. Sono stati ottenuti risultati che attestano tale ipotesi e ammettono come fonti principali formiche, acari, scarafaggi e millepiedi.

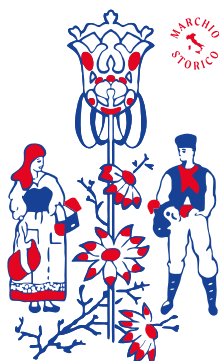
Tuttavia, le strutture e le origini alimentari dei numerosi alcaloidi rimane una sfida per il futuro. Le vie biosintetiche che portano alla formazione dei suddetti composti e il significato funzionale è ancora oggetto di studio. Il fenomeno del "Toad Licking" che ha visto coinvolti interi stati è stato portato alla luce dai media e dalla stampa, che hanno trasformato un fenomeno isolato in una vera e propria mania grazie a titoli come "the psychedelic toad".

* **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA**
Dipartimento di Scienze del Farmaco,
** **Azienda Speciale Farmacie Comunali, Peschiera Borromeo**
*** **Fondazione Istituto Neurologico Nazionale "Casimiro Mondino", Pavia**

Bibliografia

1. Doris M. Cochran: Il libro degli anfibi, 1963.
2. Lyttle T., Goldstein D., Gartz J. Bufo Toads and Bufotenine: Fact and Fiction Surrounding an Alleged Psychedelic, *Journal of Psychoactive Drugs*, 28:3, 267-290, 1996.
3. Davis W., Weil A.T. Identity of a New World psychoactive toad. *Ancient Mesoamerica*, 3 (1): 51- 59, 1992.
4. Bucher & Buckley. *Venomous Animals and their Venoms*. New York: Academic Press., 1971.
5. Saporito R.A., Donnelly A., Spande T.F., Garraffo H.M. A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology*, 22: 159-168, 2012.
6. Sho-Ya Wang, Jane Mitchell, Denis B. Tikhonov, Boris S. Zhorov, and Ging Kuo Wang: How Batrachotoxin Modifies the

- Sodium Channel Permeation. Pathway: Computer Modeling and Site-Directed Mutagenesis. *Molecular Pharmacology*, 69: 788-795, 2006.
7. John W. Daly, Charles W. Myers, Noel Whittaker: Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon*, Vol. 25, No. 10, p. 1023-1095, 1987.
 8. Salehi B, Sestito S, Rapposelli S, Peron G, Calina D, Sharifi-Rad M, Sharopov F, Martins N, Sharifi-Rad J. Epibatidine: A Promising Natural Alkaloid in Health. *Biomolecules*. 2018 Dec 23, 9 (1):6, 2018.
 9. Grant T., Frost D.R., Caadwell J.P., Gagliardo R., Haddad C.F.B., Kok P.J.R., Means D.B., Noonan P.B., Schargel W.E., Wheeler W.C. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 2006.
 10. Adriana M. Jeckel, Ralph A. Saporito and Taran Grant: The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Frontiers in Zoology*, 2015
 11. Ralph A. Saporito, Maureen A. Donnelly, Thomas F. Spande, H. Martin Garraffo: A review of chemical ecology in poison frogs. *Chemoecology*, 22: 159-168, 2012.
 12. Janalee P. Caldwell: The evolution of myrmecophagy and its correlates in poison frogs (Family Dendrobatidae). *The Zoological Society of London*, 240, 75-101, 1996.
 13. Olivia L. Brooks, Ralph A. Saporito; For poison frogs, bitter is better. *Biochem (Lond)*, 41 (6): 16-20, 2019.
 14. D'angelo E., Peres A. *Fisiologia*, Edi. Ermes Eds., 2011
 15. Tarvin R.D., Santos J.C., O'Connell L.A., Zakon, H.H., Cannatella D.C. Convergent substitutions in a sodium channel suggest multiple origins of toxin resistance in poison frogs. *Mol. Biol. Evol.*, 33, 1068-1081, 2016.
 16. Furst, P.T. *Flesh of the Gods: The Ritual Use of Hallucinogens*. New York: Praege, 1972
 17. Weaver M. *The Aztecs, Maya and their Predecessors*. New York: Seminar Press, 1972.
 18. Furst P.T. The toad as Earth Mother : A problem in symbolism and psychopharmacology. In: P.T. Furst (Ed.) *Hallucinogens and Culture*. Novato, California: Chandler & Sharp, 1985.
 19. Dobkin de Rios M. The influence of psychotropic flora and fauna on Mayan religion. *Current Anthropology*, 15 (2): 147-64, 1974.
 20. Thompson, J.E.S. *The Rise and Fall of the Maya Civilization*. Norman: University of Oklaahoma Press, 1954.
 21. Ekenevall, A. *Batrachians as Symbols of Life, Death, and Woman*. Translated from the Swedish by B. and E. Frykman. Goteborg University Library, 1978.
 22. Allen A. *Toads: The biochemistry of the witches cauldron*. *History Today* 29:265-68; Fletcher, R 1896. *The Witches pharmacopeia*. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 7 (65): 147-56, 1979.
 23. Ott J. *Pharmañopo-psychonautics: human intranasal, sublingual, intrarectal, pulmonary and oral pharmacology of bufotenine*. *J Psychoactive Drugs*, 33 (3): 273-81, 2001.



A. MINARDI & FIGLI
S.R.L.



Via Boncellino 32 - 48012 Bagnacavallo (Ra)

**90 anni di esperienza
nella lavorazione e nel commercio all'ingrosso
delle piante officinali**

Tel. (0545) 61460 – Fax (0545) 60686 – <http://www.minardierbe.it> – e-mail: info@minardierbe.it