

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Papaver somniferum L. ed oppio: una continua sfida scientifica

Relatore

Prof.ssa Federica Pollastro

Candidato

Minozzi Claudia

Correlatore

Dr. Stefano Salamone

Anno Accademico 2023-2024

Sessione Autunnale

*Ai miei genitori e alle mie sorelle,
per aver creduto in me fin dal primo istante.
A me stessa, per non aver mai mollato.*

ABBREVIAZIONI:

- 4-HPAA: 4-idrossifenilacetaldeide
- 4-HPP: 4-idrossifenilpiruvato
- 4-HPPDC: 4-idrossifenilpiruvato decarbossilasi
- 4OMT: 3-idrossi-*N*-metilcocclaurina-4-*O*-metiltransferasi
- 4OMT: 3-idrossi-*N*-metilcocclaurina-4-*O*-metiltransferasi
- 5-HT: serotonina
- 6-MAM: 6-monoacetilmorfina
- 6OMT: norcocclaurina-6-*O*-metiltransferasi
- 7OMT: reticolina-7-*O*-metiltrasferasi
- ADH: ormone antidiuretico
- BEE: enzima ponte della barberina
- BIA: alcaloidi benzil-isochinolinici
- BP: British Pharmacopoeia
- CAS: canadina sintasi
- cDNA: DNA complementare
- CNMT: (*S*)-cocclaurina *N*-metiltrasferasi
- CODM: codeina-*O*-demetilasi
- CoR: codeinone reduttasi
- CPS: paglia concentrata di papavero
- CTZ: Chemoceptor Trigger Zone
- DA: dopamina
- DBOX: diidrofenantridina ossidasi
- DCC: DOPA decarbossilasi
- DI: deionized
- DRR: 1,2 deidroreticulina reduttasi
- DRS: 1,2-deidroreticulina sintasi
- EFSA: Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare
- EMS: etilmetansolfonato
- EP: European Pharmacopoeia
- F.F.: Forme Farmaceutiche
- GABA: acido gamma-aminobutirrico
- Gi: proteina G inibitoria
- GMP: Good Manufacturing Practice
- Gs: proteina G stimolatoria
- HPLC: high performance liquid chromatography
- L-DOPA: levodopa
- L-Tyr: L-tirosina
- MS: mass spectrometry
- N7OMT: norreticulina-7-*O*-metiltrasferasi
- NA: noradrenalina

- NCS: norcoclorina sintasi
- NISO: neopinone isomersi
- NMCH: (*S*)-*N*-metil-3-coclorina-idrossilasi
- NOS: noscapina sintasi
- PPO: polifenolo ossidasi
- REPI: reticulina epimerasi
- SalR: salutaridina-7-ossidoreduttasi
- SalSyn: salutaridina sintasi
- SOMT: scloureina-9-*O*-metiltrasferasi
- STORR: reticulina (S) to (R)
- T6ODM: tebaina-6-*O*-demetilasi
- TEA: trietilamina
- TFA: acido trifluoroacetico
- TH: tirosina idrossilasi
- THS: tebaina sintasi
- TMO: Toprak Mahsulleri Ofisi
- TNMT: tetraidroprotobarberina *N*-metiltrasferasi
- TOP1: tebaina oripavina papavero 1
- TPOX: tetraidropapaverina ossidasi
- TyDC: tirosina-DOPAdecarbossilasi
- TyrAT: tirosinaminotrasferasi
- UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime
- USP: United States Pharmacopeia
- UV: ultravioletto
- WFI: Water For Injection

INDICE

1. SOMMARIO	1
2. INTRODUZIONE	2
2.1 Il <i>Papaver somniferum</i> L. e la sua etnobotanica	2
3. FITOCHIMICA DEL PAPAVER SOMNIFERUM.....	11
3.1 <i>Papaver somniferum</i>	11
3.2 La raccolta del lattice e la paglia di papavero	14
3.3 Gli alcaloidi del <i>Papaver somniferum</i>	17
3.4 Biosintesi degli alcaloidi del papavero.....	19
3.5 Regolazione dell'espressione genica nel <i>Papaver somniferum</i>	27
3.6 Studi di localizzazione cellulare.....	28
3.7 Miglioramento del profilo genetico del papavero	31
3.8 Estrazione e purificazione alcaloidi del papavero.....	34
4. ASPETTO FARMACOLOGICO DEGLI ALCALOIDI DELL'OPPIO.....	41
4.1 I recettori degli oppioidi ed i loro ligandi endogeni ed esogeni.....	41
4.2 Principali impieghi degli alcaloidi più importanti.....	44
4.3 Principali effetti collaterali degli oppiacei	45
5. USI ILLECITI DEGLI OPPIACEI	48
5.1 Produzione illecita di eroina.....	48
5.2 Una nuova droga d'abuso: la "purple drank"	50
6. SCREENING FITOCHIMICO DELL'OPPIO.....	51
6.1 Screening fitochimico dell'oppio	51
6.2 Test presuntivo degli oppiacei: il saggio di Marquis.....	52
7. Conclusioni.....	55
8. Bibliografia.....	56
Ringraziamenti	58

1. SOMMARIO

Con il termine oppio si intende il lattice essiccato ottenuto per incisione del frutto immaturo di *Papaver somniferum*. L'oppio da subito ha avuto una notevole importanza etnobotanica al punto di essere al centro di sanguinosi conflitti, arrivando fino ai nostri giorni, in virtù delle proprietà farmacologiche dei numerosi alcaloidi in esso contenuti, in particolar modo dalla morfina e codeina. Alcuni dei suoi derivati semisintetici come l'eroina oggi sono al centro dei più grossi traffici illeciti e sostanze d'abuso in tutto il mondo, ma, nonostante ciò, l'utilizzo e le coltivazioni di papavero d'oppio rappresentano un valore farmacologico troppo importante per potersene privare.

Questo lavoro di tesi vuole ripercorrere la storia dell'oppio e mettere in evidenza i suoi alcaloidi più importanti e gli attuali utilizzi sia da un punto di vista terapeutico che sociale.

2. INTRODUZIONE

2.1 Il *Papaver somniferum* L. e la sua etnobotanica

Il *Papaverum somniferum* L. è una delle piante medicinali più antiche della storia, la scoperta, l'utilizzo e la coltivazione di questa pianta risale a millenni di anni fa fin dai tempi del neolitico e da allora non è mai stata abbandonata. Sono infatti molti i popoli antichi che hanno utilizzato questa pianta, in particolare l'oppio, il lattice essudato e successivamente essiccato all'aria che viene ricavato dalla capsula immatura del frutto attraverso un'incisione (Schiff, P. L. 2002).

L'oppio nell'antichità: usi e preparazioni

Il *P. somniferum* è stato coltivato soprattutto per ricavare il suo lattice, denominato oppio, il cui utilizzo risale ai tempi dei Sumeri (3000 a.C.) testimoniato grazie al ritrovamento di tavolette mediche raffiguranti una pianta che sembra essere proprio il papavero da oppio. La pianta era considerata dalla popolazione la pianta della gioia "Hul-Gil" consapevoli degli effetti psicoattivi ed euforizzanti e ne raccoglieva il succo mettendolo in vasi di terracotta per poi produrre l'oppio.

L'oppio ai tempi faraonici del XVI secolo a.C.

Sebbene la diffusione dell'oppio tra i popoli dell'antico Egitto pare sia riconducibile ai commerci che avvenivano con i popoli greci, certo è che la sua presenza è testimoniata dal ritrovamento di piccoli vasi all'interno di sarcofagi, i quali vennero successivamente repertati nel 1925 da alcuni biologi, identificando tracce di morfina. Nelle tombe, compresa quella di Tutankamon, furono inoltre repertati vari oggetti, come ad esempio orecchini e collane con una forma rotondeggiante e delle incisioni che sembrerebbero rappresentare proprio capsule di *P. somniferum* incise. Infine, in uno dei più famosi testi medici egiziani, il trattato di Erbes (1550 a.C.) sono citati dei preparati a base di oppio impiegati per sedare il pianto dei bambini¹.

L'Egitto fu una tappa fondamentale per la diffusione dell'oppio verso l'Oriente ma anche verso l'Occidente. Infatti, nel Mediterraneo orientale l'importanza di questo essudato trova ragione nella mitologia sia greca che romana: la pianta e il suo "succo" sono menzionati nei più importanti poemi greci:¹ l'Iliade e l'Odissea, in cui si narra l'utilizzo di oppio da parte di numerose divinità della mitologia. In questi testi si narra il suo impiego per indurre sonno, scacciare via le paure, tristezza e brutti pensieri causati da avvenimenti e vicende dolorose considerandolo quindi come un "simbolo" di consolazione.

¹ <https://samorini.it/>

La mitologia narra come l'oppio venne impiegato per alleviare il dolore della Dea della terra, Demetra, sorella di Zeus, provocato dal rapimento di sua figlia (Canali, 2016). Sono moltissime le divinità raffigurate con preziose corone costituite da fiori di papavero o che tengono tra le mani l'intera pianta (Figura 1); le numerose narrazioni indicano come Morfeo utilizzasse il papavero per indurre il sonno come rimedio infallibile usato per distogliere il pensiero da tragiche vicende (Schiff, P. L. 2002).



Figura 1 Raffigurazione di una scultura della Dea Demetra che afferra tra le mani il papavero.

In alcuni scavi archeologici effettuati tra il 1800 e 1900 a Cipro e Creta furono ritrovati contenitori in ceramica risalenti al 500-400 a.C. dove vennero identificati tracce di morfina, grazie alla analisi eseguite in tempi recenti². Di oppio ne parlò il più importante medico dell'antica Grecia, Ippocrate (V sec. a.C.) ma anche altri noti filosofi e poeti greci che descrissero per la prima volta come il lattice venisse ricavato dalle capsule di papavero. Inoltre, durante questo periodo si diffuse la "teriaca", una sorta di pozione che oltre all'oppio è costituita da molti altri ingredienti (tra cui carne di vipera). La teriaca fu utilizzata come panacea per qualsiasi tipo di affezione: dal dolore provocato dalle coliche, alla diarrea, fino alle varie pestilenze dell'epoca, come la lebbra (Canali, 2016).

Venne infatti impiegata dai più celebri medici greci: Andromacco il vecchio e Galeno per curare rispettivamente i potenti imperatori Nerone e Marco Aurelio; a quest'ultimo infatti vennero somministrate alte dosi di teriaca, fino a diventarne dipendente (Lugoboni, F. et al., 2015) (Figura 2).

Così, grazie alla medicina greca l'oppio si diffuse anche ai tempi dell'antica Roma (I-II d.C.) dove venne considerato un valido antidoto



Figura 2 L'imperatore Marco Aurelio curato da Galeno con la "teriaca".

² <https://samorini.it/>

per varie problematiche: mal di testa, asma, qualsiasi tipo di tosse, debolezza, febbre, coliche e tutte le pestilenze ma contemporaneamente anche un potente veleno in base alle dosi impiegate. Nel Medio Oriente tra il 1000 e il 1400 l'oppio fu il fulcro del commercio e venne coltivato largamente dai popoli arabi, che dominarono l'oceano Indiano, esportando e introducendo l'oppio in Europa, India, Cina e successivamente Stati Uniti. Tra le popolazioni arabe ebbe un ruolo centrale nella medicina islamica che lo utilizzò soprattutto come antidiarroico ma anche per contrastare tosse e vari dolori. Avicenna, un'importante medico islamico, fu uno dei primi personaggi della storia che iniziò a fare luce anche sulle tossicità psicofisiche del "succo magico", parlando per la prima volta del fenomeno della dipendenza.

L'unico periodo di cui non ci siano molti riferimenti sull'utilizzo dell'oppio è l'epoca Medievale, questo a causa del fatto che in tale periodo oltre ai ridotti scambi commerciali, la parola di Dio e la preghiera furono le principali virtù impiegate contro ogni tipo di dolore, fisico ma anche di natura emotiva. Bisogna però anche ricordare che in epoca medievale l'oppio e altre droghe erano utilizzate durante riti magici e pratiche esoteriche quindi la prudenza della popolazione nell'uso è anche da attribuire alla paura di essere accusati di stregoneria.

Nel Rinascimento (verso la fine anni 1400 – 1600), epoca dei viaggi e delle prime esplorazioni, le popolazioni orientali entrarono a contatto con il mondo occidentale grazie ai numerosi scambi commerciali e così l'oppio si diffuse in Europa, dove la popolazione ne fu affascinata. Nel 1500 a.C. i preparati a base di oppio furono considerati i giusti alleati sia in tempi di guerra per fornire coraggio ai combattenti sia in tempo di pace per donare rilassamento e mettere a tacere le angosce (Canali, 2016) e fino al 1700 i mali più disparati erano curati con l'oppio, persino durante il travaglio e durante i parti "difficili" (Lugoboni, F. et al., 2015).

In Europa negli anni che intercorrono il 1400 e il 1700 furono numerosi gli avvenimenti importanti riconducibili alla storia dell'oppio, come ad esempio l'invenzione di una sua soluzione idroalcolica, ottenuta per macerazione di quest'ultimo in alcol, che prende il nome di laudano o tintura di oppio. L'invenzione di tale preparazione viene generalmente attribuita al celebre medico svizzero Paracelso vissuto agli albori del Rinascimento. Bisogna però ricordare che ci sono ancora forti dubbi se il laudano di Paracelso contenesse o meno oppio, in quanto il medico spesso indicava in maniera del tutto separata l'oppio e laudano come ingredienti differenti (Duarte, D. F. 2005).

Il termine laudano spesso indicava nella letteratura medica del XVII secolo un medicinale che avesse un effetto potente ed a diversi medici vennero associati vari “tipi” di questa preparazione.

Il laudano più importante è quello ottenuto alla fine del 1600 da Thomas Sydenham, uno dei più grandi medici inglesi, il quale mise a punto una nuova “formula” di laudano, mescolando l’oppio con vino, cannella, chiodi di garofano e ne diffuse ampiamente l’impiego in Gran Bretagna (Figura 3). Il luminare ne tesse le lodi affermando che “tra i rimedi che la misericordia divina ha donato all’uomo per lenire le sofferenze, nessuno è così universale ed efficace come l’oppio” (Claudio Blengini et al., 1998). Infatti, a partire dal XVIII secolo



Figura 3 Bottiglia risalente al 1600 in cui fu contenuto il laudano di Thomas Sydenham.

in Europa ma in particolare in Inghilterra l’oppio raggiunse il massimo della sua diffusione e fu considerato il rimedio universale, un farmaco miracoloso consigliato per qualsiasi affezione: tutte le forme dolorose, sia in adulti che ai lattanti, sedativo della tosse, asma, dissenteria, ma anche tifo, colera e per molti altri problemi di salute.

L’oppio in Cina:

Già a partire dal 1500 l’oppio era presente in Cina, (il quale fu introdotto grazie ai numerosi scambi commerciali con i popoli arabi), a quel tempo usato solo a scopo curativo, in particolare contro la diarrea. Successivamente a partire dal XVII secolo la popolazione cinese di ogni ceto sociale, sviluppò una nuova pratica che consisteva nel mescolare inizialmente l’oppio con il tabacco, tale miscuglio veniva poi fumato con apposite pipe, ottenendo un effetto euforizzante per finire con eliminare il tabacco.

Quest’abitudine portò la droga ad essere consumata per scopo di pura evasione, ben lontano dall’uso terapeutico che inizialmente ne veniva fatto, divenendo quindi una vera e propria dipendenza quotidiana che spesso prevaleva al bisogno di cibarsi. Questo destò preoccupazione nel governo cinese, non solo dal punto di vista degli effetti psicofisici che poteva avere ma anche dal punto di vista economico: a causa delle enormi richieste crollarono le importazioni di molti altri beni come ad esempio l’argento. Tutto questo portò l’imperatore cinese Chiang, nel 1729, ad emanare il primo editto contro l’oppio, in cui e ne proibiva l’importazione in Cina dall’Inghilterra, poiché essa deteneva il controllo commerciale dei territori dell’Est-India. Dopo l’emanazione di questi duri divieti però, in Cina non si verificò mai una vera e propria

lotta al contrabbando, anzi i traffici illeciti non furono mai seriamente ostacolati poiché l'oppio era un bene troppo importante da potersene privare³.

Est India Company e il monopolio inglese dell'oppio

Fino al XVI secolo il dominio del territorio indiano e quindi anche il monopolio dell'oppio erano detenuti dall'impero Moghul; nella seconda metà del XVIII secolo però il governo britannico approfittò del crollo di questo impero per assumere il controllo commerciale nei territori del est-Indiano attraverso la compagnia delle Indie Orientali (Est India Company), per cui il monopolio mondiale passò sotto il controllo inglese e per quasi un secolo l'oppio rappresentò la maggior fonte di interesse e guadagno commerciale per il governo britannico.

Sotto il controllo britannico in India furono allestite vaste piantagioni di *P.somniferum* e costruite grandi fabbriche adibite alla produzione di tonnellate di oppio, sia centri di stoccaggio e spedizione dello stesso, vere e proprie miniere d'oro che arricchirono il governo inglese (Lugoboni, F. et al., 2015). Inoltre, alla compagnia britannica era vietata l'importazione di oppio in Cina, di conseguenza i trafficanti cercarono di aggirare i divieti imposti in modo da favorirne il contrabbando. Proprio per questi divieti le richieste furono sempre più elevate, tant'è che la Cina si guadagnò, verso il 1770, la fama del maggior acquirente di oppio illegale (Schiff, P. L. 2002).

Le guerre dell'oppio

Verso la fine del 1800 in Cina, il commissario Lin, preoccupato delle grosse importazioni di oppio, tentò di bloccare definitivamente le stesse, ordinando il sequestro e la successiva distruzione, con calce e sale, di tonnellate di lattice che la compagnia britannica stava importando a Canton.

Questo evento, ovviamente, scatenò la furia della flotta inglese, che avendo subito un danno economico così importante dichiarò guerra alla Cina. Nel 1839 iniziò la prima guerra dell'oppio che vide aspre battaglie navali e che finì nel 1842 con il trattato di Nanchino, un documento che sostanzialmente costrinse la Cina a risarcire l'esercito inglese dei danni economici subiti, stanziando un ricco indennizzo che prevedeva anche l'apertura dell'isolotto di Hong Kong ai commerci di oppio.

³ <https://www.psicoadattivo.com/>

Dal 1856 al 1860 ci fu la seconda guerra dell'oppio che finì con il trattato di Tientsin, vinta in via definitiva dalla flotta inglese che ottenne la legalizzazione del commercio e dell'uso di oppio in Cina, la quale aprì altri porti al commercio e costretta in via definitiva a tollerare i traffici inglesi che ben presto svilupparono ampie coltivazioni di *Papaverum somniferum*.

Esplosione consumo di oppio ai tempi del XIX secolo

L'Europa, ma in particolare l'Inghilterra, nel XIX secolo è segnata della rivoluzione industriale, periodo in cui grazie allo sviluppo di vari settori, iniziò la produzione di farmaci a livello industriale, che determinò la facile reperibilità in farmacie, drogherie e persino nei pub dei preparati a base di oppio, venduti sottoforma di sciroppi, pillole, polveri ed utilizzati come



Figura 4 Manifesto in cui si pubblicizzava lo sciroppo a base di oppio utilizzato dalle madri per sedare il pianto dei neonati.

infallibili rimedi per adulti e piccini, contro qualsiasi tipo di malanno. Questi preparati, inoltre, venivano pubblicizzati su giornali e riviste con nomi accattivanti come, ad esempio, il famosissimo “Winslow’s Soothing Syrup” (il dolce sciroppo della signora Winslow), rimedio a base di oppio mischiato ad altre spezie usato dalle madri e dalle infermiere per fermare il pianto fastidioso dei neonati e le coliche in epoca Vittoriana (Figura 4).

Tuttavia, oltre agli utilizzi puramente curativi, anche in Inghilterra cominciò a diffondersi la moda trasgressiva di fumare l'oppio a scopo ricreativo. L'industrializzazione aveva imposto condizioni di lavoro massacranti e malsane soprattutto dal punto di vista igienico e così gli operai, tra cui anche donne e bambini ricorrevano al fumo dell'oppio per lenire i dolori fisici dettati dall'incessante lavoro ma anche per evadere e distrarsi da quella triste realtà.

L'uso voluttuario prese il sopravvento e con essa la diffusione dell'oppiomania, cominciando a diventare un problema per la salute pubblica⁴.

⁴ <https://www.psicoattivo.com/>

Isolamento morfina e scoperta ago ipodermico

Sempre nel XIX secolo ci furono due tappe fondamentali nella storia dell'oppio che hanno contribuito all'esplosione del suo consumo. La prima risale al 1806 quando il giovane farmacista tedesco Friedrich Sertürner riesce ad isolare dall'oppio una sostanza insolubile e cristallina, la morfina. Essa venne chiamata inizialmente *principium somniferum*, per le sue azioni sedative e sonnifere che furono dimostrate sugli animali da esperimento; successivamente venne nominata *morphium* dal nome del dio greco dei sogni, Morfeo. Sertürner dimostrò le proprietà alcaline della morfina e siccome fino ad allora le sostanze isolate dalle piante erano tutte a carattere neutro, diede vita ad un nuovo tipo di chimica, che oggi è conosciuta come la chimica degli alcaloidi (Goerig, M. et al., 1991).

Pochi anni più tardi nel 1817, il parigino Gay Lussac riprese le scoperte del giovane farmacista, modificandone definitivamente il nome in morfina e prevedendo l'esistenza di molte altre sostanze basiche all'interno del lattice e così l'anno successivo venne introdotto il termine alcaloide per indicare composti azotati aventi proprietà basiche isolati dalle piante. Bisogna però ricordare che la struttura chimica della morfina è stata chiarita agli inizi del 1900 da Robinson e Schopf e sintetizzata nel 1956 da Gates.

La seconda tappa fondamentale risale al 1850, quando il medico inglese Alexander Wood inventò la siringa ipodermica, passando così alla somministrazione della morfina in vena, che provocò, ovviamente, la comparsa degli effetti in maniera rapida ed estremamente intensificata rendendo così l'autosomministrazione per uso voluttuario facile, veloce ed efficace con un aumento dei casi di dipendenza ancor più marcato rispetto a quella provocata con la somministrazione orale. Oltre a questo, la somministrazione parenterale determinò un grave problema: le iniezioni avvenivano senza alcun tipo di condizioni igieniche, causando infezioni anche mortali come tetano o setticemie. Erroneamente si pensò che l'associazione morfina – ago ipodermico fosse la causa diretta di tutte queste complicanze infettive e cominciò ad emergere la pericolosità del suo impiego (Claudio Blengini et al., 1998).

Il grosso consumo di oppio, a quei tempi, si registrava non solo in Inghilterra ma anche in altri paesi



Figura 5 Fumeria d'oppio frequentata dalle classi altolocate della borghesia.

Europei arrivando fino in America, grazie ai numerosi immigrati Cinesi che approdarono in cerca di fortuna, i quali come già accennato furono grandi utilizzatori di oppio. Si aprirono numerose fumerie d'oppio, frequentate dalla classe più altolocate della borghesia, artisti, intellettuali, politici: tutti grandi utilizzatori di oppio, gradito e ricercato nelle situazioni più piacevoli, come il ballo, la promiscuità sessuale o il teatro (Figura 5).

È bene sottolineare che fino alla fine del secolo, intorno all'1870-1880, le persone che utilizzavano oppio e morfina erano sempre ben inserite nella società, senza subire alcun tipo di emarginazione sociale, cosa che invece accadeva ad esempio per chi abusava di alcol. La situazione a fine del secolo cominciò a prendere una piega diversa quando cominciarono ad emergere gruppi di oppositori alla tendenza, principalmente per due motivi: in primis in America gli immigrati Cinesi, essendo lavoratori imbattibili sia dal punto di vista di resistenza fisica che concorrenziale, erano mal visti e poco accettati. Nacquero così dei movimenti razziali che da ultimo provocarono la stigmatizzazione del consumo di oppio, vista come un'abitudine da attribuire alla popolazione cinese, considerata la feccia della società. Secondo, proprio a causa della scoperta dell'ago ipodermico e con essa la somministrazione parenterale della morfina, l'uso irrazionale della stessa stava spopolando e con essa la tossicodipendenza, fenomeno sempre più diffuso. L'uso smisurato avvenne anche tra i soldati impiegati nei conflitti dell'epoca. Per esempio, i soldati Americani nella guerra in Crimea (combattuta negli anni tra 1860-1865) si iniettavano morfina per contrastare sia il dolore provocato dalle ferite sia per sopperire il disagio psicologico delle tensioni di guerra. Così anche tra i militari si verificò una vera e propria dipendenza tant'è che si arrivò ad usare il termine "malattia del soldato" per indicare l'assuefazione che caratterizzava quei militari.

Alla fine del XIX secolo si assiste ad un cambiamento di pensiero e valutazione sia della sostanza, che da farmaco miracoloso diventò una droga pericolosa, sia della parte di popolazione che ne abusava, i cosiddetti "morfinomani" "considerati veri e propri viziosi drogati, segnalando i primi casi di tossicodipendenza (Claudio Blengini et al., 1998).

Occorreva trovare un nuovo farmaco che fosse contemporaneamente efficace nel contrastare il dolore ma non provocasse dipendenza, e questo fu l'obiettivo di numerose compagnie farmaceutiche. Nel 1874 venne sintetizzata l'eroina il cui nome deriva dalla parola tedesca heroisch, che significa eroico. Nata con l'intento di contrastare la dipendenza da morfina, purtroppo ben presto si rivelò un'ottima sostituta del derivato dell'oppio dedicato a morfeo,

tanto che ancora ad oggi è tra le peggiori e più pericolose sostanze d'abuso e di guadagno nei mercati del contrabbando.

Oppio nel XX secolo: verso il proibizionismo

Nei primissimi anni del 900' in cui vennero istituite le prime due conferenze internazionali sull'oppio, che avvennero rispettivamente prima a Ginevra e poi all'Aia, durante le quali 34 nazioni decisero di limitare la produzione e l'importazione a scopi medici. In realtà negli anni delle guerre i traffici di oppio furono favoriti proprio per far fronte alla forte richiesta dei militari. Negli anni post Seconda Guerra Mondiale ci fu la proibizione in vari Paesi, come Hong Kong, Iran, Thailandia e l'oppio divenne una droga illecita in quasi tutto il mondo. In Inghilterra 1868 fu istituita una legge denominata "Pharmacy act" che resterà in vigore anche negli anni successivi la Prima Guerra Mondiale, in cui si cominciò a regolamentare l'utilizzo di oppio: si decise che la dispensazione era riservata ai farmacisti, anche in assenza di prescrizione medica. Intorno al 1920 in Inghilterra venne istituita una vera legge proibizionista, la quale limitò la prescrizione di oppiacei unicamente ai medici in base al loro personale giudizio professionale. I medesimi divieti ci furono anche in America qualche anno prima nel 1914 attraverso l'istituzione della legge Harrison Narcotic Act, emersero numerosi attivisti e movimenti che sancivano l'impiego unicamente a scopi medici.

Si può dedurre che dagli anni '20 in poi i tossicodipendenti ebbero solo due possibili strade per rifornirsi di oppiacei: per i più ricchi, attraverso il proprio medico di base, mentre per i più sfortunati l'unica possibilità erano i mercati illeciti che stavano aumentando sempre di più. Successivamente a causa della forte tossicodipendenza che si insinuò persino tra i giovani, nel 1968 anche per i medici venne stabilito il divieto assoluto della prescrizione. Da quel momento l'utilizzo di oppio e la gestione della tossicodipendenza furono condotte in centri specializzati che successivamente furono destinati a chiudere poiché accusati di assecondare il vizio e aumentarne il consumo senza contrastare la dipendenza. Questo portò dagli anni '50, nel dopo guerra, l'aumento dei traffici illegali diffusi ampiamente nei territori della cosiddetta "mezzaluna d'oro" e "triangolo d'oro" che rispettivamente corrispondono all'Afghanistan, Pakistan, Iran e Thailandia, Birmania e Laos (Cappuccino, 2004).

3. FITOCHIMICA DEL PAPAVER SOMNIFERUM

3.1 Papaver somniferum



Figura 6 Disegno raffigurante le tre principali varietà di *P. somniferum*: varietà *album*, *nigrum* e *setigerum*.

Il *Papaver somniferum* è una pianta erbacea annuale diffusa nelle zone subtropicali e temperate del mondo e appartenente all'ampia famiglia delle Papavaceae, la quale comprendente circa 40 generi e 800 specie botaniche; mentre la sottofamiglia in cui ricade è quella delle papaveoidae. Il genere *Papaver* oltre alla specie *somniferum*, racchiude circa 100 specie botaniche che possono essere a loro volta divise in sottospecie e varietà. Tra le specie più comuni si ricorda: *Papaver rhoseas* (papavero comune o rosolaccio), *Papaver bracteatum* (papavero iraniano), *Papaver orientale* e *suborientale*. Le numerose specie botaniche possono comprendere piante annuali, biennali e perenni.

In base alla durata del ciclo vitale ed alcuni caratteri morfologici si possono dividere le specie in sezioni e la sezione “mecones” è quella a cui appartiene il *Papaver somniferum* rappresentando la specie annuale più sviluppata. Essendo piuttosto complicata la classificazione tassonomica del papavero da oppio per semplicità si possono distinguere 3 varietà principali: varietà *album* caratterizzata da fiori e semi bianchi, comunemente coltivata in India per scopi medicinali, varietà *nigrum* (o *glabra*) e *setigerum* caratterizzate da fiori violacei, rosa-malva con semi grigi-bluastri, coltivate in Europa per scopi alimentari (Schiff, P. L. 2002) (Figure 6,7,8 e 9).

Il *P. somniferum* è una pianta erbacea annuale che germoglia in primavera raggiungendo



Figura 7 *P. somniferum* var. *album*.



Figura 8 *P. somniferum* var. *nigrum*,



Figura 9 *P. somniferum* var. *setigerum*.

un'altezza di circa 60 cm. Per consentire uno sviluppo adeguato, la pianta richiede vaste aree

libere caratterizzate da un terreno umido e ricco di calcio, molta luce solare, ed un clima moderatamente fresco. Inoltre, si è notato che lo stress idrico influenza la produzione di alcaloidi nella pianta; infatti, periodi di siccità causano un aumento di alcuni alcaloidi mentre ne viene ridotta la produzione di altri come, ad esempio, i cosiddetti alcaloidi morfiniti (Ngersaengsaruy et al., 2023).

La pianta possiede una radice a fittone, robusti steli eretti, grandi foglie lobate di colore verde bluastru, due sepalu (la cui unione forma il bocciuolo) caduchi e pendulu, infatti, cadono prima della completa fioritura e pendono verso il basso diventando successivamente eretti quando il bocciuolo si apre per l'esposizione dei petali. La pianta fiorisce tra aprile e maggio e generalmente è caratterizzato da fiori solitari molto appariscenti generalmente con quattro petali che possono essere di varie tonalità di rosso, rosa malva e bianco in base alla varietà. Una volta avvenuta la fioritura, in giro di pochi giorni i petali cadono lasciando spazio al solo frutto, ovvero la cosiddetta capsula di papavero, contenente numerosi piccoli semi reniformi aventi consistenza coriacea ed una superficie reticolata che ricorda un nido d'ape. La maturazione delle capsule che avviene tra maggio e giugno provoca un cambiamento della loro colorazione passando dal verde-bluastru al giallo. Avvenuta la completa maturazione delle capsule nella loro parte superiore, sotto lo stigma del fiore si sviluppano dei piccoli fori che consentono la dispersione dei semi nell'ambiente che avviene tra fine autunno e inizio inverno nei climi tropicali, mentre in quelli temperati avviene in primavera (M. Filho et al., 2023).

Ad eccezione dei semi, la pianta di papavero è percorsa in ogni sua parte (in particolare le capsule immature) da canali latticiferi che, una volta incisi, secernono un essudato biancastro lattiginoso. Il lattice che trasuda è ricchissimo di vari tipi di alcaloidi aventi potenziali attività biologiche e per tale ragione viene raccolto per scopi farmaceutici (Labanca et al., 2018).

Importanza del papavero da oppio

La coltivazione del *P. somniferum* è significativamente importante in tutto il mondo poiché è la specie che dal punto di vista farmaceutico rappresenta l'unica fonte naturale disponibile da cui si può ottenere un essudato definito oppio, dal quale si possono estrarre numerosi alcaloidi, tra cui i più importanti: morfina, codeina, tebaina, papaverina e noscapina. Queste molecole sono ampiamente utilizzate per ottenere numerosi farmaci ad azione analgesica e antitussiva oppure, utilizzati come precursori per ottenere dei derivati semisintetici. La composizione in termini di quantità e qualità varia a seconda della specie e/o varietà.

Si ricorda che la sintesi chimica de novo della morfina e degli altri alcaloidi del papavero sarebbe possibile ma presenta enormi difficoltà a causa della struttura complessa della morfina, dovuta alla presenza dei cinque centri chirali nello scheletro portante degli alcaloidi morfینici; Ciò determinerebbe una sintesi chimica economicamente non sostenibile. Questo fa sì che la coltivazione del papavero da oppio sia l'unica fonte naturale per la produzione di farmaci oppiacei (Wijekoon et al., 2012). La costituzione dell'oppio non è unicamente rappresentata dagli alcaloidi, ma anche da sostanze che generalmente non hanno alcun interesse farmaceutico: tannini, gomme, proteine, grassi e zuccheri, acidi inorganici e acidi organici. Questi ultimi influiscono molto sulla forma degli alcaloidi, determinandone la loro salificazione e la scarsa presenza in forma libera⁵. La varietà di *P. somniferum* impiegata ad uso farmaceutico è la varietà *album* da cui si ottiene l'oppio farmaceutico e la sua coltivazione, se non ad uso farmaceutico, è illegale e mirata all'ottenimento di droghe d'abuso impiegate nei più grandi traffici illeciti in tutto il mondo.

Le coltivazioni illegali si trovano nella cosiddetta “mezzaluna d'oro” termine utilizzato per indicare una zona di confine tra Afghanistan, Iran, Pakistan ed il “triangolo d'oro” una zona di confine tra Thailandia, Birmania e Laos (Butnariu et al., 2022) (Figura 10).



Figura 10 La “mezzaluna d'oro” ed il “triangolo d'oro”.

⁵ <http://www.medicalsystems.it/>

La coltivazione legale del *P. somniferum* da parte delle industrie farmaceutiche o alimentari è concessa nelle zone montane e negli altopiani del sud est asiatico in particolare in India, che detiene ad oggi la maggior produzione (oltre 80 %) dell'oppio mondiale utilizzato dalle industrie farmaceutiche per scopi medicinali. Oltre all'India la coltivazione legale è concessa anche in Turchia, Australia, in alcuni paesi del America centrale e meridionale, Canada, alcuni paesi Europei (Germania, Polonia, Francia, Spagna, Ungheria, Romania, Bulgaria, Olanda,) Russia, Cina e Giappone. Tale produzione è regolamentata a livello internazionale attraverso un rigido controllo da parte dell'autorità governative (Vadhel et Al., 2023). A Vienna ha sede l'Ufficio delle Nazioni Unite per il controllo della droga e crimine "United Nations Office on Drugs and Crime "(UNODC) che globalmente controlla le coltivazioni legali di papavero da oppio (Mishra, B. K. Et al., 2013).

Coltivazioni italiane di alcune varietà di *P. somniferum*, non stupefacenti, come la var. *nigrum* e *setigerum*, sono apprezzate in ambito culinario in quanto i semi, ricavati dalla pianta essiccata di papavero, rappresentano una fonte commestibile ricca di elementi nutritivi impiegati per decorare e insaporire vari prodotti da forno e dolciari.

Attraverso la loro pressatura si ottiene l'olio di semi di papavero anch'esso utilizzato come condimento in vari piatti per il suo gradevole sapore di nocciola le sue proprietà nutrizionali (Ngersaengsaruy et al., 2023). I semi generalmente non contengono alcaloidi oppiacei ma possono venirci a contatto e contaminarsi durante le fasi di raccolta, motivo per cui l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha stabilito che 10 µg/kg di peso corporeo corrispondono alla dose acuta di riferimento di morfina e codeina nei semi di papavero cioè "la quantità di una sostanza in un alimento espressa in rapporto al peso corporeo che può essere ingerita nelle 24 ore senza alcun rischio per la salute del consumatore"⁶.

3.2 La raccolta del lattice e la paglia di papavero

Essenziale è che la raccolta del lattice venga effettuata quando le capsule non abbiano raggiunto la completa maturazione; questo periodo, che in botanica prende il nome di "tempo balsamico", è il miglior periodo dell'anno durante il quale all'interno del lattice vi è la massima concentrazione di alcaloidi. Se la raccolta fosse effettuata al di fuori di questo preciso periodo

⁶ <https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/1805>

(troppo precocemente o tardivamente) si comprometterebbe la qualità e quantità di alcaloidi contenuti al suo interno.

Fra i pochi Paesi che coltivano il papavero da oppio legalmente, l'India rimane l'unico a seguire ancora oggi il metodo di raccolta tradizionale che richiede un impegno dal punto di vista fisico e di tempistiche consistente nella raccolta manuale dell'oppio da cui poi si estrarranno i principali alcaloidi⁷.

Le capsule sono incise con strumenti chiodati o delle lame, in maniera orizzontale lungo la loro circonferenza ed essendo la capsula cava, l'incisione non deve essere troppo profonda, ma deve avvenire in modo da incidere solo i dotti galattofori provocando la fuoriuscita del lattice, senza che esso si riversi all'interno della capsula, il che avverrebbe se l'incisione fosse troppo profonda.

Il lattice che trasuda è denso e di colore bianco, ma con l'esposizione all'aria si scurisce velocemente, virando dal bianco al rosso diventando infine di colore bruno che solidifica aderendo alla capsula. Il lattice solidificato è raccolto il giorno successivo mediante una spatola per raschiamento (Figura 11). L'operazione deve avvenire in momenti della giornata freschi (all'alba o al tramonto) per evitare che il caldo faccia diventare il lattice



Figura 11 Raccolta manuale del lattice del P. somniferum.

appiccicoso. Una volta raccolto viene essiccato generalmente mediante l'esposizione all'aria in ambienti ombreggiati o in alternativa può anche avvenire mediante bollitura. Le lavorazioni successive che avvengono nei centri di raccolta governative prevedono che l'oppio venga posto in contenitori rettangolari e lasciato riposare per circa 3 settimane esponendolo al sole il quale determina l'evaporazione del contenuto di acqua residua, passando così da un tasso di umidità del 30 % a circa il 10-20%. Il materiale viene successivamente compattato in panelli tondeggianti e allungati di circa 8-15 cm con un peso che va generalmente dai 2 ai 5 kg portando

⁷ <https://infoshocktorino.noblogs.org/>

alla formazione dei cosiddetti pani di oppio, i quali vengono messi in sacchi di polietilene per essere spediti ai centri di raccolta governative (M. Filho et al., 2023).

Attualmente per aumentare la resa di estrazione e ridurre l'intensità di lavoro che avviene con la raccolta manuale dell'oppio, si utilizza un particolare metodo definito "della paglia" che prevede che l'estrazione degli alcaloidi avvenga direttamente dai papaveri.

Il chimico che per la prima volta ha estratto nel 1927 gli alcaloidi dalla paglia di papavero fu l'ungherese János Kabay. Tale metodo, dunque, non prevede l'incisione della capsula, ma l'utilizzo dell'intera paglia di papavero che corrisponde alla capsula naturalmente essiccata all'aria, privata dei suoi semi⁸ (Figura 12).

Questo è un protocollo altamente meccanizzato che prevede la raccolta della capsula del *Papaver*

somniferum che avviene alla completa maturazione delle capsule, la rimozione dei semi per trebbiatura o vagliatura e la sua frantumazione fino ad ottenere la paglia concentrata di papavero (CPS) che appare come una polvere marroncina contenente vari alcaloidi salificati.

La paglia di papavero inizialmente fu considerata un sottoprodotto agricolo del raccolto ma nel 1927 diventò una fonte ricchissima di alcaloidi. I semi una volta trebbiati, sono di interesse alimentare per le loro importanti qualità nutrizionali (Mishra, B. K. Et al., 2013). Ancora oggi, infatti, le aziende farmaceutiche utilizzano tonnellate di CPS da cui estraggono più del 90% della morfina legale per uso medico e altri alcaloidi morfiniti.

I panetti di oppio o la paglia di papavero sono forniti alle industrie farmaceutiche che provvederanno all'estrazione dei principali alcaloidi. Esistono numerosi metodi che portano all'estrazione degli alcaloidi. Generalmente si impiegano processi estrattivi che utilizzano solventi organici e tecniche cromatografiche per ulteriori separazioni e purificazioni. L'estratto ottenuto verrà poi purificato mediante tecniche cromatografiche generalmente di tipo liquido-liquido o HPLC (high performance liquid chromatography) (Szucs, Z., et al., 2002).



Figura 12 Numerose capsule di papavero essiccate e private dei semi.

⁸ <https://infoshocktorino.noblogs.org/>

3.3 Gli alcaloidi del *Papaver somniferum*

Come già anticipatamente descritto nel 1806 Sertürner isolò dall'oppio il primo alcaloide avente carattere basico successivamente denominato morfina (Figura 13).

Il termine alcaloide fu introdotto dal farmacista tedesco Meisener nel 1817 per indicare in modo molto generico delle sostanze simile agli "alcali", aventi quindi proprietà alcaline.

Agli inizi del 1900 la definizione venne ampliata definendo il concetto di vero alcaloide per il quale si intende un composto unicamente di origine vegetale il cui requisito fondamentale è

quello di possedere un atomo di azoto, che rappresenta il principale responsabile delle proprietà basiche trovandosi sottoforma di ammina ed incorporato all'interno di un eterociclo e di origine amminoacidica. Tuttavia, questa definizione risultò essere non esaustiva poiché l'azoto, oltre essere di natura amminica ed in tal caso possedere carattere basiche, può essere anche di natura ammidica e come tale non fornire alcuna basicità al composto. Inoltre potrebbe non essere compreso all'interno di un eterociclo ed avere origine biosintetica diversa, quindi non attribuibile ad un amminoacido. Ecco che nella metà del 1900 vennero stabilite altre due definizioni più specifiche in modo da dividere gli alcaloidi in sottoclassi: vero alcaloide, protoalcaloide e pseudoalcaloide.

Per protoalcaloide si intende un composto di origine vegetale possedente un atomo di azoto, di derivazione amminoacidica, che non si trova incluso all'interno di un eterociclo; mentre per pseudo-alcaloide si intende un composto sempre di origine vegetale possedente un atomo di azoto che si trova ricompreso all'interno di un eterociclo ma che non deriva da un precursore amminoacidico.

Bisogna ricordare che le piante rappresentano la prima fonte da cui si sono identificati gli alcaloidi ma oggi si sa che anche funghi, batteri, insetti, microrganismi, e persino alcuni mammiferi sono in grado di produrre una vasta quantità di alcaloidi, definendoli come sostanze di origine naturale contenenti azoto avente carattere basico (Bribi, et, al., 2018). La maggior parte degli alcaloidi presenti in natura sono sostanze cristalline ben definite; la loro basicità consente la salificazione con acidi organici ed inorganici. I sali degli alcaloidi sono generalmente solubili in acqua e alcoli ma insolubili in solventi organici (O'Connor, S. E., 2010).



Figura 13 Foto di Sertürner il primo uomo che isolò la morfina.

Gli alcaloidi sono considerati metaboliti secondari poiché oltre ad essere presenti in bassissima concentrazione, non sono indispensabili per la vita della pianta in quanto non possiedono nessun ruolo essenziale per la sua sopravvivenza. La loro funzione all'interno della pianta non è ancora stata del tutto chiarita, ma sembrerebbero essere coinvolti nell'interazione con l'ambiente circostante sia dal punto di vista antagonista che mutualistico attraverso numerosi ruoli ecologici, tra cui il ruolo di difesa fornendo alla pianta protezione da sia da vari fattori biotici come erbivori, parassiti, danni fungini, e patogeni sia abiotici come ad esempio condizioni meteorologiche critiche o raggi UV (Labanca et al., 2018).

La loro classificazione può essere tassonomica (in base al genere e alla specie botanica), chimica-strutturale (in base all'anello che li caratterizza) ed infine una classificazione che si basa sulla via biosintetica o al precursore d'origine (Ozber, N. et al., 2022).

Al genere *Papaver* appartengono molte specie che racchiudono più di 170 alcaloidi diversi. Il *P. somniferum* può contenere oltre 80 alcaloidi ma i 5 più importanti a livello farmacologico sono rappresentati da: morfina, codeina, tebaina, noscapina e papaverina (Bribi, et, al., 2018) (Figura 14).

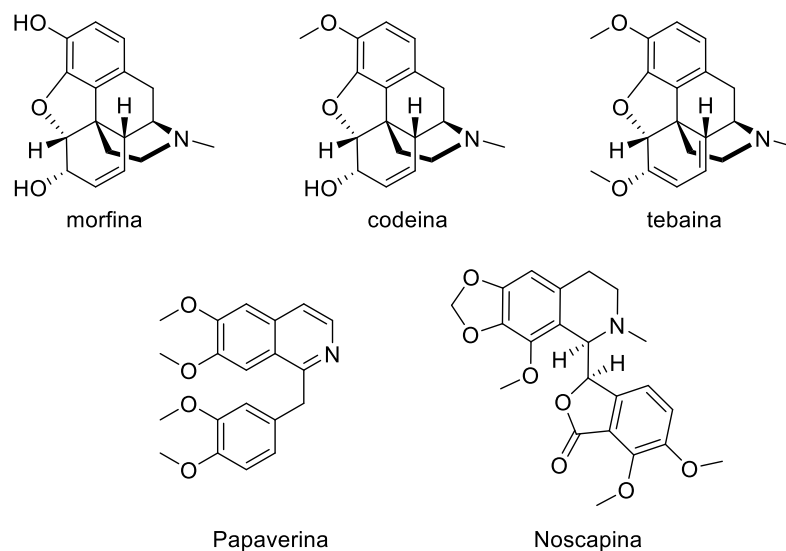


Figura 14 I cinque importanti alcaloidi del papavero da oppio.

I 5 alcaloidi da un punto di vista chimico-strutturale si dividono in due gruppi principali: alcaloidi fenantrenici detti anche “morfinici” (morfina, codeina e tebaina) ed alcaloidi benzilisoquinolinici (papaverina e noscapina). In particolare, i morfinici si trovano in quantità elevate nella specie *somniferum*, poiché in essa, rispetto ad altre specie, sono espressi in

maggiormente i geni che codificano per gli enzimi coinvolti negli step biosintetici che portano alla formazione degli alcaloidi (Ziegler et al., 2004).

Altri alcaloidi che si ritrovano all'interno del papavero da oppio possono essere la sanguinarina (appartenente alla classe strutturale delle benzofenatridine), berberina (classe delle protoberberine) e altri ancora inclusi in altre classi strutturali come: protopine, papaverrubine, rhoeadine (Wijekoon et al., 2012) (Figura 15).

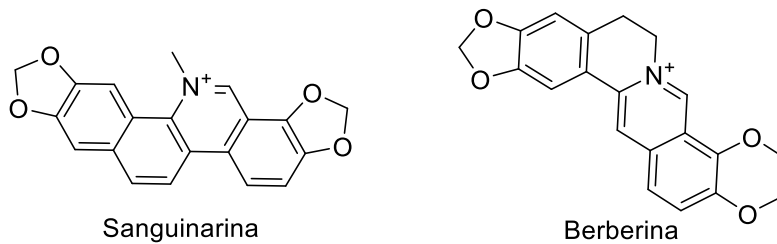


Figura 15 Altri due alcaloidi contenuti all'interno del papavero da oppio.

3.4 Biosintesi degli alcaloidi del papavero

Grazie all'utilizzo di innovative tecniche biotecnologiche si sono potuti individuare molti geni e i corrispondenti enzimi coinvolti negli step biosintetici che portano alla formazione degli alcaloidi del papavero ma, nonostante ciò, l'identificazione completa del percorso biosintetico della pianta rimane ancora una grossa sfida. Questo grosso limite è in parte dovuto al fatto che a differenza dei geni batterici, la dimensione del genoma delle piante è molto più grande, inoltre, la maggior parte dei geni vegetali responsabili di una via biosintetica non si trovano adiacenti all'interno del genoma e devono essere scoperti individualmente (Bribi, et, al., 2018).

Via comune:

La via comune (Figura 16), che porta alla formazione dei cinque alcaloidi principali del *P. somniferum* (morfina, codeina, tebaina, noscapina e papaverina) ed inizia dal precursore amminoacidico L-tirosina (L-Tyr); da questo amminoacido, infatti, si generano due suoi derivati: dopamina e 4-HPAA (4-idrossifenilacetaldeide). Per portare alla formazione della dopamina la L-Tyr può andare incontro a due percorsi diversi:

- a. Può subire una decarbossilazione da parte di TyDC (tirosina-DOPAdecarbossilasi) portando alla formazione della tiramina che successivamente verrà ossidata da PPO (polifenolo ossidasi) portando alla formazione della dopamina;

- b. Oppure in alternativa l'anello aromatico della L-Tyr viene ossidato da parte di TH (tirosina idrossilasi) generando la L-DOPA che viene successivamente decarbossilata dalla DDC (DOPA decarbossilasi) a dare dopamina.

Per quanto riguarda la formazione della 4-HPAA invece si ha un'unica alternativa: L-Tyr subisce una deaminazione da parte di TyrAT (tirosinaminotrasferasi) generando 4-HPP (4-idrossifenilpiruvato) il quale viene decarbossilato ad 4-HPAA ad opera dell'enzima 4-HPPDC (4-idrossifenilpiruvato decarbossilasi) (Vadhel et Al., 2023).

Dalla condensazione dei due derivati, la Dopamina e la 4-HPPA, operata dall'enzima NCS (norcoclaurina sintasi) si ha la formazione della (*S*)-norcoclaurina, l'intermedio centrale della via biosintetica, essendo il precursore comune di tutti i BIA (alcaloidibenzilisoquinolinici). L'enzima 6OMT (norcoclaurina-6-*O*-metiltransferasi) catalizza una metilazione portando alla formazione della (*S*)-coclaurina. Si ricorda che da questo intermedio diparte una breve diramazione della via biosintetica, descritta più avanti, per ottenere un alcaloide benzilisoquinolinico: la papaverina.

La (*S*)-coclaurina subisce poi l'azione di CNMT ((*S*)-coclaurina N-metiltransferasi), che opera una *N*-metilazione portando alla formazione di (*S*)-*N*-metilcoclaurina; essa subisce una idrossilazione grazie all'intervento di NMCH ((*S*)-*N*-metil-3-coclaurina-idrossilasi) CYP450 dipendente, trasformandola in (*S*)-3-idrossi-*N*-metilcoclaurina; infine tramite una *O*-metilazione da parte di 4OMT (3-idrossi-*N*-metilcoclaurina-4-*O*-metiltransferasi) si ha la formazione della (*S*)-reticulina, la quale rappresenta il punto di diramazione da cui possono prendere vita vari percorsi enzimatici che prevedono numerosi passaggi biosintetici. In base al percorso seguito si avrà la formazione di sottoclassi di alcaloidi aventi strutture diverse: fenantrenici (morfina, codeina e tebaina), ftalidilisoquinolinici (noscapina), benzilisoquinolinici (papaverina) (Wijekoon et al., 2012) ma anche altre classi meno note come la classe delle benzofenantridine (sanguinarina) protopine, rhoeadine, papaverubine, e protoberberine. Si possono ottenere anche altri alcaloidi che appartengono alla classe delle aporfine, pavine e (*S*)-laudanine che si ottengono sempre partendo dalla (*S*)-reticulina ma attraverso un unico passaggio biosintetico (Ziegler et al., 2004).

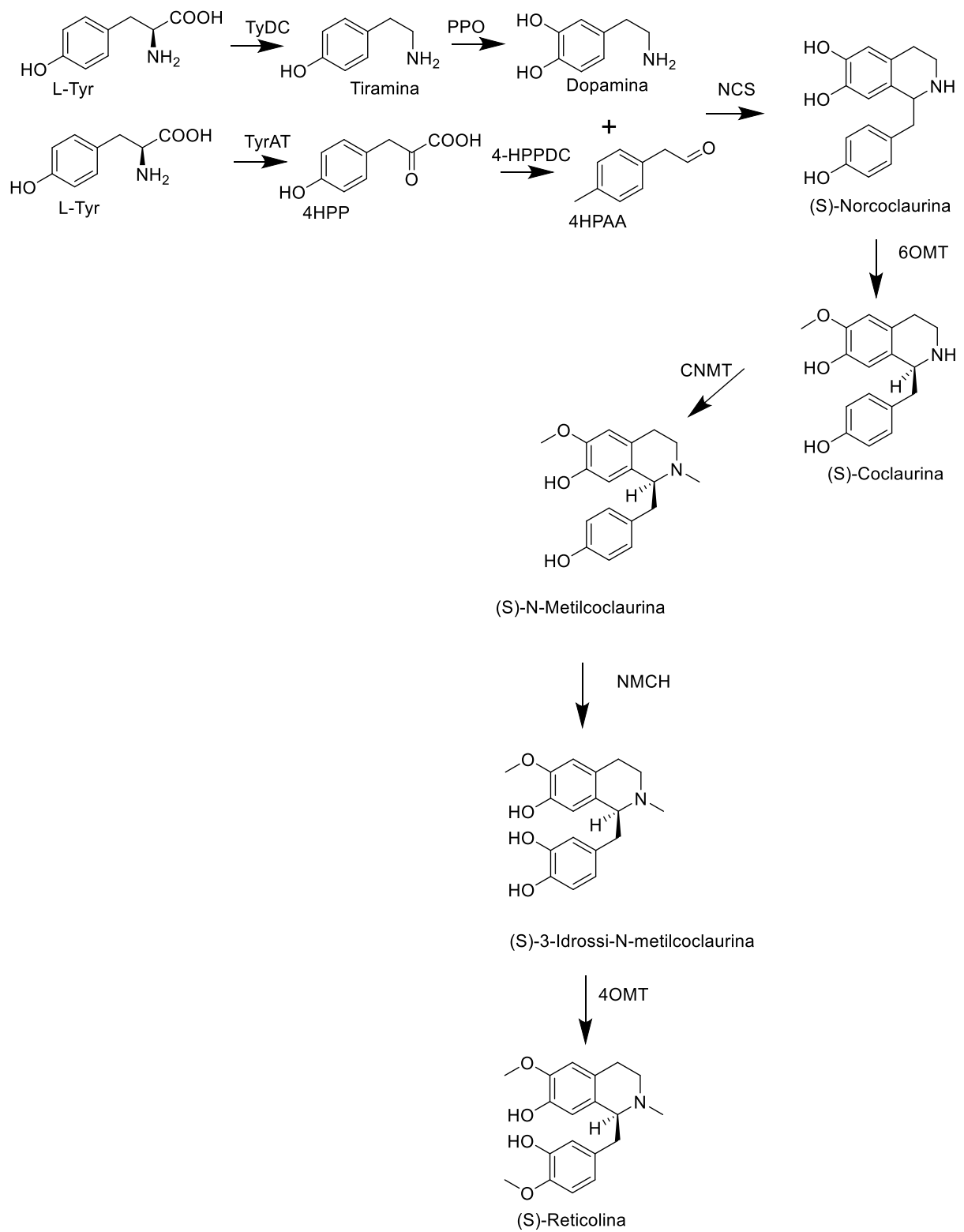


Figura 16 via comune degli alcaloidi del papavero.

Via biosintetica degli alcaloidi fenantrenici: tebaina, morfina e codeina

Per arrivare alla biosintesi dei tre alcaloidi fenantrenici (Figura 17), la (*S*)-reticulina deve subire l'azione dell'enzima STORR indicante reticulina (S) to (R), chiamato anche REPI (reticulina epimerasi). Come indica il nome di questo enzima, la reazione catalizzata è una epimerizzazione che permette di invertire la stereochimica della (*S*)-reticulina portando alla formazione del suo enantiomero destrogiro: la (*R*)-reticulina.

Nello studio condotto da Vadhel e colleghi tale reazione di epimerizzazione avviene mediante la DRS (1,2-deidroreticulina sintasi) che catalizza una prima reazione di ossidazione portando alla formazione di 1,2-deidroreticulina; successivamente quest'ultimo intermedio subisce l'azione di DRR (1,2 deidroreticulina reduttasi) che catalizza la sua riduzione in (*R*)-reticulina. Si ha poi l'intervento dell'enzima SalSyn (salutaridina sintasi) CYP450 dipendente responsabile dell'accoppiamento fenolico intramolecolare tra due carboni della (*R*)-reticulina che la trasforma in salutaridina, un primo alcaloide tetraciclico.

La reazione seguente è una riduzione stereospecifica del C7 del gruppo chetonico della salutaridina catalizzata da SalR (salutaridina-7-ossidoreduttasi) forma salutaridinolo. Quest'ultimo grazie a SalAT (salutaridinolo-7-O-acetil transferasi) subisce una acetilazione sempre sul C7 del gruppo idrossilico, portando alla formazione di salutaridinolo-7acetato, un intermedio altamente instabile che va incontro ad una perdita spontanea del suo gruppo acetile e un successivo riarrangiamento in tebaina, il primo alcaloide morfino pentaciclico (Labanca et al., 2018). Bisogna ricordare in questo ultimo step che per lungo tempo si pensava avvenisse spontaneamente, recentemente è stato identificato l'enzima THS (tebaina sintasi) responsabile di tale conversione.

Dalla tebaina dipartono due vie che portano alla sintesi degli altri due importantissimi alcaloidi fenantrenici: morfina e codeina.

- a. La via biosintetica che avviene maggiormente è quella in cui la tebaina subisce una 6-*O*-demetilazione catalizzata da T6ODM (tebaina-6-*O*-demetilasi) trasformandosi in neopinone, il quale si converte a codeinone. Anche in questo caso recentemente è stato identificato l'enzima NISO (neopinone isomersi) responsabile di tale conversione. L'intervento di CoR (codeinone reduttasi) riduce codeinone in codeina; infine, attraverso la sua 3-*O*-demetilazione catalizzata da CODM (codeina-*O*-demetilasi) si trasforma in morfina.

b. In alternativa partendo dalla tebaina vi è anche una seconda possibilità per ottenere la morfina attraverso una via che avviene meno rispetto alla prima. L'enzima CODM (codeina-*O*-demetilasi) catalizza la 3-*O*-demetilazione trasformando la tebaina in oripavina, un alcaloide con nucleo fenantrenico, che successivamente subisce l'azione in sequenza dei tre enzimi visti precedentemente (T6ODM, NISO e CoR), trasformandosi rispettivamente in neomorfinone, morfinone ed infine morfina (Ozber, N. et al., 2022).

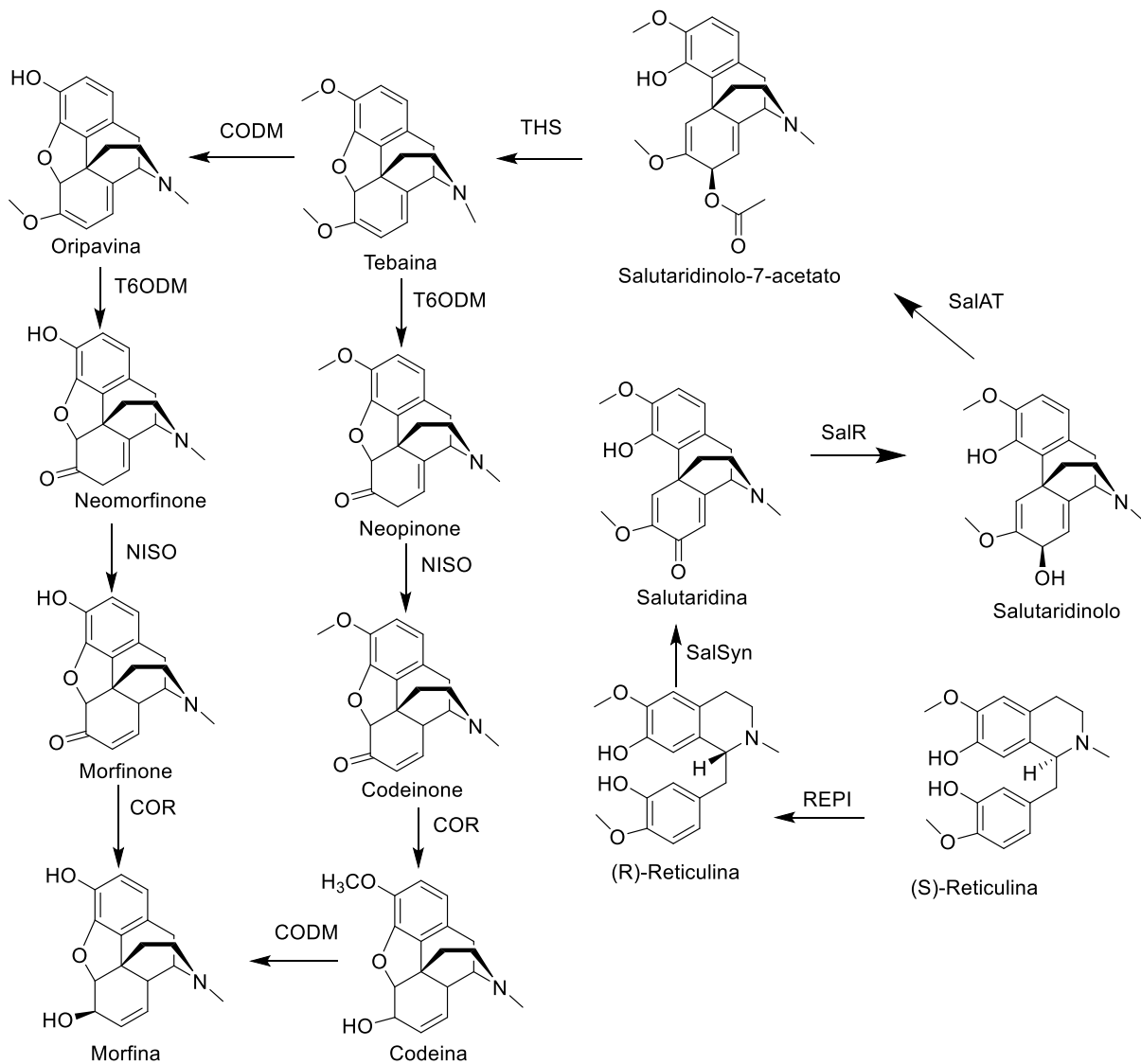


Figura 17 Via biosintetica degli alcaloidi fenantrenici.

Via biosintetica della papaverina

A differenza degli altri quattro alcaloidi, non è stata ancora completamente chiarita la biosintesi di questo alcaloide 1-benzilisoquinolinico. Sono stati suggeriti due percorsi, illustrati in (Figura 18), i quali dipartono da due intermedi differenti: la (*S*)-coclaurina, e (*S*)-reticulina, ma che entrambi portano alla formazione di un intermedio comune: la tetraidropapaverina da cui poi si formerà la papaverina.

- a. Partendo dalla (*S*)-coclaurina, essa subisce una idrossilazione e una metilazione, in cui si forma rispettivamente (*S*)-6-*O*-metil norlaudanosolina e successivamente (*S*)-norreticulina. L'enzima responsabile pare sia 4OMT (3-idrossi-*N*-metilcoclaurina-4-*O*-metiltransferasi). Successivamente l'enzima N7OMT (norreticulina-7-*O*-metiltransferasi) catalizza una seconda metilazione ottenendo la (*S*)-norlaudanina, che attraverso l'azione di 3OMT (3-*O*-metiltransferasi) si formerà (*S*)-tetraidropapaverina (l'intermedio comune in cui convergono le due vie). Questo intermedio subisce poi l'azione di TPOX (tetraidropapaverina ossidasi) che catalizza una deidrogenazione a diidropapaverina ed infine un enzima non noto la trasforma in papaverina. Recentemente è stato identificato l'enzima DBOX (diidrofenantridina ossidasi) che permette la formazione di papaverina direttamente dalla (*S*)-tetraidropapaverina.
- b. L'altra via alternativa che parte invece dalla (*S*)-reticolina prevede l'azione di 7OMT (reticolina-7-*O*-metiltransferasi) e 3OMT che catalizzano delle metilazioni trasformandola rispettivamente in (*S*)-laudanina e poi in (*S*)-laudanosina. Non sono noti gli enzimi che da quest'ultimo intermedio portano alla formazione della (*S*)-tetraidropapaverina che essendo l'intermedio in cui le due vie alternative convergono, si avrà la formazione di papaverina, tramite l'azione catalizzate da enzimi precedentemente descritti (Vadhel et al., 2023).

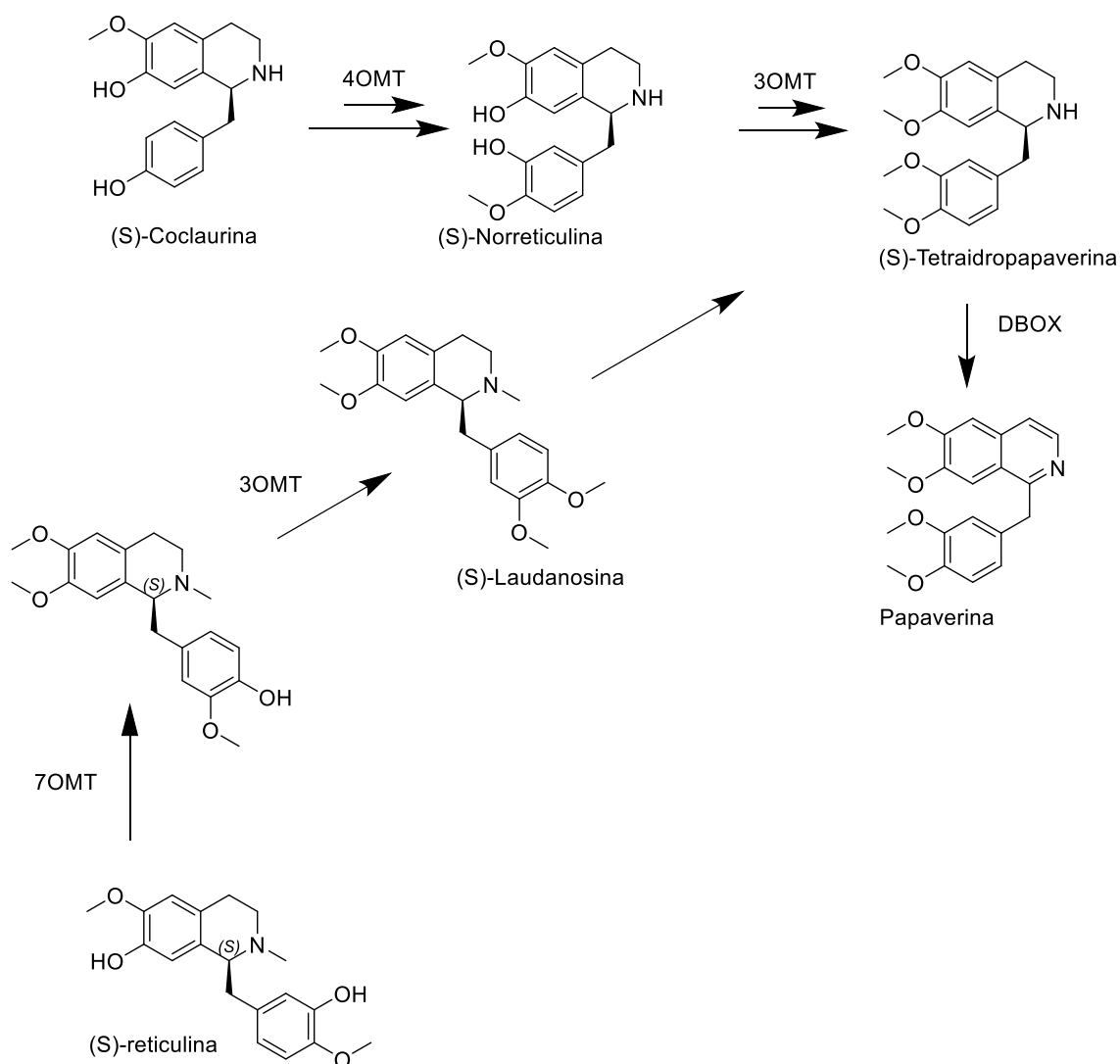


Figura 18 Via biosintetica della papaverina.

Via biosintetica della noscapina

La noscapina è un alcaloide che strutturalmente si classifica come ftalidillisoquinolinico. Il primo passaggio per la sua biosintesi è rappresentato dalla conversione della (S)-reticulina in (S)-scloureina che avviene grazie all'enzima BEE (enzima ponte della barberina). La (S)-scloureina successivamente viene trasformata dall'enzima SOMT (scloureina-9-O-metiltransferasi) in (S)-tetraidrocolumbamina. A livello di questo intermedio agisce CAS (canadina sintasi) un enzima metilendiossi che porta alla formazione di un ponte metossilico, formando la (S)-canadina; essa subisce una N-metilazione dall'enzima TNMT (tetraidroprotobarberina N-metiltrasferasi) formando S-N-metilcanadina (Facchini, P. J. et al., 2007).

Da questo intermedio in poi avvengono sequenzialmente una serie di reazioni di idrossilazioni, acetilazioni, metilazioni ed esterificazioni fino ad arrivare alla formazione dell'intermedio narcotina emiacetale. L'ultimo passaggio coinvolge l'enzima NOS (noscapina sintasi) che attraverso una reazione di ossidazione del emiacetale porta alla formazione della noscapina (Facchini, P. J. et al., 2007) (Figura 19).

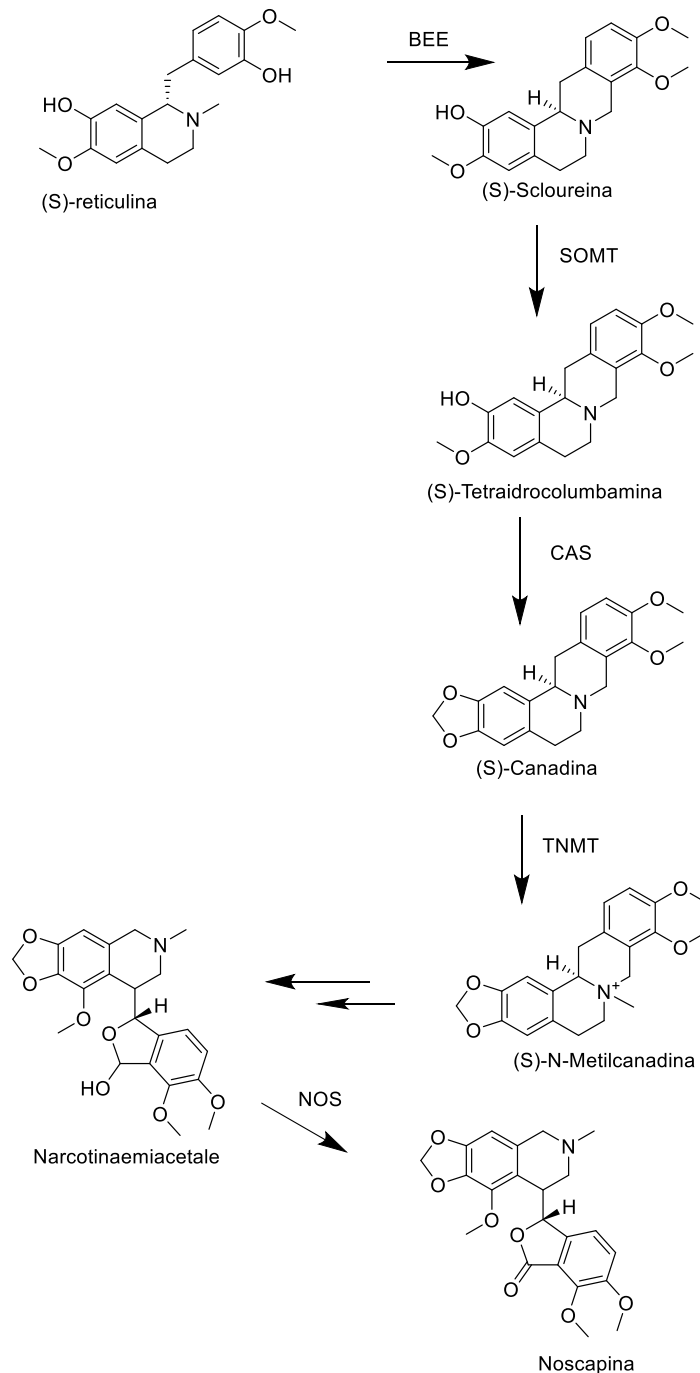


Figura 19 Via biosintetica della noscapina.

Lo studio e la regolazione del metabolismo biosintetico della morfina e di altri alcaloidi nel papavero da oppio sono stati possibili grazie all'identificazione e isolamento di specifici frammenti di cDNA (DNA complementare) corrispondenti 10 enzimi coinvolti nella conversione di *S*-norcoclaurina in morfina (6OMT, CNMT, NMCH, 4OMT, SalSyn, SalR, SalAT, CODM, T6ODM, e CoR). In particolare, i geni che codificano per gli ultimi sei enzimi a valle della diramazione che porta alla biosintesi degli alcaloidi morfïnici (Salsyn, SalR, SalAT, T6ODM, COR e CODM) sono espressi in maniera elevata nella varietà di *Papaver somniferum*, confermando l'abbondanza tali alcaloidi in questa specie.

L'identificazione di questi cDNA permetterà di ottenere cultivar di papavero, attraverso processi di ingegneria metabolica, che possono sopperire le grandi richieste mondiali di farmaci analgesici oppiacei (Ziegler et al., 2004).

3.5 Regolazione dell'espressione genica nel *Papaver somniferum*

La biosintesi degli alcaloidi all'interno delle piante di papavero può essere aumentata in presenza di stress ambientale indotto dagli elicitori. Gli elicitori sono sostanze molto eterogenee come ad esempio funghi, metalli pesanti, microrganismi patogeni e piccole molecole organiche che determinano condizioni di stress, tali da indurre una sovra regolazione producendo alta concentrazione di BIA.

Un aumento della trascrizione genica coinvolta nella biosintesi dei BIA è stato ottenuto trattando colture di papavero da oppio con un elicitore fungino aggiunto alla coltura di cellule di papavero per aumentare i livelli di produzione di alcaloidi (O'Connor, S. E., 2010). L'elicitazione di cellule di papavero permette l'attivazione non solo di vie di segnalazioni dipendenti dal jasmonato, ma anche altre vie indipendenti da esso che provocano l'aumento della trascrizione di enzimi biosintetici. Per quanto riguarda la via dipendente dal jasmonato, in presenza di elicitore fungino, attraverso la captazione da parte di recettori espressi a livello delle membrane plasmatica della cellula vegetale, si ha l'aumento del calcio intracellulare con l'attivazione di una lipasi di membrana che idrolizzerà i fosfolipidi di membrana producendo acido alfa linolenico. Da esso si attiva una via che porta alla formazione di acido jasmonico e metil-jasmonato, due ormoni vegetali derivati da acidi grassi coinvolti nelle regolazioni delle risposte di difesa come la produzione dei metaboliti secondari. Questi due ormoni a livello nucleare attivano dei fattori trascrizionali di geni che esprimono gli enzimi della biosintesi degli

alcaloidi. L'obiettivo dei ricercatori è quello di identificare dei fattori trascrizionali implicati nella regolazione del metabolismo dei BIA nel *P. somniferum* in modo da poter regolarne in vivo il metabolismo, ma attualmente l'identificazione dei fattori di trascrizione coinvolti nel metabolismo degli alcaloidi nel papavero da oppio è ancora in fase di studio.

3.6 Studi di localizzazione cellulare

La localizzazione specifica del tipo cellulare in cui avviene la biosintesi dei BIA è stata a lungo studiata in particolare per quanto riguarda la biosintesi della morfina e degli altri due alcaloidi morfiniti. L'ipotesi iniziale che per lungo tempo sembrava essere più plausibile è che la biosintesi avvenisse esclusivamente all'interno dei dotti laticiferi. Il motivo deriva dal fatto che all'interno del lattice di papavero si accumulano grandi quantità di morfina ed anche altri metaboliti secondari (codeina, tebaina, noscapina e papaverina). Il lattice rappresenta il citoplasma secreto da cellule altamente specializzate chiamate cellule laticifere che formano un efficiente sistema secretorio nella pianta (Onoyovwe, A., 2013). Tuttavia, alcuni enzimi chiave nella biosintesi della morfina non sono stati rilevati all'interno del lattice, ipotizzando che alcuni steps enzimatici avvenissero in una sede diversa.

L'impiego di moderne tecniche biotecnologiche come l'immunofluorescenza ha permesso infine, di comprendere la localizzazione cellulare specifica degli enzimi coinvolti negli step biosintetici. Questa tecnica prevede l'impiego di anticorpi monoclonali diretti verso gli enzimi coinvolti nei vari step biosintetici che portano alla produzione della morfina. Questi enzimi sono stati identificati non solo all'interno dei tubi laticiferi, ma anche in altre due sezioni cellulari adiacenti: gli elementi setaccianti e le cellule compagne del floema (Ngermsaengsaruy et al., 2023).

Il floema è un tessuto di conduzione delle piante, cioè un tessuto del sistema vascolare adibito al trasporto di soluti e macromolecole. Esso è costituito da due tipi di cellule floematiche: le cellule compagne ossia cellule specializzate che aiutano il floema a svolgere il suo ruolo di conduzione e trasferimento e gli elementi setaccianti (o elementi cribrosi) responsabili del trasporto degli zuccheri in tutta la pianta e che presentano delle aree porose chiamate aree cribrose la cui funzione è quella di permettere la connessione citoplasmatica tra cellule adiacenti (Onoyovwe, A., 2013).

All'interno degli elementi del setaccio del floema si sono identificati sia gli enzimi coinvolti nella "via comune", che inizia dall'unione dei due derivati tirosinici e conclude con la formazione della (*S*)-reticolina (NCS, 6OMT, CNMT, NMCH, e 4OMT), sia tutti gli enzimi della via biosintetica degli alcaloidi morfincici, che convertono la (*R*)-reticolina in morfina (SalSyn, SalR, SalAT, T6ODM, COR e CODM). Tuttavia, la loro concentrazione all'interno degli elementi del setaccio è differente, infatti, gli ultimi 3 enzimi della via della morfina (T6ODM, COR, CODM) si trovano a concentrazioni molto basse rispetto a tutti gli altri appena citati. Scenario opposto si ha all'interno dei laticiferi in cui non è presente alcun enzima coinvolto nella via comune; mentre per quanto riguarda gli enzimi coinvolti nella via biosintetica della morfina: SalSyn non è presente, SalR e SalAT sono presenti a concentrazioni bassissime ed infine gli ultimi 3 enzimi sono presenti in abbondanza all'interno dei laticiferi. (Figura 20).

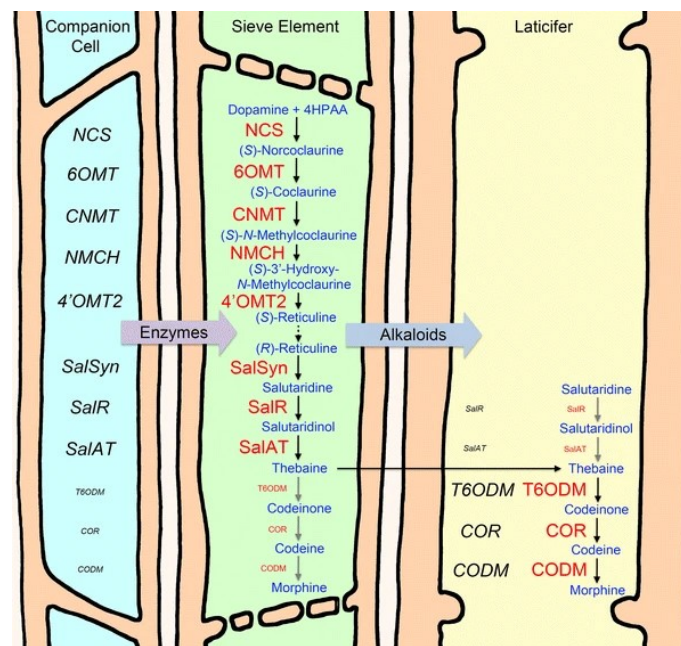


Figura 20 Localizzazione cellulare degli enzimi biosintetici che portano alla biosintesi degli alcaloidi morfincici.

In mancanza di molti enzimi essenziali per la biosintesi degli alcaloidi morfincici si può dedurre che i laticiferi non rappresentano l'unico compartimento cellulare adibito alla biosintesi, estendendo così questa la funzione degli elementi setaccianti del floema anche come tessuto in cui avviene la biosintesi, oltre che al suo ruolo di trasporto di soluti e macromolecole. Infatti, alcuni intermedi biosintetici sono traslocati da un compartimento cellulare all'altro, cioè dagli elementi del setaccio ai laticiferi, per completare la trasformazione biosintetica.

La tebaina è l'alcaloide maggiormente traslocato. Non sono ancora del tutto noti i meccanismi di traslocazione ma pare che avvengano grazie alla presenza di canali citoplasmatici, una sorta di pori nella parete cellulare chiamati plasmodesmi (Onoyovwe, A., 2013). Un altro possibile meccanismo sembra essere il passaggio attraverso le membrane mediante il coinvolgimento di alcuni trasportatori (Facchini, P. J. et al., 2007).

Nonostante i forti dubbi sulla localizzazione cellulare-specifica in cui avviene la biosintesi degli alcaloidi, l'ipotesi più plausibile sembrerebbe essere quella che descrive le cellule compagne come la sede in cui avvengono la traduzione dei geni che codificano per gli enzimi biosintetici. Gli enzimi successivamente sono trasportati agli elementi del setaccio, il sito principale in cui avvengono in modo particolare le fasi a monte della biosintesi (poiché gli ultimi 3 enzimi della via si trovano a bassissime concentrazioni).

Infine, alcuni intermedi (tra cui tebaina in modo particolare, ma anche morfina e codeina) prodotti a livello degli elementi del setaccio, sono trasportati nelle cellule laticifere prossimali o adiacenti alle cellule compagne e agli elementi del setaccio. Quindi le cellule laticifere sono coinvolte nelle fasi finali della biosintesi e nello stoccaggio, come elementi di immagazzinamento e conservazione della morfina ed altri alcaloidi (Labanca et al., 2018). Si può quindi dedurre che la biosintesi e l'accumulo della morfina e degli altri quattro BIA avviene grazie alla complessa interazione di questi tre tipi di cellule: i laticiferi, le cellule compagne e gli elementi setaccianti (Bird et al., 2003) (Figura 21).

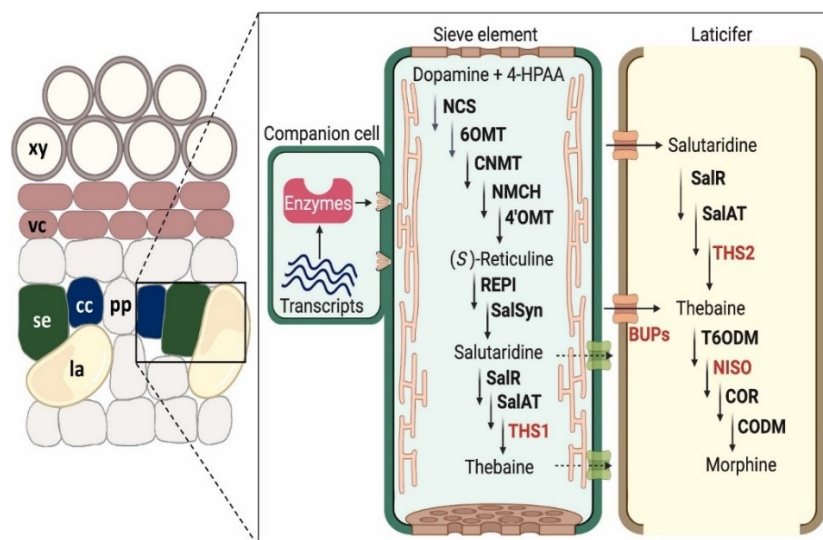


Figura 21 Modello di localizzazione cellulare in cui sono mostrati i ruoli delle cellule compagne, elementi del setaccio e dei lattiferi nella biosintesi della morfina; inoltre è mostrata l'abbondanza relativa degli enzimi biosintetici all'interno di questi compartimenti.

3.7 Miglioramento del profilo genetico del papavero

Esistono tre genotipi di papavero da oppio in base al loro impiego: il genotipo industriale dove la sua coltivazione ha lo scopo di estrarre gli alcaloidi; il genotipo culinario: coltivazione per produzione di semi e olio e infine il genotipo misto usato per entrambi gli scopi (Labanca et al., 2018). La richiesta globale dell'oppio o delle CPS del papavero da parte delle industrie farmaceutiche per la produzione di farmaci è sempre in crescita e con essa anche la richiesta dei semi. Per poter rispondere in maniera sostenibile, l'obiettivo dei ricercatori è quello di migliorare il profilo genetico della pianta in modo da selezionare linee di papavero ad alto rendimento di alcaloidi (Dittbrenner, A. et al., 2012).

In precedenza, l'alcaloide maggiormente richiesto fu la morfina grazie alle sue possibili azioni biologiche; il rovescio della medaglia è che essa possiede azioni narcotiche stupefacenti ed è molto facilmente convertibile illecitamente in eroina nei "laboratori illegali" in tutti quei territori in cui la coltivazione illecita di papavero è ampiamente diffusa.

Per contrastare le coltivazioni illegali, attualmente i ricercatori stanno cercando di sviluppare varietà di *Papaver somniferum* a basso contenuto o prive di morfina ma che possiedono alto contenuto di tebaina, oripavina prive di azione narcotica stupefacente (Facchini, P. J. et al., 2007).

Selezione per mutazione: il mutante TOP1

Il papavero da oppio è un bersaglio di mutazioni mirate verso un gene specifico per poi analizzare il fenotipo risultante. I metodi che generalmente sono utilizzati sono la mutagenesi chimica basata sull'utilizzo di agenti alchilanti come l'EMS (etilmetansolfonato) o le radiazioni ionizzanti. Queste mutazioni sono in grado di modificare la sintesi, l'accumulo di vari intermedi del percorso biosintetico e sviluppare diverse linee di papavero da oppio associate a diversi fenotipi di alcaloidi.

Un'industria farmaceutica della Tasmania, la quale sviluppa oltre 40 % di oppiacei leciti in tutto il mondo, ha condotto un esperimento su semi di papavero narcotico utilizzando mutageni chimici e fisici, quali EMS e raggi gamma, ottenendo una coltura non narcotica nota come mutante TOP1 ("tebaina oripavina papavero 1") in grado di accumulare tebaina e oripavina ma non morfina e codeina. La scoperta del mutante TOP1 ha permesso alle industrie farmaceutiche di usare colture di papavero prive di morfina con il vantaggio non solo di ridurre il rischio dell'uso illecito di cultivar narcotiche cercando di controllare il traffico di droga, ma anche di

consentire agli agricoltori di coltivare con facilità il papavero senza ottenere licenze o autorizzazioni.

Inoltre, l'utilizzo delle industrie di cultivar TOP1 non impedisce loro di sviluppare farmaci oppiacei, infatti oripavina e tebaina non solo sono due intermedi della via biosintetica fenantrenica, da cui si possono ottenere per semisintesi morfina e codeina, ma sono anche intermedi di numerosi farmaci oppiacei impiegati come possibili analgesici o nel trattamento della dipendenza da oppioidi come ad esempio ossicodone e buprenorfina che proprio la Tasmania Company sviluppa dal 1998 a partire dalla varietà TOP1 (Mishra, B. K. et al., 2013).

L'unico cambiamento morfologico visibile nel mutante è la colorazione del suo lattice che invece di apparire bianco è di colore rossiccio e pigmentato. Questo cambiamento di colore rappresenta un affidabile indicatore di linee di papavero con questo fenotipo caratteristico.

Non sono ancora stati identificati i geni responsabili del fenotipo TOP1; quello che si è potuto comprendere è che le mutazioni geniche provocano alterazioni nella trascrizione genica di enzimi biosintetici dei BIA, o di trasportatori degli intermedi metabolici. Infatti, delle possibili spiegazioni responsabili del blocco della biosintesi di morfina potrebbero risiedere in una mutazione a livello del gene che codifica:

- Per l'enzima T6ODM, la demetilasi responsabile della 6-*O*-demetilazione, sia della tebaina che di oripavina, che avviene in entrambe le ramificazioni della via della morfina, provocando un blocco a livello trascrizionale che impedisce la biosintesi della morfina.
- Oppure per un trasportatore che normalmente ha la funzione di traslocare i substrati tebaina e oripavina dagli elementi del setaccio verso i laticiferi, i quali sono la sede cellulare in cui avviene la maggior parte della *O*-demetilazione. Questa alterazione nella componente di trasporto impedisce la traslocazione dei substrati nei laticiferi e di conseguenza la loro trasformazione in morfina (Millgate, A. G. et al., 2004) (Figura 22).

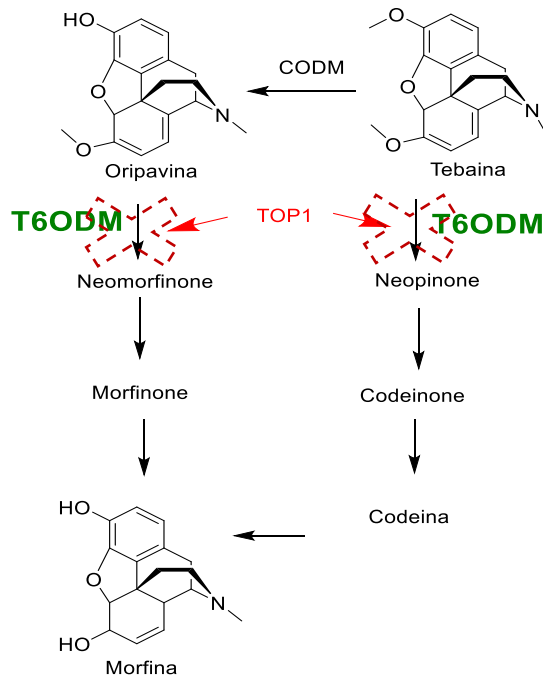


Figura 22 Parte della via biosintetica della morfina in cui avviene il blocco della sua biosintesi.

L'utilizzo di mutagenesi indotta EMS ha creato diverse mutazioni localizzate nel papavero da oppio associate a diversi fenotipi di alcaloidi. Mediante sequenziamento dei geni è stato possibile identificare 5 diverse varietà commerciali di papavero con variazioni dei livelli di morfina, codeina, tebaina, oripavina e nell'aspetto morfologico del lattice. Si sono identificate cultivar ad alto contenuto di morfina e moderati livelli di tebaina e oripavina; cultivar ad alti livelli di morfina e bassi livelli di tebaina, oripavina e codeina; cultivar ad alti livelli di morfina, oripavina e tebaina; cultivar ad alti livelli di oripavina e tebaina ma bassi livelli di morfina e codeina (simile al mutante TOP1) ed infine cultivar a bassi livelli di tutti gli alcaloidi che potrebbero essere utilizzati per scopo alimentare o ornamentale.

Nella figura 23 sono indicati i 5 grafici (A, B, C, D, ed E) nei quali vengono mostrati i picchi relativi alla composizione quali-quantitativa del lattice con colorazioni diverse: rosso indica la morfina, blu l'oripavina e verde la tebaina.

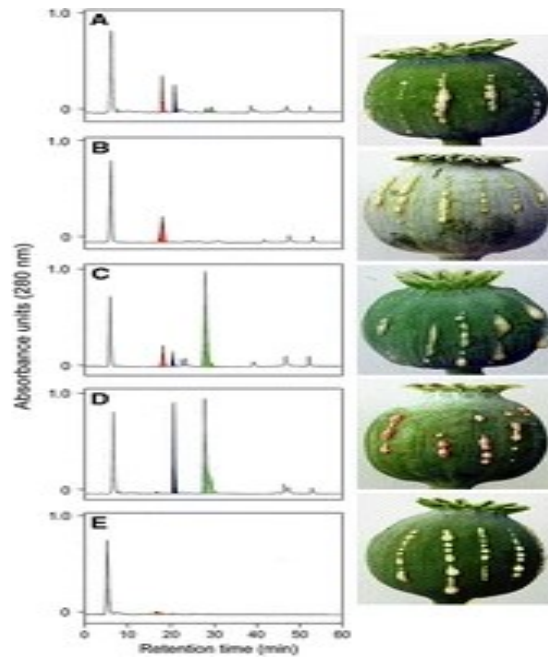


Figura 23 Viene mostrato il grafico e i relativi picchi corrispondenti agli alcaloidi nelle rispettive 5 cultivar di papavero (indicate con le lettere A, B, C, D ed E; il picco rosso indica morfina, il blu l'oripavina ed infine il verde la tebaina. Inoltre sono indicate la variazione del colore del lattice in base alla cultivar:

La conoscenza delle trasformazioni geniche che provocano un'alterazione dell'attività enzimatica degli enzimi implicati nella via biosintetica degli alcaloidi BIA, e conseguentemente una loro modifica di biosintesi è un aspetto cruciale per cercare di regolare il metabolismo dei BIA nel *P. somniferum* al fine di ottenere cultivar a scopi sia commerciali che sperimentali attraverso l'impiego di ingegneria biotecnologica. Tuttavia, ci sono ancora grossi limiti da superare a causa della scarsa disponibilità di protocolli di trasformazioni genica nel *P. somniferum* (Facchini, P. J. et al., 2007).

3.8 Estrazione e purificazione alcaloidi del papavero

Turchia fornitore principale di paglia di papavero

In Turchia la coltivazione di papavero per la raccolta di oppio è vietata dal 1971 in modo da limitare l'utilizzo illegale, mentre la coltivazione della pianta per la produzione della paglia di papavero è consentita. La Turchia rappresenta il maggior produttore di paglia di papavero utilizzata dalle aziende farmaceutiche per l'estrazione degli alcaloidi in modo da soddisfare le grandi richieste del mercato a scopo medico-scientifico.

Gli agricoltori effettuano tutte le pratiche di coltivazione: dalla preparazione adeguata del terreno, alla disinfestazione da parassiti ed erbe fino alla falciatura, raccolta della capsula a

completa maturazione ed essiccazione. Una “strategia” per riconoscere se le capsule hanno raggiunto il loro tempo balsamico avviene mediante la loro agitazione che permette di riconoscere il suono provocato dai semi non più adesi alla placenta del frutto.

La coltivazione, la produzione e il commercio del papavero da oppio restano comunque sotto il rigido controllo di autorità che fanno parte della Convenzione Unica degli Stupefacenti delle Nazioni Unite risalente al 1961 (Baser et al., 2014).

Infatti, in Turchia la filiera della paglia di papavero è strettamente regolata da severe normative e deve avvenire all’interno di aree ben precise e stabilite dalla TMO (Toprak Mahsulleri Ofisi) e cioè l’Ufficio per i Prodotti del Suolo.

Il TMO si occupa di fornire la licenza agli agricoltori per la coltivazione del papavero, definire e controllare i territori in cui ne è autorizzata, controllare periodicamente le conformità delle coltivazioni, definire le specifiche-requisiti di acquisto della paglia di papavero e successivamente provvedere al suo trasporto nelle fabbriche per le lavorazioni. Inoltre, TMO detiene il monopolio degli stupefacenti in Turchia ed è quindi l’unico e solo acquirente che provvederà all’acquisto della paglia di papavero fornita dai coltivatori i quali sono obbligati a consegnarla dichiarandone il peso del raccolto⁹.

Secondo TMO, le specifiche per l’acquisto della paglia di papavero sono le seguenti (Baser et al., 2014):

- Il contenuto di umidità non deve superare il 12%.
- Il contenuto di semi non deve superare l’1%
- La capsula non deve contenere parti verdi del frutto.
- Le capsule non devono essere danneggiate, ammuffite o fermentate, e devono avere colore e profumo naturali.
- Non sono ammesse capsule incise (dette “capsule con lancia o lanceolate”); tali capsule verranno confiscate con avviamento di procedure legali.
- I corpi estranei (rappresentate da parti organiche e inorganiche) non devono superare l’8%.

Nella nazione turca la più grande industria di alcaloidi del papavero da oppio si trova nella città di Afyonkarahisar dove sono trattate oltre 25 tonnellate annue di capsule non incise per

⁹ <https://www.tmo.gov.tr/>: <https://www.tmo.gov.tr/>

l'ottenimento di morfina, codeina e tutta una serie di derivati salificati che saranno venduti all'estero. Questi alcaloidi devono essere conformi agli standard di riferimento delle tre principali farmacopee al mondo: la Farmacopea degli Stati Uniti (USP), la Farmacopea Europea (EP) e la Farmacopea Britannica (BP), e i processi devono essere eseguiti secondo le GMP (Good Manufacturing Practice). Se tutto ciò sarà rispettato, allora potranno essere venduti in tutto il mondo¹⁰.

Produzione di morfina fiale a partire dalla paglia di papavero

Tra tutti gli alcaloidi biosintetizzati naturalmente dal papavero da oppio, il più abbondante ed anche il più importante a livello farmaceutico è la morfina. Per questo motivo, le metodiche per il suo isolamento sono in continua evoluzione al fine di ottenere una maggiore resa, ridurre l'impatto ambientale e la produzione di scarti, riciclare solventi di estrazione utilizzati, contenere i consumi energetici ed i costi di produzione.

Genericamente la lavorazione della paglia di papavero prevede degli step quali: la rimozione dei residui di steli e dei semi tramite un'operazione di fresatura e la macinazione all'interno di mulini in modo da ridurre le dimensioni fino ad ottenere una farina omogenea comunemente chiamata concentrato di paglia di papavero (CPS).

Il metodo di estrazione tramite metanolo basificato con idrossido di sodio in grado di convertire gli alcaloidi nei loro rispettivi sali anionici è stato abbandonato a causa della pericolosità. Si è cercato di sostituire il metanolo con etanolo, tuttavia la morfina risulta essere poco solubile e questo richiedeva un volume notevole di solvente e tempi troppo lunghi dovuti al riciclo del solvente stesso.

Il metodo che trova maggior applicazione è costituito dall'impiego di acqua deionizzata (DI) resa leggermente acida dall'aggiunta di acidi deboli come, ad esempio, acido acetico glaciale o acido formico all'88% i quali conferiscono un valore di pH di circa 3. In queste condizioni, gli alcaloidi sono presenti in soluzione acquosa come sali cationici. La fase acquosa acida contenente gli alcaloidi è separata da CPS tramite filtrazione con l'utilizzo di vuoto. A questo punto si può procedere secondo due metodiche diverse: la basificazione della fase acquosa acida e la raccolta degli alcaloidi come precipitati insolubili qualora possibile, per rimuovere ulteriori impurità e/o qualche piccola frazione di codeina rimanente.

¹⁰ <https://www.tmo.gov.tr/>

Questo avviene grazie alla variazione di pH ottenuta aggiungendo idrossido di sodio a pH 9.1.

La completa precipitazione della base libera morfina avviene dopo circa 12 ore, successivamente è eseguita una filtrazione con vuoto in modo da separare il precipitato dalla fase liquida.

Oppure la morfina è ottenuta tramite una distillazione a pressione ridotta in modo da rimuovere una certa quantità desiderata di acqua ed ottenere una concentrazione approssimativa di 56 g/L di morfina con pH 2.8-3.

L'isolamento dei singoli alcaloidi, qualora siano ancora presenti in miscela, è eseguita mediante tecniche cromatografiche o flash chromatography per avere possibilità di carico maggiore. Come fase stazionaria può essere usata una fase inversa e come fase mobile acido acetico in soluzione acquosa a pH di 3.5 in modo da permettere l'eluizione solo di morfina e codeina ma non degli altri alcaloidi che costituiscono il papavero da oppio.

Dopo che le frazioni di morfina e codeina sono state eluite e raccolte, si procede con una seconda purificazione in fase inversa e fase mobile costituita da acetonitrile al 50% e acido acetico diluito al 50% a pH 3.5 ottenendo morfina ad una purezza del 99% e codeina al 75%. Quest'ultima è cristallizzata con toluene al fine da raggiungere una purezza adeguata all'utilizzo.

La morfina può essere disponibile in varie F.F. (Forme Farmaceutiche) come compresse, soluzione orale e soluzione iniettabile in forma di sale sodico in soluzione. Quest'ultima rappresenta una F.F. molto diffusa ottenuta per reazione con acido solforico a partire da morfina base libera in acqua per preparazioni iniettabili (WFI: Water For Injection). Si ricorda che il pH affinché la morfina solfato non si degradi deve essere minore di 7 ed il pH desiderabile è di circa 5.

Il trattamento finale riguarda la sterilizzazione e l'imballaggio.

La soluzione di morfina solfato ottenuta (10 mg) viene immessa in fiale da 2 mL che una volta tappate, sono introdotte in autoclave per procedere alla loro sterilizzazione mediante l'utilizzo di vapore saturo a 121 C° per 15 minuti per poi procedere al loro imballaggio (Lueck, A. E. 2014).

Morfina: controllo qualità

I controlli di qualità possono essere condotti sia sui singoli alcaloidi una volta isolati per garantirne la purezza, sia sul materiale vegetale di partenza per valutare il titolo degli alcaloidi stessi. Generalmente queste analisi si effettuano mediante tecnica HPLC.

I metodi possono essere diversi: Beasley e colleghi riportano un protocollo basato sull'utilizzo di fase diretta silice con un flusso di 1 mL/min utilizzando un metodo a gradiente (solvente A: cloroformio/metanolo/dietilammina 100:300:1; solvente B: solvente A/ e metanolo 10:1), detector UV a 254 nm.

Il cromatogramma (Figura 24) indica la separazione degli alcaloidi in ordine di polarità, dal più apolare al più polare: narcotina, papaverina, tebaina, codeina, morfina ed infine brucina usata come standard per valutare la concentrazione degli alcaloidi. Un esempio di campione analizzato con questo metodo ha indicato la presenza di morfina in concentrazione pari a 15,3 µg in un campione di oppio indiano (Beasley et al., 1974).

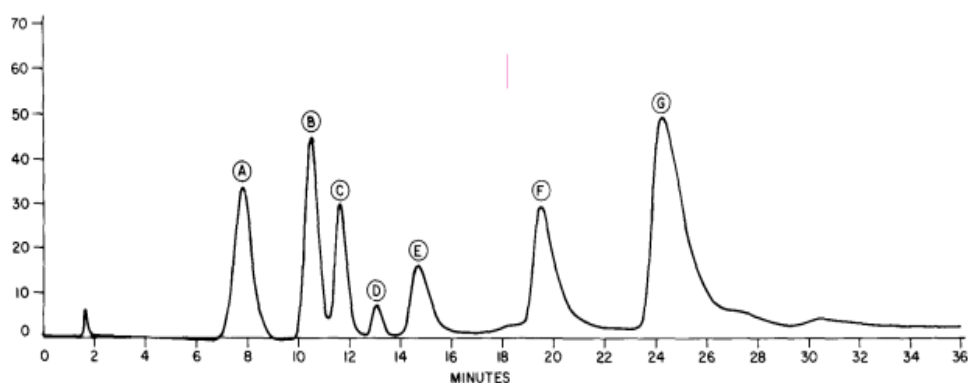


Figura 24 Cromatogramma di un campione di oppio indiano; alcaloidi eluiti in ordine di polarità, dal meno polare al più polare; picco A=narcotina, picco B=papaverina, picco C=tebaina; picco D= criptopina; picco E= codeina; picco F=morfina; G=brucina (standard).

Il metodo analitico più utilizzato in HPLC riguarda però l'impiego di fase inversa o RP a gradiente. Metodo che prevede l'eluizione degli alcaloidi più polari seguiti da quelli meno polari.

In questo caso come mostrato nel cromatogramma (Figura 25) la prima molecola ad eluire è la morfina essendo la più polare. La fase stazionaria utilizzata è RP C-18 mentre la fase mobile è caratterizzata da solvente A: acido trifluoroacetico (TFA) 0,1 % in acqua e solvente B: metanolo lavorando ad un pH alcalino di 9,6 grazie all'aggiunta di TEA (trietilammina) (Acevska et al., 2012).

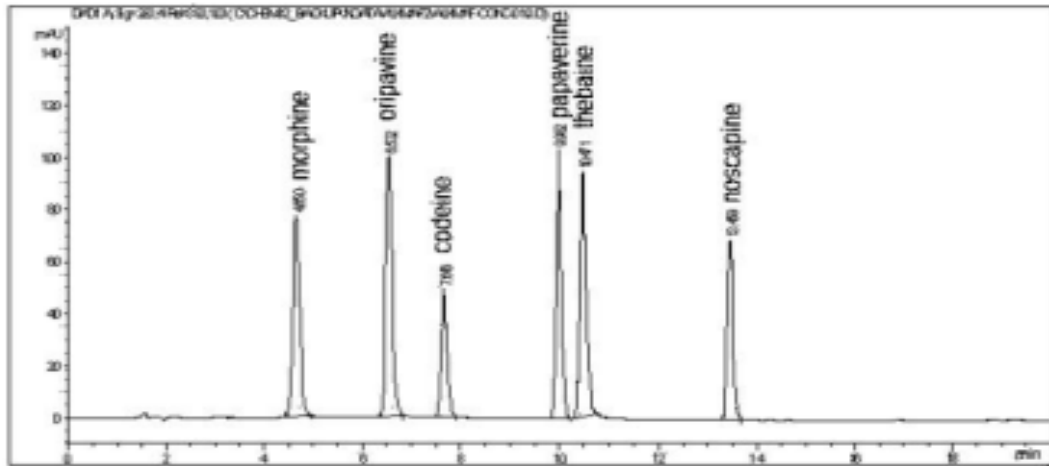


Figura 25 Cromatogramma prodotto da un'eluizione in HPLC RP, in cui le molecole eluiscono dalle più polari alle meno polari.

Altri protocolli sono riportati da Hejnak e colleghi che determinarono la concentrazione di alcaloidi nella paglia di 15 cultivar di *Papaver somniferum* (Hejnak et al., 2013). L'estratto ottenuto mediante estrazione con acido acetico al 5% è stato analizzato attraverso HPLC-MS (massa accoppiata), utilizzando un'eluizione a gradiente che vede come eluenti solvente A: acido formico 0,1% in metanolo e solvente B acido formico allo 0,1% in acqua deionizzata. In base al contenuto dei 4 alcaloidi più importanti nelle diverse cultivar si è potuto classificarli in 4 cluster:

cluster 1 ad alto contenuto di morfina (1.57% -1.72%) e basso contenuto degli altri 4 alcaloidi;

cluster 2 caratterizzato da cultivar ad alto contenuto dei 3 alcaloidi morfینici;

cluster 3 in cui i livelli di alcaloidi morfینici sono medio-bassi;

cluster 4 in cui vi sono cultivar caratterizzate da concentrazioni di alcaloidi basse, in particolare relative alla morfina che si trova allo 0.3%.

Cultivar con un contenuto maggiore di morfina e alcaloidi morfینici sono più interessanti per l'industria farmaceutica, mentre in ambito alimentare l'interesse è rivolto alle cultivar con basse quantità di alcaloidi.

Un altro studio condotto da Dittbrenner e ricercatori ha dimostrato come le condizioni climatiche influenzino il contenuto di metaboliti. Lo studio si è basato sulla raccolta di capsule mature in campo negli anni 2005, 2006 e 2007 e successivamente macinate ed estratte mediante metanolo 75%. L'estratto ottenuto è analizzato mediante HPLC in fase inversa utilizzando come

fasi mobile solvente A composto da una miscela di ammoniaca 0.1%, e cloruro di ammonio 0.1% a pH 8.8 e solvente B acetonitrile 100 %. Anche in questo caso i picchi sono stati identificati mediante spettro UV a 254 nm (Dittbrenner, A. et al., 2012).

L'attività enzimatica può infatti essere influenzata dalle basse temperature, dalle precipitazioni e forti vento che avvengono durante il periodo di maturazione, portano ad un danneggiamento della capsula riducendo il contenuto di alcaloidi. Anche il contenuto di umidità può influenzare negativamente il contenuto, in quanto causa la proliferazione di alcune specie fungine che compromettono il normale sviluppo della pianta. Infatti, l'analisi ha evidenziato come nel 2005, anno in cui si sono verificate maggiormente condizioni metereologiche avverse, la quantità di alcaloidi nelle capsule è risultata essere la più bassa determinando un contenuto totale dei 5 alcaloidi minimo di 680,30 µg/g massimo e 25.034,84 µg/g in droga secca. Negli anni successivi invece il contenuto totale è risultato maggiore arrivando ad un minimo di 1.609,49 µg/g ed un massimo di 25.338,55 µg/g fino a raggiungere contenuti tra il 1.126,21 – 18.749,14 µg/g rispettivamente negli anni 2006 e 2007 a causa di condizioni metereologiche più favorevoli caratterizzate da temperature più elevate. Grazie anche ad esperimenti condotti da Baser e colleghi, si può confermare che la pianta di papavero predilige il caldo e ambienti soleggiati, biosintetizzando un maggior quantitativo di morfina (Baser et al., 2014).

4. ASPETTO FARMACOLOGICO DEGLI ALCALOIDI DELL'OPPIO

4.1 I recettori degli oppioidi ed i loro ligandi endogeni ed esogeni

Alcuni alcaloidi del papavero da oppio trovano applicazione farmaceutiche grazie alla loro azione su recettori degli oppioidi classificati in tre principali tipologie: MOR, DOR e KOR rispettivamente indicati con le lettere greche μ , δ e κ . Recentemente è stato identificato anche un quarto recettore per gli oppioidi, ORL1 (noto anche come NOP). Essi sono espressi in tutto il sistema nervoso centrale e periferico ed appartengono alla classe dei recettori metabotropici caratterizzati da 7 domini transmembrana con regione *N*-terminale extracellulare e una regione intracellulare *C*-terminale, la quale è accoppiata ad una proteina G stimolatoria (Gs) oppure inibitoria (Gi) (Vadhel et Al., 2023).

I ligandi endogeni nel nostro organismo con la capacità di legarsi a questi recettori sono indicati come peptidi oppioidi e tra i principali troviamo le endorfine, le dinorfine e le encefaline. Una delle azioni più importanti esplicata dai ligandi endogeni è quella di modulare la risposta al dolore: i peptidi oppioidi, una volta rilasciati a causa di stimoli nocicettivi, hanno un ruolo fondamentale nel modulare in senso inibitorio la trasmissione discendente del dolore, ossia un insieme di sistemi neurotrasmettitoriali che dipartono a livello centrale e raggiungono la periferia (Vadhel et Al., 2023). Gli alcaloidi dell'oppio grazie ad una forte analogia strutturale con i peptidi endogeni, si legano e attivano i recettori degli oppioidi, in particolare ai recettori μ in maniera più forte e duratura rispetto ai ligandi endogeni, mimando i numerosi effetti degli oppioidi naturali. Essendo sostanze esogene di origine naturale gli alcaloidi dell'oppio sono indicati con il termine oppiacei; si ricorda che con il termine oppiaceo fa riferimento non solo a sostanze esogene di origine naturale, ma anche a quelle di origine semisintetica o sintetica prodotte a partire dagli alcaloidi naturali (Figura 26).

Naturali	Semisintetici	Sintetici
Morfina	Eroina	Meperidina
Codeina	Diidromorfina	Anileridina
Tebaina	Etilmorfina	Alfaprodina
	Idromorfone	Pentazocina
	Idrocodone	Fenazocina
	Ossimorfone	Levorfanolo
	Ossicodone	Metadone
	Metopon	Fentanile
	Tebacone	Destromoramide
	Diidrotebaina	Destromorfano
	Didrocodeina	Propossifene

Figura 26 Alcuni oppiacei di natura sintetica e semisintetica.

Possibili meccanismi d'azione degli oppiacei nell'indurre analgesia

Gli oppiacei sono stati e costituiscono tutt'ora uno dei principali rimedi per il trattamento del dolore. Grazie alla loro azione sui recettori sono in grado di bloccare la trasmissione nocicettiva sia periferica che centrale, dove alterano la risposta affettiva alla stimolazione dolorosa. Sono infatti in grado di modulare in senso negativo tutti i livelli della trasmissione ascendente del dolore: dal sistema periferico fino al centrale. Lo stimolo doloroso è trasmesso dalle terminazioni nervose nocicettive periferiche, al midollo spinale, al tratto spino-talamico, fino al raggiungimento di aree talamo-corticali. In quest'ultima area si ha la presa di coscienza dell'informazione nocicettiva, e di conseguenza il dolore subisce delle modificazioni emotive che lo rendono più o meno sopportabile e interpretabile. Gli oppiacei quindi, avendo un ruolo sulla componente emotiva, hanno azione definita analgesica e differiscono da altre sostanze ad azione antalgica o antidolorifica che invece non intaccano in alcun modo la componente sensoriale ed effettiva del dolore (Figura 27) (Brunton et, al., 2018).

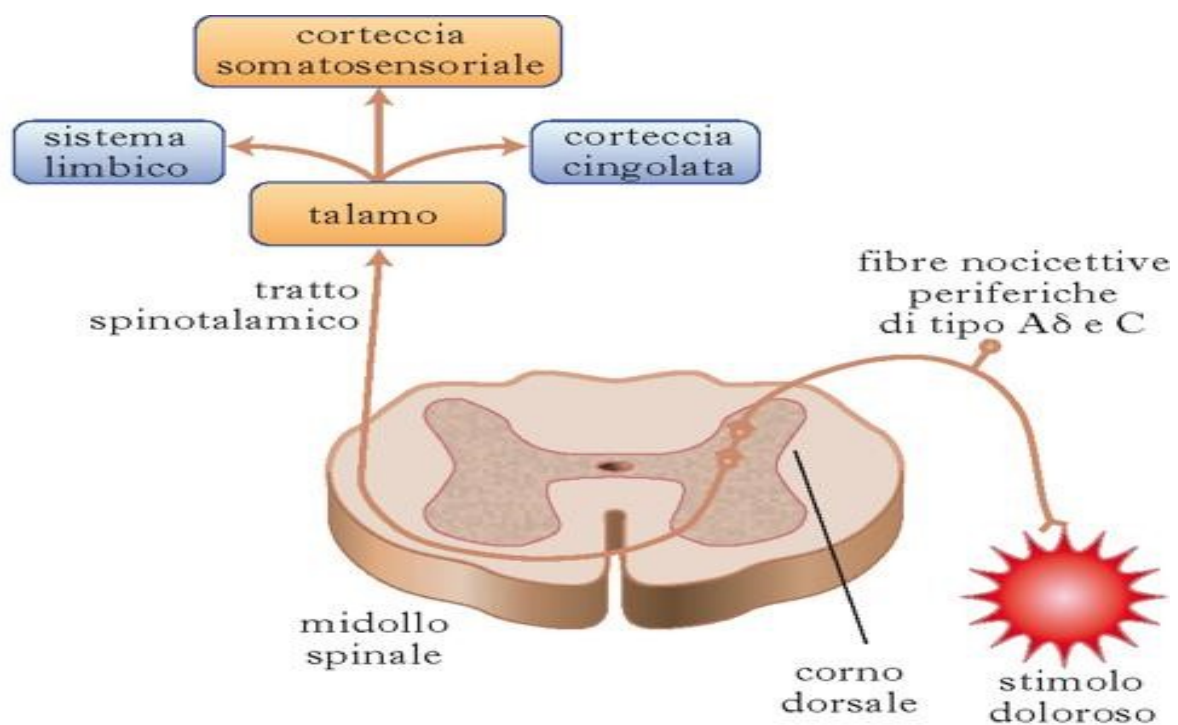


Figura 27 Stimolo dolorifico trasmesso dalla periferia fino a livello centrale.

Inibizione della via ascendente del dolore e potenziamento della via discendente

Uno dei principali meccanismi d'azione molecolari degli oppiacei per indurre l'analgesia è caratterizzato dalla loro capacità di modificare il flusso ionico a livello sia presinaptico che post-sinaptico in modo da bloccare l'ipereccitazione neuronale e conseguentemente ridurre la trasmissione degli impulsi dolorifici (Figura 22). Per quanto riguarda le terminazioni presinaptiche nocicettive, gli oppiacei quando legano i MOR, DOR e KOR espressi a questo livello, determinano la chiusura dei canali del calcio voltaggio dipendenti, riducendo così il rilascio del principale neurotrasmettitore eccitatorio coinvolto nella trasmissione nel dolore: il glutammato. Questo fenomeno è dovuto al fatto che i recettori degli oppioidi una volta attivati, essendo accoppiati negativamente tramite la proteina Gi ai canali del calcio voltaggio dipendenti, riducono afflusso di calcio a livello neuronale, comportando l'inibizione del rilascio di glutammato a livello sinaptico che si traduce con una riduzione della eccitabilità neuronale diretta a livello centrale. Inoltre, i recettori MOR, DOR E KOR sono accoppiati negativamente tramite proteina Gi anche all'enzima adenilato ciclastasi determinando varie modifiche sulla via di trasduzione mediata da questo importante effettore, le quali in ultima battuta provocano l'inattivazione sia dei canali del calcio sia del sodio voltaggio dipendenti.

A livello post-sinaptico invece, l'attivazione dei recettori MOR, accoppiati positivamente tramite la proteina Gs stimolatoria ai canali del potassio voltaggio dipendenti, aumenta la conduttanza al potassio e provoca iperpolarizzazione della membrana neuronale; questo genera potenziali inibitori post-sinaptici in grado di contrastare l'eccitabilità neuronale e ridurre gli impulsi dolorifici (Figura 28).

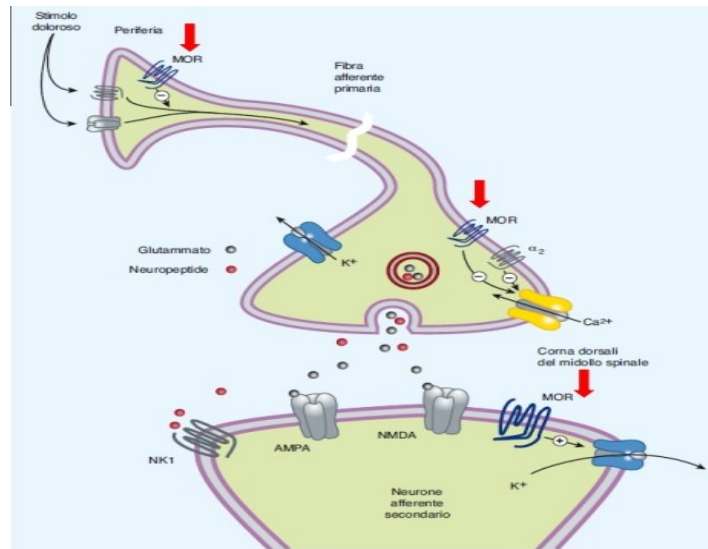


Figura 28 Attivazione dei recettori per gli oppioidi espressi a livello pre e postsinaptico e le rispettive modifiche dei flussi ionici di potassio e calcio.

Un altro meccanismo analgesico prevede il rilascio di NA (noradrenalina) e 5-HT (serotonina) con conseguente potenziamento dell'inibizione della trasmissione dolorifica proprio grazie alla stimolazione dei recettori degli oppioidi espressi a livello di vie queste vie neurotrasmettitoriali, implicate nella modulazione in senso inibitorio della via ascendente del dolore.

4.2 Principali impieghi degli alcaloidi più importanti

Gli oppioidi rispondono meglio al dolore nocicettivo mentre hanno scarsa efficacia sul dolore persistente causato da una lesione o patologia a carico del SNC o SNP definito come dolore cronico neuropatico. La morfina rappresenta l'oppiaceo di riferimento per il trattamento del dolore di grave intensità ed è tradizionalmente impiegato come analgesico nel trattamento del dolore severo, ad esempio, in caso di dolore oncologico, nei malati terminali e nel dolore post-traumatico e post-operatorio.

Altro alcaloide morfino molto utilizzato in terapia sia come antitussivo sia come blando analgesico è la codeina; essa è in grado di inibire il riflesso della tosse a livello centrale e tale azione si esplica a dosi nettamente inferiori rispetto a quelle usate per indurre analgesia. La codeina induce una scarsa attività analgesica ed è quindi impiegato nel dolore da lieve a media entità. La sua azione analgesica, minore rispetto a quella della morfina, è dovuta dal fatto che una volta somministrata, circa il 10% subisce una de-metilazione da parte dell'enzima CYP2D6, portando alla formazione di morfina. L'effetto analgesico, quindi, è legato alla sua metabolizzazione, poiché la codeina in quanto tale, ha bassissima affinità per i recettori μ degli

oppioidi. Spesso per potenziare e prolungare l'azione analgesica è utilizzata in associazione con altri farmaci come il paracetamolo o alcuni antidolorifici. La tebaina, a differenza degli altri due alcaloidi morfiniti, è priva di attività analgesica e narcotica stupefacente. Essa non è utilizzata in clinica per scopi terapeutici, ma rappresenta il punto di partenza per la produzione di derivati semisintetici ad azione analgesica come, ad esempio, ossicodone e la buprenorfina.

La noscapina e la papaverina, non presentano attività analgesica o narcotica. La noscapina fu un tempo impiegata come sedativo della tosse, ma a causa delle possibili proprietà teratogene l'utilizzo a questo scopo venne abbandonata. Attualmente sono condotti studi riguardo una possibile attività antitumorale: sembrerebbe infatti che la molecola causi apoptosi tramite un'azione sulla tubulina (Schiff, P. L. 2002).

La papaverina è impiegata ancora oggi per contrastare coliche biliari, o spasmi del tratto gastro-intestinale e urinario grazie all'azione rilassante sulla muscolatura liscia. Importante è anche la sua azione vasodilatatoria che ne permette il suo impiego durante interventi di microchirurgia (come, ad esempio, l'angioplastica con palloncino) e in casi di ischemiche cerebrali - periferiche in modo di aumentare il flusso sanguigno bloccato o ridotto da condizioni trombo-emboliche o aterosclerotiche. Un tempo questo alcaloide fu usato sottoforma di gel topico nelle disfunzioni erettile per determinare il rilassamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi e la vasodilatazione dei vasi che irrorano questi ultimi (Mishra, B. K. Et al., 2013).

4.3 Principali effetti collaterali degli oppiacei

L'utilizzo degli oppiacei presenta tuttavia degli effetti collaterali di entità variabile che si verificano sia a livello centrale che periferico. Tra gli effetti periferici, comune e poco tollerata, è la stipsi generata dal legame degli oppiacei con i recettori MOR a livello gastro-intestinale. Questo effetto collaterale è particolarmente grave e rappresenta un forte limite nella aderenza alla terapia. Inoltre, le vie biliari sotto azione degli oppiacei sono sottoposte a contrazione e per questo motivo, in caso di coliche biliari, l'uso di oppiacei è fortemente controindicato. La ritenzione urinaria e la difficoltà nella minzione è in parte dovuta ad un maggior rilascio ipofisario dell'ormone antidiuretico (ADH), ma anche dall'attivazione dei recettori diffusi a livello periferico che provoca la contrazione del tono uretrale.

Gli oppiacei a livello periferico sono in grado di determinare il rilascio di istamina da parte dei mastociti, provocando non solo prurito a livello cutaneo, ma anche ipotensione ortostatica per

l'azione vasodilatatoria dell'ammina biogena ed anche da una loro azione deprimente sui centri vasomotori a livello centrale.

Tra le azioni a livello centrale la depressione respiratoria, generata attraverso l'inibizione del centro del respiro a livello del tronco cerebrale, era molto temuta un tempo, ma viene ormai ritenuta clinicamente non significativa in quanto si verifica solo se somministrati a dosi eccessive. L'effetto miotico a livello oculare che viene comunemente detto "pupilla a punta di spillo" è molto marcato durante l'utilizzo di oppiacei, tant'è che le forze dell'ordine spesso utilizzano tale fenomeno per riconoscere se un soggetto è sotto effetto di oppiacei ad uso illecito, in primis l'eroina. Comuni sono la nausea ed il vomito indotti dalla stimolazione dei recettori per gli oppioidi espressi a livello del CTZ (Chemoceptor Trigger Zone).

La presenza di numerosi recettori degli oppioidi a livello di molte aree del sistema limbico determina effetti indesiderati importanti come, ad esempio, l'alterazione del tono dell'umore in senso euforico e disforico, sedazione, disturbi del sonno, deficit cognitivi e dipendenza psicofisica. Quest'ultima condizione, in cui i pazienti in terapia con oppiacei sentono astinenza, sembrerebbe essere causata dalla loro interferenza nelle vie mesolimbiche dette anche "vie del piacere" in quanto implicate nella generazione di meccanismi di gratificazione e di ricompensa che riguardano complessi sistemi neurochimici in cui il principale è quello dopaminergico.

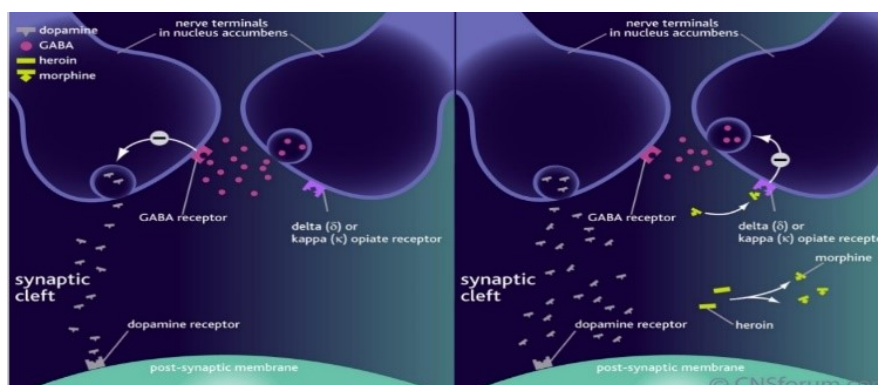


Figura 29 Inibizione effettuata dal neurotrasmettitore GABA sul rilascio di DA; viene inoltre mostrata anche l'inibizione del rilascio di GABA ad opera dell'attivazione dei recettori per gli oppioidi e conseguente maggior rilascio di DA.

Infatti, nelle aree mesolimbiche si verifica un maggior rilascio di DA (dopamina) che permane più a lungo generando un effetto gratificante di piacere determinando così la dipendenza. La possibile spiegazione di questo potenziamento dopaminergico è l'inibizione dei sistemi gabaergici causata dagli oppiacei. Infatti, a livello di tali neuroni sono espressi i recettori per gli oppioidi che una volta attivati causano una riduzione della loro eccitabilità inibendo il

rilascio di GABA (acido gamma-aminobutirrico), il neurotrasmettitore inibitorio principale. Quest'ultimo quindi non potrà a sua volta inibire il rilascio di DA in aree mesolimbiche (Figura 29). La tolleranza è un altro effetto indesiderato che si riscontra con l'uso di oppiacei, si tratta della situazione in cui l'effetto farmacologico di una sostanza scompare o diminuisce divenendo meno efficace o totalmente inefficace.

Bisogna ricordare che il potere di dipendenza e tolleranza generato dalla codeina non dev'essere sottovalutato in quanto gravi sintomi di astinenza, come sbalzi d'umore mal di testa e dolori muscolari, si possono verificare una volta interrotta l'assunzione di tale medicinale provocando l'uso continuato a dosaggi più alti¹¹.

Tra gli effetti neuroendocrini causati dall'uso di oppiacei si ha il blocco di numerosi assi ormonali: come quello definito ipotalamo-ipofisi-gonadi causando irregolarità del ciclo mestruale, impotenza e calo della libido, ma anche il blocco dell'asse definito ipotalamo-ipofisi-surrene che provoca una minor risposta allo stress a causa di una riduzione di cortisolo.

Tutti questi effetti collaterali rappresentando un limite nell'efficacia clinica in particolare nella terapia del dolore durante la quale non è possibile incrementare il dosaggio (Figura 30).

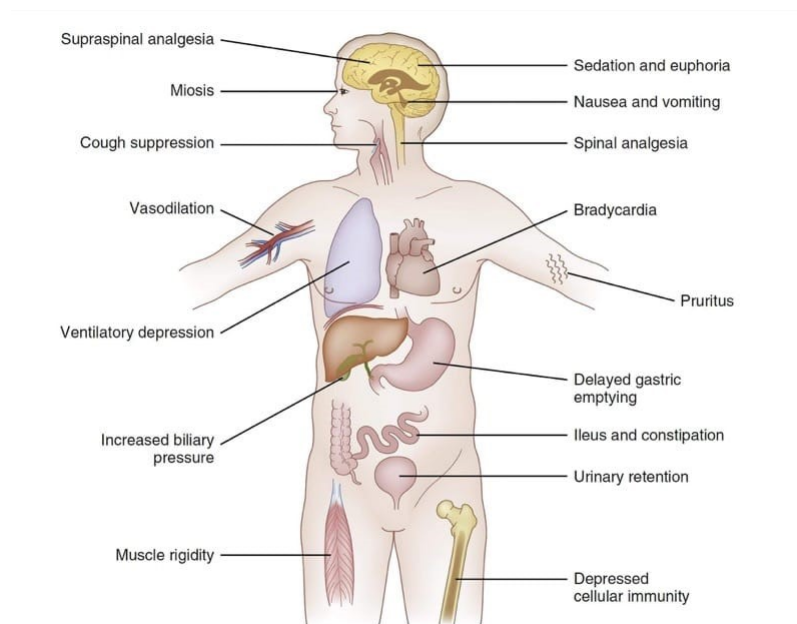


Figura 30 principali effetti biologici centrali e periferici degli oppiacei e oppioidi.

¹¹ <https://www.tga.gov.au/codeine-information-hub-codeine-use-can-be-harmful>

5. USI ILLECITI DEGLI OPPIACEI

5.1 Produzione illecita di eroina

Il derivato semisintetico più famoso della morfina è l'eroina o nominata anche 3,6- diacetilmorfina in quanto è ottenuta acetilando i due gruppi ossidrilici in posizione 3 e 6 della morfina. L'acetilazione impartisce una maggiore lipofilia alla molecola, determinando un facile attraversamento della barriera ematoencefalica rispetto alla morfina. L'effetto analgesico e stupefacente dell'eroina deriva da due metaboliti, infatti una volta giunta a livello cerebrale l'eroina subisce due reazioni sequenziali di de-acetilazione ottenendo rispettivamente prima la 6-monoacetilmorfina (6-MAM) ed infine la morfina (Figura 31).

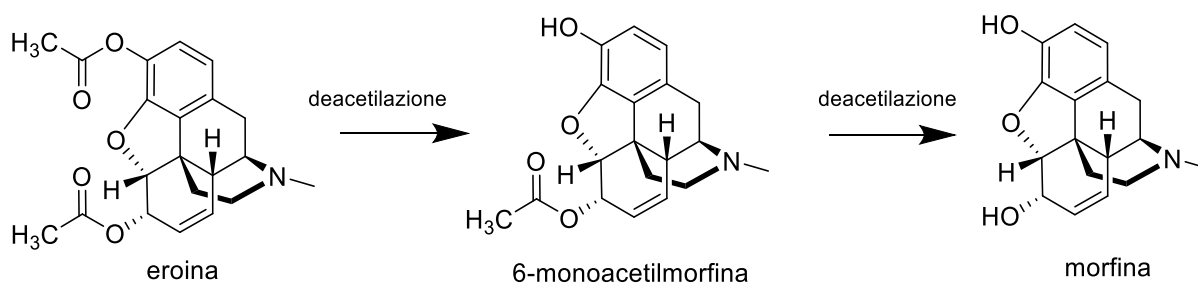


Figura 31 metabolizzazione in vivo dell'eroina in morfina ed i relativi metaboliti attivi.

L'eroina viene ottenuta in numerosi laboratori clandestini attraverso il “metodo della calce” descritto in modo sintetico da Baccini e colleghi¹² e prevede a partire dall'oppio l'ottenimento della morfina la quale poi verrà sottoposta ad acetilazione con anidride acetica.

Il primo passaggio prevede la macerazione dell'oppio in acqua calda e l'aggiunzione di idrossido di calcio, comunemente chiamato “calce” in modo da estrarre gli alcaloidi, tra cui morfina. All'acqua basica contenente morfina sarà aggiunto cloruro di ammonio che provocherà la formazione di un precipitato contenente un'alta percentuale di morfina base ed una piccola percentuale di altri alcaloidi e impurità. Si procede quindi alla sua estrazione con solventi organici per ottenere la sua purificazione ed infine procedere alla sua acetilazione con anidride acetica ottenendo eroina. Quest'ultima, come la morfina, è poco solubile in acqua, e per aumentare la sua solubilità viene combinata con degli acidi, formando dei sali molto solubili in

¹² <http://www.medicalsystems.it/>

acqua, come ad esempio il cloridrato di eroina, che si presenta come una polvere bianca, cristallina inodore e dal sapore amarognolo. La maggior parte di eroina prodotta clandestinamente è proviene dall'Afghanistan dove il mercato illegale è sotto il controllo dei talebani (Figura 32).

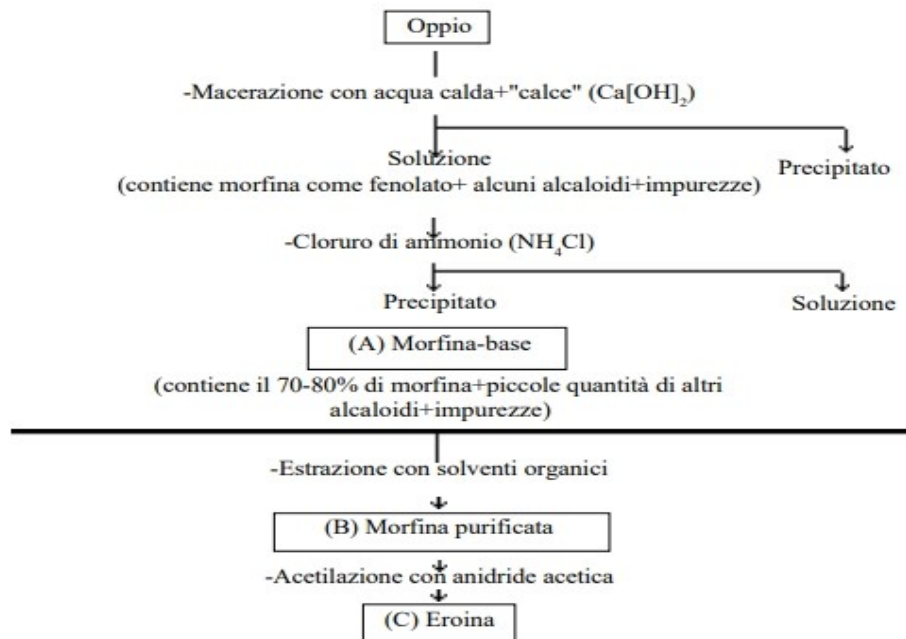


Figura 32 Schema semplificato del metodo della calce da cui si ottiene eroina illegale.

5.2 Una nuova droga d'abuso: la "purple drank"

A partire dagli anni 90, in particolare in Texas, si è diffusa come droga d'abuso una combinazione di codeina e Sprite nominata "purple drank" per il suo tipico colore violetto (Figura 33). Lo "sballo" ottenuto da questa "bibita ricreativa" illecita è ottenuto dalla conversione della codeina in morfina a livello cerebrale, dove legandosi ai recettori per gli oppioidi genera gli effetti tipici ricercati come euforia, sedazione e sonnolenza. Questi effetti sono ancora più significativi e pericolosi quando alla bibita si aggiungono ulteriori sostanze come l'alcol o alcuni antistaminici come la prometazina¹³.

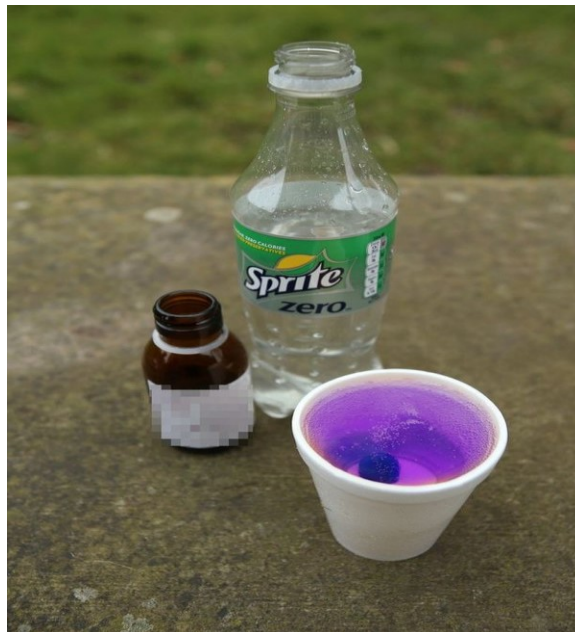


Figura 33 La nuova bibita a base di codeina chiamata "purple drank"

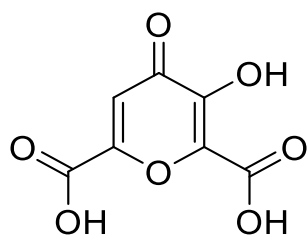
¹³ <https://www.therecoveryvillage.com/codeine-addiction/codeine-and-sprite/>

6. SCREENING FITOCHIMICO DELL'OPPIO

Gli screening fitochimici sono tecniche e procedimenti utilizzati per eseguire analisi di controllo qualità (in questo caso si conosce l'identità della droga e l'analisi è volto solo ad una conferma) o in campo identificativo applicato a sostanze incognite. Generalmente si basano su reazioni di tipo colorimetrico che hanno lo scopo di identificare la presenza di una determinata classe di sostanze all'interno di una droga, mediante l'utilizzo di reagenti che provocano lo sviluppo di determinato colore. I saggi fitochimici sono eseguiti con semplici apparecchiature generalmente sottoforma di kit pronti all'uso in cui sono forniti già tutti i reattivi da utilizzare; sono in grado di fornire rapidamente la risposta in un tempo di minuto, ad un massimo di qualche ora. Inoltre, grazie alla loro elevata sensibilità sono in grado di identificare anche composti presenti in tracce. La loro caratteristica più importante è la selettività poiché devono essere in grado di rilevare specifici composti. Tuttavia, tale caratteristica non sempre è possibile a causa della possibile presenza di interferenti all'interno della droga dando così falsi positivi o falsi negativi.

6.1 Screening fitochimico dell'oppio

Lo screening fitochimico dell'oppio, non si basa sulla ricerca dei suoi tipici alcaloidi ma di un altro metabolita secondario: l'acido meconico sempre presente nell'oppio ad una concentrazione del 3-5% e considerato un "marcatore chemiotassonomico" in quanto non solo è presente nel lattice essiccato del *Papaver somniferum*, ma anche in tutte le altre specie appartenenti al genere *Papaver*, considerate non stupefacenti. La sua identificazione, quindi, permette di comprendere se il vegetale sottoposto allo screening appartiene al grande genere tassonomico *Papaver* senza però fornire informazioni riguardo specie d'appartenenza. Per tale ragione l'applicazione più comune è quella del controllo qualità piuttosto all'ambito forense e legale.



acido meconico

Il procedimento prevede la dissoluzione di una piccola quantità di panetto di oppio in una soluzione acquosa di ferro tricloruro al 10%, se si tratta di oppio la colorazione della soluzione apparirà di colore rosso dato dalla reazione di complessazione tra ferro tricloruro e l'acido meconico. Quest'ultimo, infatti, grazie alla presenza nella sua struttura chimica di un gruppo ossidrilico ed un gruppo carbossilico, riesce a complessare un atomo di ferro proveniente dal cloruro ferrico, sviluppando la formazione di una sostanza colorata. Molte altre sostanze che non siano acido meconico potrebbero fornire questa colorazione alla soluzione, quindi per escludere un falso positivo, successivamente si procede con l'aggiunta di acido cloridrico. Aggiungendo acido, la colorazione deve rimanere invariata, in caso contrario ovvero se la colorazione rossa svanisse si escluderebbe che il materiale analizzato sia oppio.

6.2 Test presuntivo degli oppiacei: il saggio di Marquis

Il saggio di Marquis è il principale saggio colorimetrico utilizzato in ambito forense su campioni incogniti per identificare alcune tra le principali sostanze di derivazione oppiacea, sia naturali che sintetiche, comunemente utilizzate come droghe ricreative ad uso illecito, prima tra tutte l'eroina ma anche morfina, codeina, destrometorfano, ossicodone, e fentanyl. Il test non è volto a testare se un individuo ha assunto oppiacei (i quali richiederebbe l'analisi di campioni biologici) ma semplicemente ha lo scopo di individuare delle presunte sostanze in un materiale organico, come pillole e polveri, le forme attraverso cui vengono assunte la maggior parte delle droghe d'abuso. Questo test, essendo fornito sottoforma di semplici e veloci kit, trova applicazione anche in ambiti diversi da quello del laboratorio ed infatti è adoperato dalle forze dell'ordine attive sul campo.

Il reagente di Marquis è composto da una soluzione che appare limpida e incolore, ottenuta miscelando 5 mL di formaldeide al 40% e 100 mL di acido solforico concentrato che è fatta gocciolare su una piccola quantità di sostanza incognita. Dopo l'aggiunta dell'acido, in pochissimi secondi avviene un cambiamento di colore che identifica di quale sostanza si tratti. E' bene ricordare che oltrepassati 60 secondi la colorazione che si sviluppa non è da tenere in considerazione in quanto l'umidità e l'ossigeno presenti nell'aria possono interferire¹⁴.

Le colorazioni che si possono sviluppare sono molteplici a seconda della sostanza. Le sostanze di derivazione oppiacea sviluppano generalmente una colorazione che vira dal porpora scuro al

¹⁴ <https://chimicamo.org/chimica-analitica/analisi-presuntive-delle-droghe/>

violaceo in pochi secondi (ad eccezione del destrometorfano e del ossicodone rispettivamente un colore grigio scuro e uno più chiaro). Alcuni esempi delle altre sostanze psicoattive reattive al test sono l'amfetamina e la metanamfetamina che sviluppano colorazioni dall'arancio al marrone in 5 secondi, alcuni derivati amfetaminici, come l'MDMA (3,4-metilenediossimetanfetamina) comunemente chiamata ecstasy, fornisce una colorazione che dal violaceo vira al nero entro 5 secondi. Anche alcune fenetilammine sono reattive al test come la 2C-B (4-bromo-2,5-dimetossifenetilammina), 2C-I (2,5-Dimetossi-4-iodofenetilammina) che sviluppando colorazioni dal giallo al verde, e la mescalina attraverso lo sviluppo di una colorazione arancione (Figura 34).

SUBSTANCE		Color Reactions		SUBSTANCE		Color Reactions	
		0 sec	30 - 60			0 sec	30 - 60
MDMA/MDA/MDE		[Color transition from purple to black]		OXYCODONE		[Color transition from light purple to grey]	
AMPHETAMINE		[Color transition from orange to brown]		DXM		[Color transition from grey to black]	
METHAMPHETAMINE		[Color transition from orange to brown]		2C-B		[Color transition from yellow to green]	
HEROIN		[Color transition from orange to purple]		2C-I		[Color transition from yellow to green]	
MORPHINE		[Color transition from orange to purple]		RITALIN		[Color transition from yellow to orange]	
CODEINE		[Color transition from orange to purple]		ASPIRIN		[Color transition from light pink to red]	
METHYLONE		[Color transition from yellow to orange]		SUGAR		[Color transition from light brown to dark brown]	
MESCALINE		[Color transition from orange to red]		No reaction: Cocaine, Ketamine, PMA, PMMA & others			

Figura 34 alcune delle sostanze e le loro tipiche colorazioni sviluppate dalla positività al test di Marquis.

La reazione che determina lo sviluppo della colorazione si basa sulla formazione di un dimero. Il reagente di Marquis catalizza una dimerizzazione che, a seconda di quali gruppi funzionali della molecola in questione, darà colorazione caratteristiche. La dimerizzazione avviene in seguito alla formazione di insaturazioni, le quali possono coinvolgere diversi atomi in base alla sostanza in esame. Il risultato sarà la formazione di un dimero che interagirà in modo diverso con la luce sviluppando delle colorazioni caratteristiche che identificano la specifica sostanza. Il meccanismo di reazione non è ancora del tutto noto, ma sembrerebbe sia dovuto a interazioni che avvengono tra l'anello benzenico nucleofilo, presente in tutte le molecole identificabili con questo saggio, ed il gruppo elettrofilo rappresentato dal carbonile della formaldeide.

La dimerizzazione della morfina provocata grazie al reagente di Marquis

La reazione tra il reagente di Marquis e due molecole di morfina avviene in vari step: il primo prevede l'attacco nucleofilo dell'anello benzenico della morfina da parte del gruppo carbonilico della formaldeide, la quale risulterà essere protonata essendo in ambiente acido. Successivamente, grazie alla perdita di una molecola d'acqua, si formerà un carbocatione benzilico primario: quest'ultimo subisce un attacco da parte dell'anello benzenico della seconda molecola di morfina portando alla formazione di un composto che contiene due anelli benzenici uniti tra loro da un ponte metilenico grazie alla perdita di un protone. L'ultimo step è caratterizzato dall'ossidazione dovuta alla presenza di acido solforico che porta alla formazione di un alcol secondario che, disidratando, genera un carbocatione benzilico secondario. Il dimero di morfina svilupperà colorazione violacea grazie alla delocalizzazione della carica positiva del carbocatione (Figura 35) (CHIMICAMO, 2017).

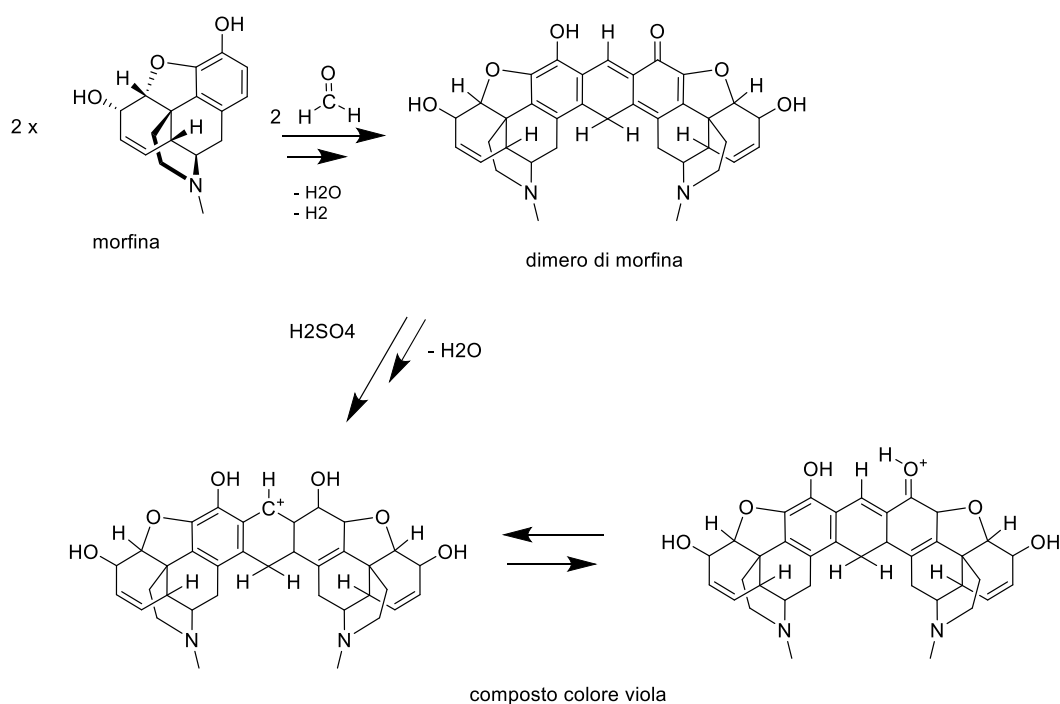


Figura 35 Dimerizzazione della morfina a seguito del' reagente di Marquis.

7. Conclusioni

Nonostante siano passati millenni dalla scoperta del *Papaver somniferum* e dal primo utilizzo dell'oppio, i suoi alcaloidi sono tutt'oggi di primaria importanza per gli utilizzi farmacologici che li vedono protagonisti. Al contempo l'oppio stesso continua a destare numerose problematiche dal punto di vista illecito difficilmente contenibili.

Tuttavia, il papavero da oppio rimane una pianta ancora oggi troppo importante ed insostituibile ed alla luce di questo, numerosi sforzi sono indirizzati a generare varietà di papavero da oppio che non biosintetizzino morfina come principale alcaloide in modo da limitare la sua estrazione illegale e conseguentemente la produzione di eroina.

8. Bibliografia

- Acevska, J., Dimitrovska, A., Stefkov, G., Brezovska, K., Karapandzova, M., & Kulevanova, S. (2012). Development and validation of a reversed-phase HPLC method for determination of alkaloids from *Papaver somniferum* L.(Papaveraceae). *Journal of AOAC International*, 95(2), 399-405.
- Baser, K. H. C., & Arslan, N. (2014). Opium poppy (*Papaver somniferum*). *Medicinal and aromatic plants of the middle-east*, 305-332.
- Beasley, T. H., Smith, D. W., Ziegler, H. W., & Charles, R. L. (1974). Liquid chromatographic system for separating opium alkaloids. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 57(1), 85-90.
- Bird, D. A., Franceschi, V. R., & Facchini, P. J. (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell*, 15(11), 2626-2635.
- Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: a review. *Asian journal of botany*, 1(1), 1-6.
- Brunton, L. L., Knollmann, B. C., & Hilal-Dandan, R. (Eds.). (2018). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (p. 1808). New York: McGraw Hill Medical.
- Butnariu, M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Pentea, M., Sarac, I., Küşümler, A. S., ... & Cho, W. C. (2022). Papaver plants: current insights on phytochemical and nutritional composition along with biotechnological applications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022(1), 2041769.
- Cappuccino, C. (2004). *Felicità chimica*. Stampa alternativa.
- M. Filho, A., Turner, M. C., Warnakulasuriya, S., Richardson, D. B., Hosseini, B., Kamangar, F., ... & Schubauer-Berigan, M. K. (2023). The carcinogenicity of opium consumption: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology*, 38(4), 373-389.
- Claudio Blengini M., & Chirurgo-Torino, E. P. M. *Morfina, breve storia di un farmaco*.
- Dittbrenner, A., Mock, H. P., Börner, A., & Lohwasser, U. (2012). Variability of alkaloid content in *Papaver somniferum* L. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 82(2), 103-107.
- Duarte, D. F. (2005). Uma breve história do ópio e dos opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 55, 135-146.
- Facchini, P. J., Hagel, J. M., Liscombe, D. K., Loukanina, N., MacLeod, B. P., Samanani, N., & Zulak, K. G. (2007). Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. *Phytochemistry Reviews*, 6, 97-124.
- Goerig, M., & am Esch, J. S. (1991). Friedrich Wilhelm Adam Sertürner-dem Entdecker des Morphins zum 150. Todestag. *AINS-Anästhesiologie· Intensivmedizin· Notfallmedizin· Schmerztherapie*, 26(08), 492-498.

- Labanca, F., Ovesna, J., & Milella, L. (2018). *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways. *Phytochemistry reviews*, 17, 853-871.
- Lueck, A. E. S. (2014). *Extraction and Purification of Morphine from Opium Poppies*.
- Lugoboni, F., Zamboni, L., & Rossi-Azienda, P. G. *Analgesici oppioidi*.
- Millgate, A. G., Pogson, B. J., Wilson, I. W., Kutchan, T. M., Zenk, M. H., Gerlach, W. L., ... & Larkin, P. J. (2004). Morphine-pathway block in top1 poppies. *Nature*, 431(7007), 413-414.
- Mishra, B. K., Rastogi, A., Siddiqui, A., Srivastava, M., Verma, N., Pandey, R., ... & Shukla, S. (2013). Opium poppy: genetic upgradation through intervention of plant breeding techniques. *Plant breeding from laboratories to fields*, 22, 209-38.
- Ngernsaengsaruaay, C., Leksungnoen, N., Chanton, P., Andriyas, T., Thaweekun, P., Rueansri, S., ... & Hauyluek, W. (2023). Morphology, taxonomy, anatomy, and palynology of the opium poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivation in Northern Thailand. *Plants*, 12(11), 2105.
- O'Connor, S. E. (2010). 1.25—Alkaloids. *Comprehensive natural products II*, 1, 977-1007.
- Onoyovwe, A., Hagel, J. M., Chen, X., Khan, M. F., Schriemer, D. C., & Facchini, P. J. (2013). Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *The Plant Cell*, 25(10), 4110-4122.
- Ozber, N., & Facchini, P. J. (2022). Phloem-specific localization of benzyloisoquinoline alkaloid metabolism in opium poppy. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153641.
- Schiff, P. L. (2002). Opium and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 66(2), 188-196.
- Stranska, I., Skalicky, M., Novak, J., Matyasova, E., & Hejnak, V. (2013). Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids. *Industrial Crops and Products*, 41, 120-126.
- Szucs, Z., Szabady, B., Szatmáry, M., Cimpan, G., & Nyiredy, S. (2002). High-throughput analytical strategy with combined planar and column liquid chromatography for improvement of the poppy (*Papaver somniferum* L.) with a high alkaloid content. *Chromatographia*, 56, S49-S54.
- Vadhel, A., Bashir, S., Mir, A. H., Girdhar, M., Kumar, D., Kumar, A. & Mohan, A. (2023). Opium alkaloids, biosynthesis, pharmacology and association with cancer occurrence. *Open Biology*, 13(5), 220355.
- Wijekoon, C. P., & Facchini, P. J. (2012). Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. *The Plant Journal*, 69(6), 1052-1063.
- Ziegler, J., Facchini, P. J., Geißler, R., Schmidt, J., Ammer, C., Kramell, R., ... & Brandt, W. (2009). Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1696-1707.

Ringraziamenti

Giunta alla fine di questo lungo percorso di studi, non mi resta che ringraziare tutte le persone che ne hanno fatto parte.

Un ringraziamento speciale alla mia relatrice, Prof.ssa Federica Pollastro ed al correlatore Dott. Salomone Stefano per avermi guidato con professionalità e pazienza nella stesura della tesi trasmettendomi la loro passione per il mondo della fitochimica. Grazie anche a tutti gli altri Professori dell'Università per i relativi insegnamenti di cui ne farò tesoro sempre.

Non basteranno mai i ringraziamenti verso i miei genitori e le mie sorelle. Il raggiungimento di questo traguardo è anche merito di tutto l'amore, la pazienza ed il sostegno che mi avete donato ogni singolo giorno dall'inizio di questo meraviglioso percorso.

Grazie per essere stati presenti nei momenti di felicità gioendo con me ad ogni esame superato. Grazie per essermi stati accanto durante i momenti difficili aver creduto in me nei momenti in cui io stessa avevo smesso di farlo. In particolare, grazie alla mia mamma che con tanta pazienza mi ha ascoltato durante la preparazione di numerosi esami, dandomi la grinta ma anche la giusta leggerezza per affrontarli nel migliore dei modi. Grazie al mio papà per avermi dato oltre che l'appoggio emotivo anche la possibilità di studiare grazie ai tuoi sacrifici, non l'ho mai dato per scontato e per questo te ne sarò grata per sempre. Grazie alle mie sorelline Alessandra ed Annalisa per tutte le volte che siete venute in cameretta a darmi numerosi consigli ed aver fatto il tifo per me sempre.

A tutti i miei famigliari, in particolare ai miei cari nonni, per i loro saggi consigli che mi hanno guidato. Ai miei angeli custodi, nonno Giò e nonna Maria, sono sicura che da lassù state festeggiando con me. In questo giorno vi sento presenti più che mai.

Grazie al mio fidanzato, Alessandro, per essermi stato a fianco con pazienza e dolcezza. Grazie per aver rispettato tutti quei momenti in cui ho dovuto dare priorità allo studio.

Alle mie amiche storiche ed a tutte le persone che ho incontrato proprio grazie al percorso universitario, diventando non solo compagni di studi ma anche amici fedeli con cui ho condiviso sorrisi e lacrime, in particolare alla mia coinquilina Benni per aver condiviso anni indimenticabili nel nostro appartamento in via S. Bernardino da Siena, ed a Maria Giovanna, insieme abbiamo creato un legame indissolubile. Ad un amico speciale Adil che dal primo anno accademico fino ad oggi è sempre stato presente. A Cosimo, Thea, Lucia, Bea, Virgi, e tanti altri amici ancora. Sono certa che, oltre questo traguardo, ci saranno molti altri da condividere insieme.

Infine, alla ragazza più sensibile che io conosca, che ha sempre avuto paura di non essere all'altezza, grazie per non aver mai mollato avendo costanza, pazienza, impegno e sacrificio, sognando questo traguardo per molto tempo. Eccoci qui, ce l'hai fatta, ma infondo io l'ho sempre saputo.