

VERDURA DIMENTICATA DA RIVALUTARE: IL CASO DEL SEDANO SELVATICO (*SMYRNIUM OLUSATRUM*)

Filippo Maggi, Eugenia Mazzara, Eleonora Spinozzi
Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino, Camerino

Introduzione

A causa della globalizzazione e dell'introduzione di nuove specie di ortaggi per uso alimentare, molte piante impiegate in passato in cucina hanno subito un significativo abbandono. Tra queste, spicca un membro della famiglia delle Apiaceae, *Smyrniium olusatrum* L., il sedano selvatico (Figura 1), dotato di notevole importanza storica e meritevole di studi e approfondimenti volti alla sua rivalutazione, non solo come verdura, ma anche come fonte di importanti sostanze bioattive.



Figura 1. Infiorescenze di *Smyrniium olusatrum* L.

La pianta si distribuisce nei Paesi mediterranei, nel nord Africa e anche nell'Europa settentrionale, fino a naturalizzarsi in Gran Bretagna, dove i Romani ne hanno introdotto la coltivazione.

È localizzato anche in quasi tutte le regioni italiane, soprattutto in quelle affacciate sul mare, prediligendo luoghi ombrosi e incolti, scarpate, suoli profondi e nitrofilo.

Smyrniium olusatrum è una pianta erbacea biennale alta fino a 1,5 m, che fiorisce una sola volta prima di completare il ciclo. È caratterizzata da una radice robusta, a fittone, aromatica. Il fusto è eretto con striature rossastre, cilindrico, cavo a maturità. Le foglie sono ternate, con segmenti ovato-rombici e margini crenulato-dentati.

Le infiorescenze sono ombrelle composte a 7-15 raggi, con fiori giallo-verdastri che compaiono tra marzo e aprile. I frutti compaiono a maggio e sono diachenio, dapprima verdi, poi nero lucenti a maturità con evidenti costolature.

Tra le proprietà medicinali dello *Smyrniium* vi sono quelle antiscorbutiche della radice, e poi aromatiche, stomachiche, diuretiche e lassative del succo della radice, antiasmatiche dei frutti e infine depurative del fusto.

Nonostante l'uso alimentare di questa pianta si sia ridotto a partire dal XVI secolo, tanti sono gli usi culinari delle sue parti: le foglie sono impiegate in insalate, i piccioli cotti al vapore, i boccioli fiorali per fare frittelle e sottaceti, i frutti in sostituzione del pepe e le radici consumate crude o al vapore.

Dall'intera pianta si ricava un Olio Essenziale (OE) ricco di furanosesquiterpeni. Il più importante di questi è l'isofuranodiene, il capostipite della classe dei 1,5-dieni (Hikino, 1968), che viene sfruttato nella medicina tradizionale cinese contro tumori e infiammazioni.

Tale molecola è presente anche nelle foglie di *Eugenia uniflora* L. (Amorim, 2009), che trova applicazioni in ambito cosmetico e nella cura di infiammazioni, dolori di stomaco e febbre; è contenuta anche nell'essudato resinoso della *Commiphora sphaerocarpa* Chiov. (Dekebo, 2002), e in molluschi e coralli (McPhail, 2001).

L'isofuranodiene e molecole affini, se sottoposti a riscaldamento, subiscono il riarrangiamento di Cope: a causa di questo riarrangiamento sigmatropico molecolare, l'isofuranodiene si converte nel suo isomero curzerene (Setzer, 2008). Per questo, la sua quantificazione negli OE può risultare complessa. Un altro componente dell'OE di *Smyrniium* è il germacrone, che subisce ad alte temperature lo stesso fenomeno, trasformandosi in β -elemenone.

Per quanto riguarda le proprietà farmacologiche, l'isofuranodiene ha mostrato attività epatoprotettiva, anti-infiammatoria e anti-tumorale (Lu, 2012; Zhong, 2012). A tal proposito, è capace di indurre apoptosi e inibire la proliferazione di diverse linee cellulari tumorali, con un'efficacia simile a quella della ciclofosfamida. Ha anche azione inibitoria dell'angiogenesi e inoltre non causa effetti citotossici su linee non tumorali dell'epitelio del seno e del fegato.

I metaboliti di fase I in cui è convertito l'isofuranodiene dopo somministrazione orale, rinvenuti in urine e bile, sono lattoni sesquiterpenici come aeruginolattoni, glechomanolidi ed eudesmanolidi, che hanno funzione difensiva nelle piante e sono riportati come *marker* tassonomici del genere *Smyrniium* (Chen, 2013; Wu, 2008).

Altri furanosesquiterpeni derivati dell'isofuranodiene sono furanoeremofil-1-one e 1 β -acetossifuranoeudesm-4(15)-ene (Mölleken, 1998).

Risultati e discussione

Il nostro studio è stato incentrato in primo luogo sull'ottenimento dell'OE di *Smyrniium olusatrum* da radici, foglie, fiori e frutti, che sono stati soggetti a idrodistillazione per 6 ore. Le foglie basali e i fiori sono risultati più ricchi di acqua (più dell'80%), seguiti dalle radici e infine dai frutti (circa il 14%).

Le più elevate rese di OE sono state ottenute dai fiori (1,8%) e dalle radici (1,0%), mentre per i frutti le rese sono risultate più ridotte. Per l'identificazione e la quantificazione dei componenti dell'OE, è stata impiegata la Gas Cromatografia accoppiata a Spettrometria di Massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) e la Gas Cromatografia con Rivelatore a Ionizzazione di Fiamma (*Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*, GC-FID), rispettivamente, utilizzando una colonna capillare apolare HP-5 in entrambi i casi.

L'isofuranodiene è stato ottenuto per cristallizzazione dell'olio, mentre il curzerene mediante riflusso con glicole etilenico per 30 min sotto azoto (Baldovini, 2001). Altri costituenti dell'OE dei frutti sono stati isolati mediante cromatografia su colonna, impiegando cicloesano e cicloesano-etilacetato in diverse proporzioni.

Per cromatografia su colonna dell'OE di radici, invece, è stato ricavato furanoeremofil-1-one, mentre dall'OE dei fiori il germacrone. La struttura di tutti questi componenti è stata confermata mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Negli OE ottenuti dalle radici, l'analisi gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) ha evidenziato come componenti principali, tra i furanosesquiterpeni, isofuranodiene, curzerene e furanoeremofil-1-one, e soprattutto β -fellandrene e δ -3-carene tra i monoterpeni.

L'analisi GC-FID ha confermato la predominanza di furanosesquiterpeni, rappresentati principalmente da curzerene e isofuranodiene. Dallo *score plot* effettuato su *S. olusatrum* sono emersi diversi chemotipi. In particolare, le foglie sono risultate particolarmente ricche di furanoeremofilone, mentre i frutti hanno mostrato come *marker* principale l'1- β -acetossifurano-4-15-eudesmene.

I fiori sono risultati più ricchi di isofuranodiene e in misura minore di germacrone e le radici hanno invece mostrato una situazione intermedia, essendo caratterizzate sia da furanodiene che da furanoeremofilone.

Al fine di mettere in luce gli effettivi livelli di isofuranodiene, curzerene e germacrone negli OE di *S. olusatrum*, nel presente studio si è optato per un approccio analitico non termodistruttivo, sviluppando un metodo quantitativo in cromatografia liquida – rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (*High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection*, HPLC-DAD). Dall'analisi dell'OE ottenuto dai fiori, l'isofuranodiene è risultato uno dei componenti maggioritari (48%), seguito da germacrone (12,7%) e curzerene (8%) (Figura 2).

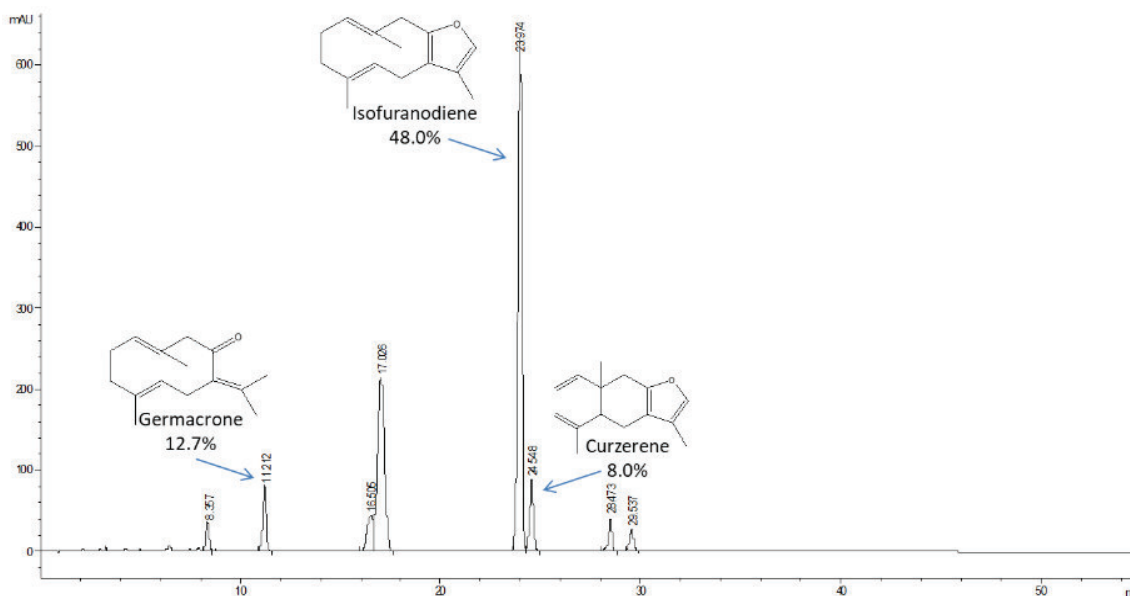


Figura 2. Analisi in HPLC-DAD dell'olio essenziale ottenuto dai fiori di *Smyrniololusatrum*

Al fine di dimostrare che il curzerene presente nell'OE fosse un prodotto derivante da degradazione termica, lo stesso metodo HPLC è stato applicato a estratti ottenuti in seguito a estrazione a temperatura ambiente. Dall'analisi sono emerse la presenza di tale composto in sole tracce nelle radici, e la sua totale assenza nei frutti. Tali risultati hanno avvalorato l'ipotesi della formazione del curzerene durante il processo di idrodistillazione. Dall'analisi di 45 OE ottenuti da *S. olusatrum*, l'isofuranodiene è risultato il componente principale, con elevate concentrazioni soprattutto nei fiori (dal 31 al 56%) e nelle radici (dal 23 al 47%). Il germacrone è risultato più abbondante nei fiori (dal 5 al 41%), risultando quasi totalmente assente nei frutti.

Per quanto concerne l'attività biologica dell'olio essenziale e delle principali molecole da esso isolate, è stato condotto il saggio colorimetrico MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) su 3 linee cellulari tumorali umane (glioblastoma, T98G; adenocarcinoma mammario, MDA-MB 231; carcinoma del colon, HCT116) al fine di determinare la loro citotossicità.

Questo test è basato sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) di essere metabolizzato dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, rappresentando così un indicatore della respirazione cellulare.

Tabella 1. Saggio MTT su tre linee cellulari umane

Composti	Linea cellulare (IC ₅₀ µg/mL*)		
	MDA-MB 231	T98G	HCT116
δ-3-Carene	59,94	53,71	47,26
Isofuranodiene	7,99	15,93	15,06
Curzerene	13,91	60,26	33,24
1β-Acetossifuranoeudesm-4(15)-ene	11,74	14,78	10,54
Furanoeremofil-1-one	20,03	27,50	16,57
Glechomafurano	92,97	176,05	101,48
Cisplatino (riferimento)	2,07	2,34	2,10

* Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) = è la concentrazione necessaria dei composti per inibire il 50% delle cellule in esame

Sebbene tutti gli OE testati abbiano mostrato una promettente attività, il campione più attivo è risultato l'OE ottenuto dalle foglie. Tra le molecole isolate, l'isofuranodiene è risultato particolarmente attivo sulle cellule di adenocarcinoma mammario con valori medi di IC₅₀ intorno a 7,99 µg/mL (36,9 µM), mentre il curzerene è risultato significativamente meno attivo su tutte le linee testate. Il componente più attivo su tutte le linee cellulari testate è risultato il 1β-acetossifuranoeudesm-4(15)-ene, con valori medi di IC₅₀ da 10 a 15 µg/mL (Tabella 1).

Dallo studio è inoltre emerso che sia l'OE che l'isofuranodiene inducono apoptosi nelle cellule trattate con dosi corrispondenti alla IC₅₀. La presenza di frammenti di *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) è stata confermata mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Conferma dell'apoptosi è stata anche fornita dal test dell'annexina V e dall'attivazione della caspasi-3, sia da parte dell'OE che dell'isofuranodiene. Quest'ultimo si è dimostrato inoltre in grado di diminuire la proliferazione di cellule MCF-7 in maniera dose-dipendente. L'attività antiossidante degli OE e delle molecole isolate è stata valutata mediante i saggi DPPH (test chimico nel quale si valuta il decadimento del radicale difenilpicrilidrazile, DPPH, in assenza o in presenza di sostanze antiossidanti) e ABTS utilizzando come sostanza di riferimento il Trolox.

Il 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS, è un composto chimico utilizzato per osservare la cinetica di reazione di enzimi specifici.

I campioni di OE provenienti dalle varie parti della pianta hanno mostrato attività riducente nei confronti del radicale DPPH, mentre alcuni di essi (foglie e radici) sono risultati più attivi verso il radicale ABTS con valori di IC₅₀ vicini a quelli del Trolox. L'attività maggiore è stata mostrata dall'OE ottenuto dalle foglie basali. Tra le molecole testate, il curzerene è stata quella con l'attività antiradicalica più spiccata, soprattutto nei confronti del radicale ABTS. L'attività antimicrobica degli OE di frutti e radici è stata valutata secondo il metodo della diffusione su agar su Gram-positivi (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* Rosenbach), Gram-negativi (*Escherichia coli* Migula e *Pseudomonas aeruginosa* Schröter) e un fungo (*Candida albicans* C.P. Robin Berkhout). I valori di inibizione sono risultati in tutti poco significativi. Per l'analisi della frazione polare della pianta, frutti, radici e foglie sono stati estratti mediante macerazione in

etanolo. L'estratto di foglie è stato purificato utilizzando la cromatografia su colonna di gel di silice utilizzando come eluente una soluzione satura di butanolo (1:20). Le frazioni di maggior interesse sono state nuovamente cromatografate utilizzando una diversa miscela di eluenti a polarità crescente e le sostanze purificate (saccarosio, acido clorogenico, isoquercetina e acido 3-indolacetico) sono state caratterizzate mediante spettroscopia NMR. Lo studio delle strutture secernenti di *S. olusatrum* ha evidenziato un'elevata uniformità nella distribuzione nei vari organi delle stesse, caratterizzate da dotti e viti (Figura 3).

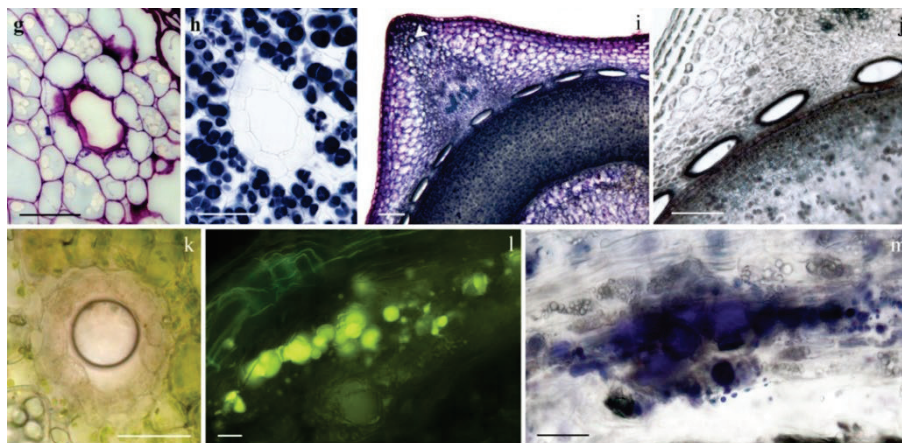


Figura 3. Strutture secretorie identificate in *S. olusatrum*

Il secreto contenuto in queste strutture si è inoltre rivelato ricco di terpeni, dimostrando che queste sono il sito principale di produzione dell'OE. Nel secreto di radici e fiori si è inoltre evidenziata la presenza di polifenoli, tannini e flavonoidi. L'analisi del contenuto di acido ascorbico in HPLC-MS ha evidenziato elevati livelli nei frutti (10,87 mg/kg), nelle foglie (8,54 mg/kg) e nei fiori (7,89 mg/kg). Per quanto riguarda l'analisi del contenuto di acidi grassi in GC-MS, si sono riscontrati elevati livelli di acido palmitico, acido linoleico e acido linolenico nelle radici, nei fiori e nelle foglie.

Conclusioni

In conclusione, l'analisi chimica ha mostrato che i farnosesquiterpeni possono essere considerati come *marker* tassonomici nel genere *Smyrniolobos*. L'analisi HPLC si è inoltre dimostrata un sistema conveniente e semplice a scopo quantitativo, mostrando come componente principale l'isofuranodiene. Vista l'attività antiossidante, ma anche citotossica su linee tumorali dell'OE di *S. olusatrum*, tale studio sottolinea l'importanza di questa pianta come vegetale edibile e come fonte di isofuranodiene, da essere poi sfruttato a livello farmaceutico.

Bibliografia

Amorim ACL, Lima CKF, Hovell AMC, Miranda ALP, Rezende CM. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine* 2009;16(10):923-8.

- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by ¹³C-NMR. *Phytochem Anal* 2001;12(1):58-63.
- Chen M, Lou Y, Wu Y, Meng Z, Li L, Yu L, Zeng S, Zhou H, Jiang H. Characterization of *in vivo* and *in vitro* metabolites of furanodiene in rats by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectra. *J Pharm Biomed Anal* 2013;86:161-8.
- Dekebo A, Dagne E, Sterner O. Furanosesquiterpenes from *Commiphora sphaerocarpa* and related adulterants of true myrrh. *Fitoterapia* 2002;73(1):48-55.
- Hikino H, Agatsuma K, Takemoto T. Furanodiene, a precursor of furan-containing sesquiterpenoids. *Tetrahedron Lett* 1968;9(8):931-3.
- Lu JJ, Dang YY, Huang M, Xu WS, Chen XP, Wang YT. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae*--a review. *J Ethnopharmacol* 2012;143(2):406-11.
- McPhail KL, Davies-Coleman MT, Starmer J. Sequestered chemistry of the Arminacean nudibranch *Leminda millecra* in Algoa Bay, South Africa. *J Nat Prod* 2001;64(9):1183-90.
- Mölleken U, Sinnwell V, Kubeczka KH. Essential oil composition of *Smyrniium olusatrum*. *Phytochemistry* 1998;49(6):1709-1714.
- Setzer WN. Ab initio analysis of the Cope rearrangement of germacrane sesquiterpenoids. *J Mol Model* 2008;14(5):335-42.
- Wu B, Chen J, Qu H, Cheng Y. Complex sesquiterpenoids with tyrosinase inhibitory activity from the leaves of *Chloranthus tianmushanensis*. *J Nat Prod* 2008;71(5):877-80.
- Zhong Z, Dang Y, Yuan X, Guo W, Li Y, Tan W, Cui J, Lu J, Zhang Q, Chen X, Wang Y. Furanodiene, a natural product, inhibits breast cancer growth both *in vitro* and *in vivo*. *Cell Physiol Biochem* 2012;30(3):778-90.