



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO
“CARLO BO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

Corso di Dottorato di ricerca in:
Scienze della vita, Salute e Biotecnologie
XXIX ciclo

**Sinergia fra composti fitochimici estratti
dalla bietola verde e rossa**

SSD: BIO/10

Relatore:

Chiar.mo Prof. Paolino Ninfali

Dottoranda:

Dott.ssa Alessandra Frati

INDICE

1.INTRODUZIONE	Pag.1
2.SCOPO DELLA TESI	Pag. 42
3. MATERIALI E METODI	Pag.44
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag.62
6. CONCLUSIONI	Pag.99
7.BIBLIOGRAFIA	Pag.104
8.SITOGRAFIA	Pag.122

Introduzione

I numerosi benefici largamente documentati di una dieta ricca di frutta e verdura, hanno portato ad un crescente interesse riguardo ai cosiddetti alimenti funzionali. Uno dei più importanti alimenti considerati di per se funzionali è la radice di *Beta vulgaris rubra*, comunemente nota come bietola rossa. Oggi, la bietola rossa è coltivata in molti paesi del mondo e viene regolarmente consumata come parte integrante di una corretta alimentazione. Inoltre è comunemente usata anche nella preparazione del colorante alimentare E162 [Esatbeyoglu *et al* 2015, Scotter M.J. 2011]. Il colore rosso e giallo si deve alle betalaine che sono pigmenti naturali, idrosolubili, contenenti azoto, sintetizzati a partire dall'aminoacido tirosina.

A seconda dei ligandi vengono suddivisi in due sottogruppi strutturali:

- Betacianine (pigmenti di colore rosso-viola);
- Betaxantine (pigmenti di colore giallo-arancio).

L'**acido betalamico** (Fig. 1a), è il cromoforo comune a tutti i pigmenti betalainici e la natura del residuo aggiunto ad esso ne determina la classificazione in betacianina o betaxantina (Fig. 1b e 1c, rispettivamente) [Strack *et al.*, 2003].

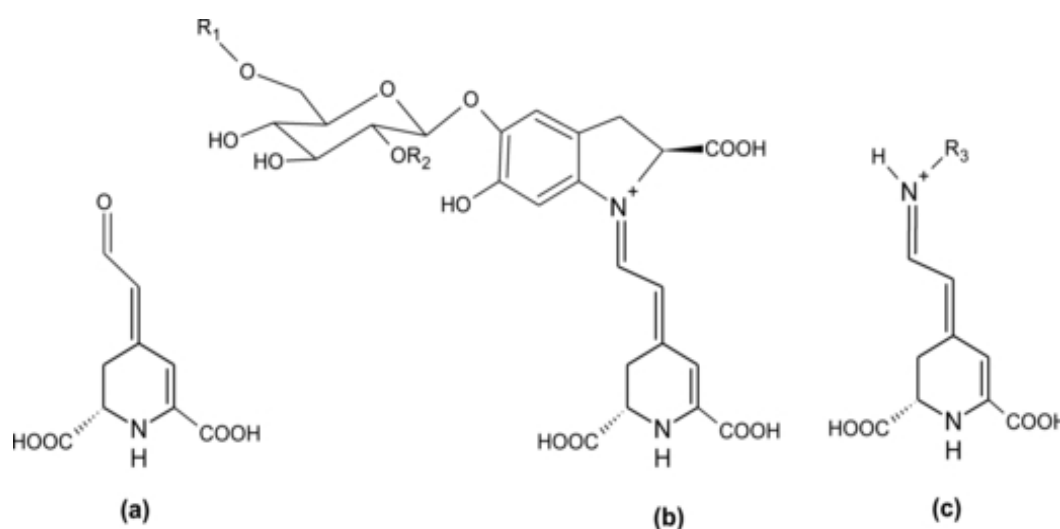


Figura 1. Strutture generali di acido betalamico (a), betacianina (b) e betaxantina (c). Betanina: R₁ = R₂ = H R₃ = ammina o gruppo amminoacidico [Strack *et al.*, 2003].

La **betacianina** contiene un residuo di ciclo-3,4-diidrossifenilalanina (ciclo-Dopa), una struttura ciclica chiusa che ne estende la risonanza elettronica sull'anello aromatico fenolico, spostando

l'assorbimento massimo del suddetto pigmento da 480 nm (assorbimento massimo delle betaxantine) a 540 nm [Jackman *et al* 1996; Strack *et al* 2003].

La betanidina è l'aglicone della maggior parte delle betacianine, le quali vengono formate grazie a diversi modelli di sostituzione, come glicosilazione e acilazione, di uno o entrambi i gruppi idrossilici situati nella posizione 5 o 6 della betanidina. La maggior parte delle betanine sono quindi 5-O-glucosidi, sebbene siano stati ritrovati anche 6-O-glucosidi, mentre non è nota nessuna betanina con entrambe le posizioni sostituite con i suddetti residui [Delgado-Vargas *et al.*, 2000]. Inoltre sono comuni anche glicosilazioni del 5-O-glucoside così come esterificazioni con acidi idrossicinnamici [Strack *et al.*, 2003].

La betacianina più comune è la betanidina-5-O-β-glucoside (betanina), il principale pigmento presente nelle barbabietole rosse (*Beta vulgaris rubra*) [Stintzing *et al*, 2004]. Le betacianine sono classificate in quattro gruppi [Strack *et al.*, 2003] (Figura 2): le betanine, le amarantine, le gomfrenine, le 2-decarbossilbetanine.

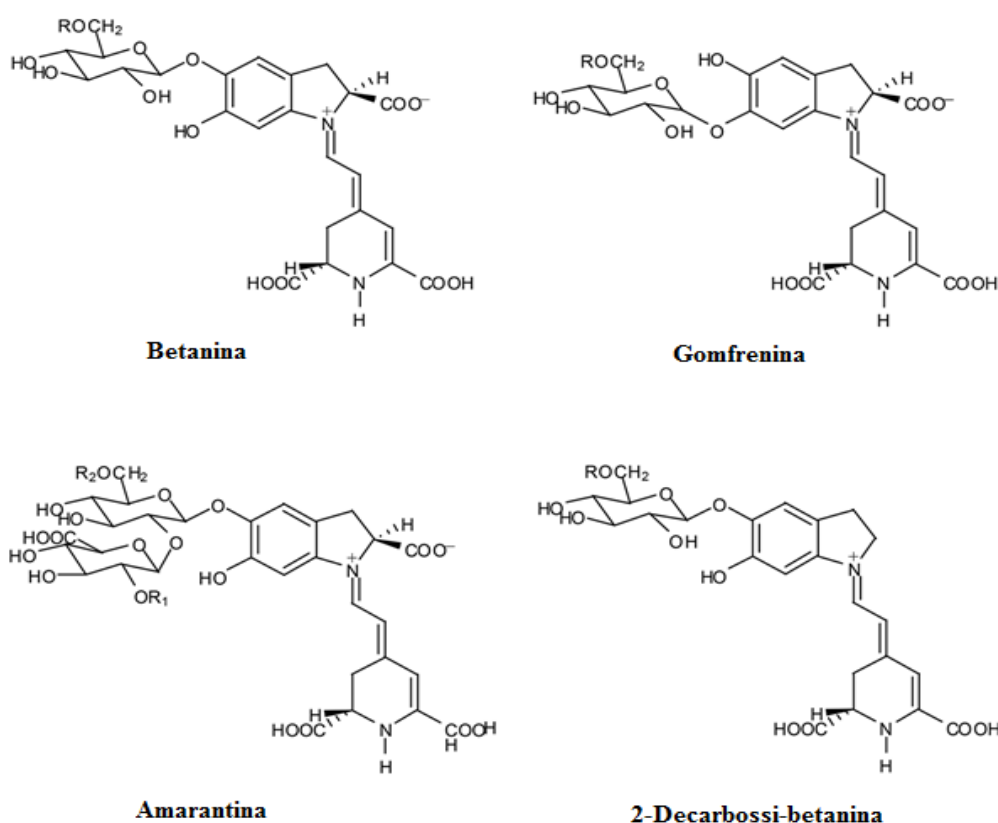


Figura 2. Struttura chimica dei quattro gruppi di betacianine: betanina, amarantina, gomfrenina, e 2-decarbossilbetanina [modificato da Esatbeyoglu *et al.*, 2015].

Le **betacianine** mostrano due picchi massimi di assorbimento, uno che ricade nell'UV (270-280 nm) a causa della presenza della ciclo-Dopa e il secondo che ricade nel range del visibile (535-540 nm). I colori rosso e viola derivano da diversi modelli di sostituzione delle betacianine: la glicosilazione della betanidina avviene generalmente con uno spostamento ipsocromico di circa 6 nm, mentre se viene aggiunta una seconda frazione di zucchero collegato alla prima, questa sembra non influenzare il colore; così avviene anche per sostituzioni di frazioni aciliche alifatiche che non alterano lo spettro. Da notare che l'acilazione con acidi idrossicinnamici risulta invece in un terzo picco di assorbimento (300-330 nm) [Stintzing *et al.*, 2004].

Le **betaxantine**, contengono diversi amminoacidi o catene amminoacidiche laterali coniugate con l'acido betalamico [Strack *et al.*, 2003]. Le modifiche strutturali nelle betaxantine producono cambiamenti batocromici e le ammine coniugate mostrano un assorbimento massimo inferiore rispetto alle controparti aminoacidiche [Stintzing *et al.*, 2002b]. Le principali betaxantine (Figura 3) sono rappresentate dalla vulgaxantina e l'indicaxantina [Castellanos-Santiago *et al.*, 2008].

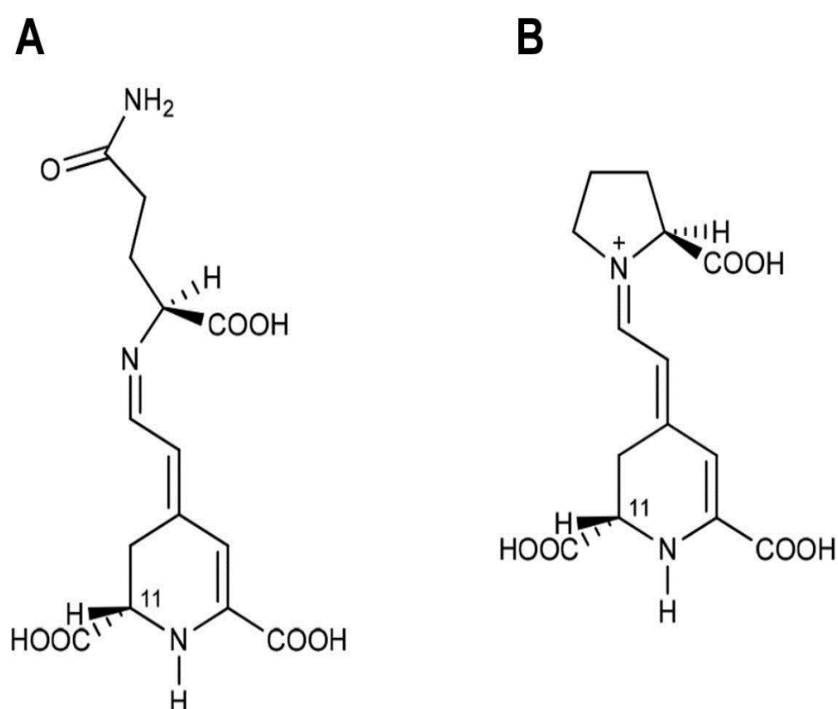


Figura 3. Possibili strutture delle betaxantine (A: vulgaxantina = glutammin-betaxantina, B: indicaxantina = prolin-betaxantina).

I processi biosintetici delle betalaine sono costituiti da diverse reazioni enzimatiche. Questi pigmenti sono sintetizzati nel citoplasma e poi immagazzinati in vacuoli presenti principalmente nei frutti, nei fiori e nei tessuti vegetativi delle piante, come nelle radici.

Strack *et al.* (2003) ed Han *et al.* (2009) hanno descritto in dettaglio lo schema biosintetico completo delle betalaine (Figura 4). Il punto di partenza è l'aminoacido tirosina (Tyr), sebbene anche la tiramina potrebbe essere un punto di partenza per la sintesi di alcune betalaine [Gandia-Herrero *et al.*, 2005].

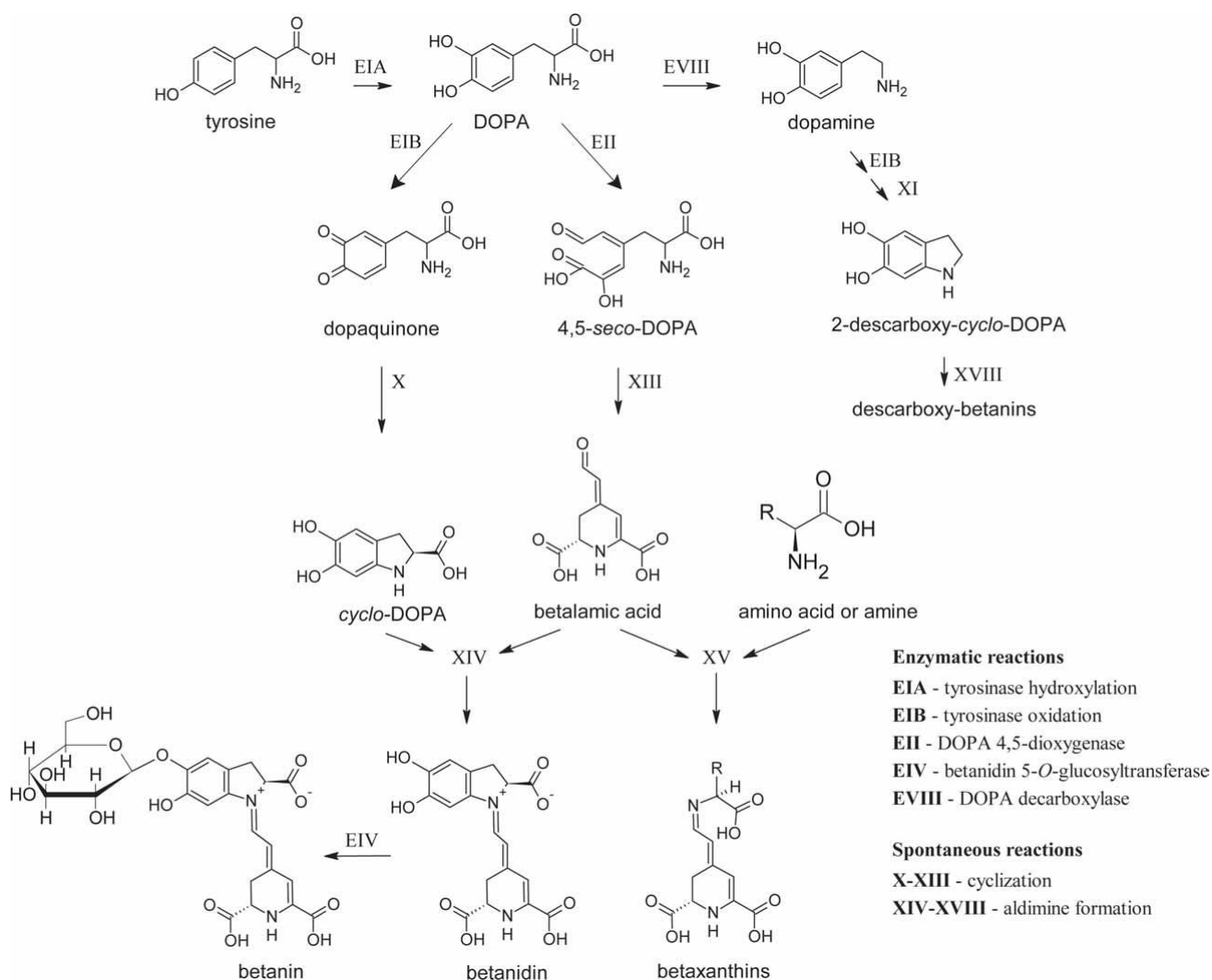


Figura 4. Via biosintetica di alcune betalaine [Pavokovi *et al* 2011].

Il percorso di sintesi inizia con una idrossilazione di Tyr sulla 3,4-diidrossi-L-fenilalanina, detta più semplicemente Levo Dopa (L-DOPA), grazie all'azione dell'enzima tirosinasi, che appartiene ad un gruppo di enzimi bifunzionali contenenti rame, coinvolti nella idrossilazione di fenoli a O-difenoli.

Successivamente, L-DOPA può essere convertita in tre modi: può essere ossidata dallo stesso enzima in DOPA-chinone, può essere scissa e aperta in 4,5-seco-DOPA in una reazione catalizzata da DOPA 4,5-diossigenasi (DOD), o può subire decarbossilazione a formare la dopamina, in una reazione catalizzata dalla DOPA decarbossilasi. Il dopachinone forma spontaneamente ciclo-DOPA, mentre la ciclizzazione spontanea di 4,5-seco-DOPA produce acido betalamico, un intermedio fondamentale nella formazione di tutte le betalaine e da cui si dipartono diversi percorsi di reazione. Una possibilità è che avvenga la condensazione spontanea di ciclo-DOPA con l'acido betalamico a formare la betanidina. La betanidina è glicosilata sul lato della DOPA grazie all'ausilio della betanidin-5-glucosiltransferasi, per formare betanina. In alternativa, ciclo-DOPA può essere glicosilata da ciclo-DOPA-5-glucosiltransferasi a formare ciclo-DOPA glucoside. Il prodotto di questa reazione può condensare con l'acido betalamico per formare betanine direttamente, senza passare attraverso l'intermedio betanidina. Successivamente, la condensazione spontanea dell'acido betalamico con un aminoacido o un'ammina, comporta la formazione di un legame aldiminico, generando betaxantine così come indicaxantine o vulgaxantine. Una combinazione dell'acido betalamico con 2-decarbossi-ciclo-DOPA comporta la formazione di 2-decarbossi-betanidina, una betacianina minore trovata nella barbabietola gialla. Se l'acido betalamico viene ricondensato con la tirosina, molecola di partenza del percorso, viene generata la tirosin-betaxantina (portulacaxantina II), composto ritrovato nella *Portulaca sp.* ed altre specie [Gandia-Herrero *et al.*, 2005].

La via biosintetica della betacianina di derivazione tiraminica invece è stata proposta da Kobayashi *et al.* (2001): le betacianine e betaxantine provenienti da questo percorso sono state identificate in alcune piante, come la *Beta vulgaris*. La molecola di tiramina è direttamente idrossilata a dopamina e poi ossidata in dopamina-chinone, a sua volta convertita in 2-decarbossi-ciclo-DOPA, che condensa ulteriormente con l'acido betalamico per formare 2-decarbossi-betanidin.

L'esistenza di un altro ramo della stessa via è stata proposta da Gandia-Herrero *et al.* (2005), processo in cui la tiramina può essere collegata immediatamente all'acido betalamico o idrossilata prima a dopamina in una reazione catalizzata da una tirosinasi idrolitica e poi coniugata all'acido betalamico.

Vegetali come fonte di approvvigionamento di betalaine

Nel regno vegetale sono note numerose fonti di betalaine (Tabella 1), le quali donano il loro tipico colore a fiori, frutti e radici di piante dell'ordine delle *Caryophyllales* (tranne le famiglie *Caryophyllaceae* e *Molluginaceae* produttrici di antocianine), in particolare le *Chenopodiaceae* e ad alcune varietà di funghi di *Basidiomycetes* (quali *Amanita muscaria* e *Hygrocybe conica*). Esse sono utili nell'attrarre gli insetti impollinatori verso fiori e frutti, nell'allontanare erbivori dalla pianta, proteggerla dal ghiaccio (nella *Crystallinum Mesembryanthemum L.*), dai danni da raggi UV, e fungono da osmoliti nella *Salicornia europaea L.* Negli ortaggi a radice come la barbabietola rossa possono aumentare la resistenza ai microrganismi patogeni ed aumentare la difesa virale [Esatbeyoglu *et al* 2015].

Le poche fonti commestibili conosciute di betalaine sono rappresentate nella Tabella 1 e sono la barbabietola rossa e gialla (*Beta vulgaris*), la bietola Svizzera a coste colorata (*Beta vulgaris Cicla*), le amarantacee da foglie o da grano (*Amaranthus ssp.*) e di frutti di cactus, del genere *Opuntia* (*Opuntia ficus Indica*) e *Hylocereus* [Azeredo, 2009].

Tabella 1. Principali specie vegetali producenti betalaine.

Famiglia	Specie	Nome comune
Chenopodiaceae	<i>B. vulgaris</i>	Barbabietola rossa
	<i>B. vulgaris</i> L. ssp. <i>cicla</i> [L.] Alef.	Bietola Svizzera
	<i>Chenopodium rubrum</i>	Farinello
Cactaceae	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Pytaia o Frutto del dragone
	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Fico d'India
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> sp.	Amaranto
Portulacaceae	<i>Portulaca grandiflora</i>	Erba Porcellana
Aizoaceae	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Pianta del ghiaccio
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i> sp.	Bougainvillea

Nella famiglia delle *chenopodiaceae* le maggiori specie contenenti betalaine sono:

- Bietola rossa (*Beta vulgaris rubra*);
- Bietola Svizzera;
- Bietola gialla (*Beta vulgaris Cicla*).

La coltura maggiormente sfruttata in commercio è quella della **barbabietola rossa** (*Beta vulgaris rubra*), dove il contenuto in betacianine e betaxantine varia rispettivamente entro gli intervalli di 0,04-0,21% e 0,02-0,14% a seconda delle cultivar [Von Elbe, 1975], sebbene alcune nuove varietà ne producano in quantità superiore [Gaertner *et al* 2005].

Gasztonyi *et al.* (2001) hanno analizzato cinque varietà di barbabietola rossa (Tabella 2-3) (“Bonel”, “Nero”, “Favorit”, “Rubin” e “Detroit”) in termini di composizione dei loro pigmenti ed in tutti i casi i principali pigmenti rosso-violacei erano betanine, isobetanine, betanidine e isobetanidine, esponendo concentrazioni di 0,06%-0,08%, mentre i principali componenti di colore giallo erano le betaxantine (vulgaxantina I e II). La varietà “Rubin” ha mostrato il rapporto betacianina/betaxantina più alto (2.08), venendo così considerata come la più adatta per la produzione di colorante naturale alimentare. Poiché lo spettro visibile delle betalaine delle barbabietole rosse è prevalentemente limitato a quello della betanina, la variabilità del colore risulta abbastanza scarsa. Inoltre si può avvertire un sapore ed un aroma terroso non molto gradevole a causa di **geosmina** (alcool biciclico prodotto da alcune specie di streptomiceti e micobatteri) e di alcune **pirazine** [Lu *et al* 2003; Stintzing *et al* 2004].

Tabella 2. Contenuto in g/kg^{-1} di betacianine nelle diverse varietà di barbabietola rossa [Gasztonyi *et al* 2001].

Varietà	Betanina	Isobetanina	Betanidina	Isobetanidina
Bonel	0.50	0.27	0.04	0.01
Nero	0.41	0.13	0.03	0.01
Favorit	0.49	0.24	0.05	0.02
Rubin	0.46	0.25	0.07	0.03
Detroit	0.44	0.21	0.05	0.01

Tabella 3. Contenuto in g/kg^{-1} di betaxantine nelle diverse varietà di barbabietola rossa [Gasztonyi *et al* 2001].

Varietà	Vulgaxantina I	Vulgaxantina II
Bonel	0.42	0.06
Nero	0.32	0.03
Favorit	0.41	0.03
Rubin	0.36	0.03
Detroit	0.37	0.04

La bietola rossa contiene in media circa 300-600 mg/kg di betanina [Kanner *et al* 2001], la cui concentrazione diminuisce dalla buccia alla polpa e può essere influenzata da diversi fattori tra cui le cultivar, le condizioni agronomiche e la temperatura di stoccaggio [Gasztonyi *et al.* 2001; Kujala *et al* 2002].

I tentativi per aumentare il contenuto di betanina nelle colture di barbabietola rossa, utilizzando l'aggiunta di nitrati al terreno (in forma di nitrato o solfato di ammonio), nonché l'applicazione di concime fogliare arricchito di Fe, B e K, hanno portato ad un aumento della concentrazione di betanine e anche un aumento nelle dimensioni anatomiche delle radici e delle foglie [El-Tantawy *et al* 2009]. Per questo motivo, la barbabietola rossa contiene elevate quantità di **nitrati** in concentrazioni paragonabili a quelle di insalata, ravanelli, rucola e spinaci [Pavokovic *et al* 2011] che possono formare nitrosammine cancerogene nel corpo umano quando ingerite; l'eliminazione di tali nitrati nei succhi di barbabietola rossa può essere condotta utilizzando scambiatori ionici o metodi microbiologici (utilizzando dei batteri modificati *Paracoccus denitrificans*, Gram-negativi), convertendo in questo modo gli ioni nitrato in azoto gassoso [Grajek *et al* 1997].

Il Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana e il Comitato di Esperti sugli Additivi Alimentari (JECFA) della Giunta FAO-WHO (Food and Agriculture Organization; World Health Organization) hanno dichiarato accettabile una dose giornaliera di nitrato pari a 3,7 mg/kg di peso corporeo al giorno, equivalente a 260 mg di nitrati al giorno per un adulto (circa 3,6 mmol/die) [<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/689>].

La bietola rossa può essere commercializzata precotta e sottovuoto, ma anche sotto forma di succo; le proprietà indesiderate della *Beta vulgaris* richiedono l'elaborazione del materiale, attraverso inattivazione termica e rimozione di ossigeno per impedirne il rapido imbrunimento (a causa delle attività polifenolo ossidasiche) e attraverso la fermentazione con i batteri per rimuovere l'elevata concentrazione di nitrati [Grajek *et al* 1997]; Le geosmine e le pirazine vengono rimosse durante la

concentrazione del succo, mentre eventuali microbi del suolo vengono eliminati attraverso pastorizzazione [Stintzing *et al* 2007].

La famiglia delle *Cactaceae* è quella più promettente per quanto riguarda il contenuto di betalaine. Tra queste, il **fico d'India** (genere *Opuntia*) e la **pitaya** (genere *Hylocereus* e *Selenicereus*) (Figura 5), sono comunemente le specie più coltivate per i loro frutti e le più adatte ad essere studiate come fonti di betalaine [Stintzing *et al* 2006].

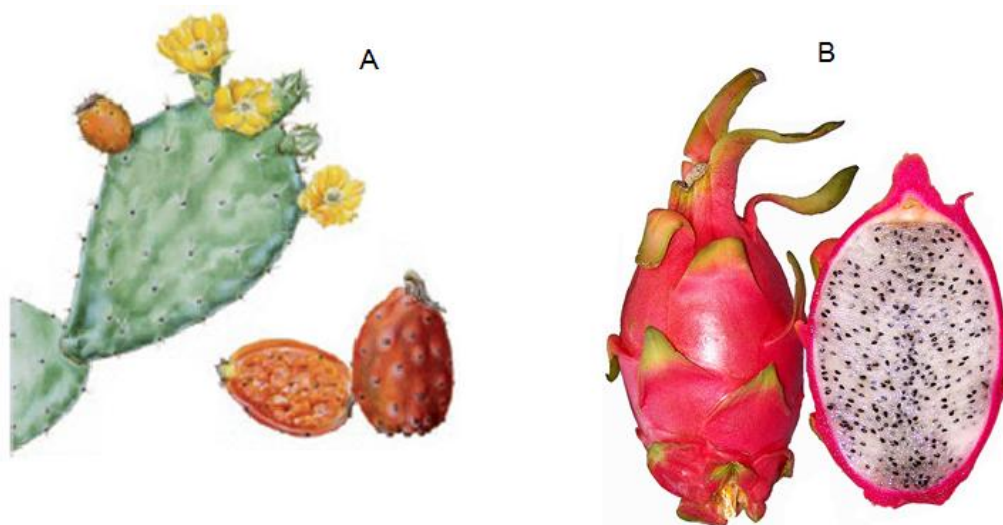


Figura 5. *Opuntia ficus indica* con relativo frutto (A). Frutto pitaya (B).

I frutti delle *Cactaceae*, a differenza della bietola, possono essere utilizzati nell'alimentazione umana senza impatti negativi sull'aroma e il sapore. Le betalaine nelle *Cactaceae* coprono uno spettro di colori molto ampio, che va dal giallo-arancio come per esempio nell'*Opuntia ficus Indica*, al rosso-viola nell'*Hylocereus sp.* I frutti cactacei gialli e arancioni rivestono particolare interesse a causa della scarsità di pigmenti idrosolubili gialli, di cui essi invece sono ricchi [Mosshammer *et al* 2005]. Inoltre, i bassi livelli di composti fenolici li rendono molto promettenti, in quanto non avvengono interazioni con le betalaine. [Stintzing *et al* 2001].

Un ulteriore vantaggio di questi frutti è quello di avere requisiti minimi di suolo e acque, e pertanto vengono considerati una coltura alternativa per l'economia agricola nelle regioni aride e semi-aride [Castellar *et al* 2006].

La polpa del frutto del cactus *Hylocereus* contiene elevate concentrazioni di betacianine (0,23-0,39%), sia acilate che non, ma al contrario delle barbabietole non contengono betaxantine in quantità rilevabili [Stintzing *et al* 2002a; Vaillant *et al* 2005].

I frutti dell'*Opuntia* ricoprono una vasta gamma di colorazione che si estende dal giallo chiaro al rosso-violetto, in funzione sia del rapporto betaxantine/betacianine che delle loro concentrazioni assolute [Stintzing *et al* 2005].

Nella famiglia delle *Amaranthaceae* sono stati identificati 16 tipi di betacianine e 3 tipi di betaxantine e sono stati studiati i genotipi per codificare pigmenti di qualità superiore. Tuttavia, l'*Amaranthus sp.*, pianta comunemente chiamata amaranto, contiene saponina e la *Celosia sp.* contiene alte concentrazioni di dopamina, limitandone l'accettazione globale per presenza di queste sostanze chimiche [Cai *et al* 2005].

In fine ci sono altri vegetali, meno importanti, contenenti betalaine, come la fragola Blite (*Blitum capitatum*), l'*Ullucus tuberosus*, le bacche di *Rivina humilis L.*, la *Mammillaria sp.*, la pianta di Willd (*Talinum triangulare*), e la *Celosia argentea* [Esatbeyoglu *et al* 2015].

Barbabietola rossa (Beta vulgaris rubra)

Dopo aver analizzato le varie piante che contengono betalaine, focalizziamo ora la nostra attenzione sul genere β TA che è stato oggetto del presente studio.

Tassonomia

La barbabietola è classificata tassonomicamente come *Dicotyledonae*, *Caryophyllidae*, *Chenopodiaceae* e *Beta*; sulla base dei caratteri morfologici, il genere *Beta* è suddiviso in due gruppi:

Barbabietole coltivate, di cui fanno parte la barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris saccharifera*), la barbabietola da foraggio (*Beta vulgaris crassa*), la barbabietole a foglia (*Beta vulgaris cicla*) e la barbabietola da giardino o da orto (*Beta vulgaris L. rubra*) [Lewellen *et al* 2009];

- Barbabietole marine selvatiche (forma ancestrale di tutte le specie).

In Italia, le cultivar di *Beta vulgaris L. rubra* più prodotte (Figura 6) sono la varietà Chioggia, Detroit e Rubino Regina, mentre la varietà di *Beta vulgaris cicla* sono bieta erbette a costa bianca e bietaerbette da taglio [Ninfali *et al* 2013].

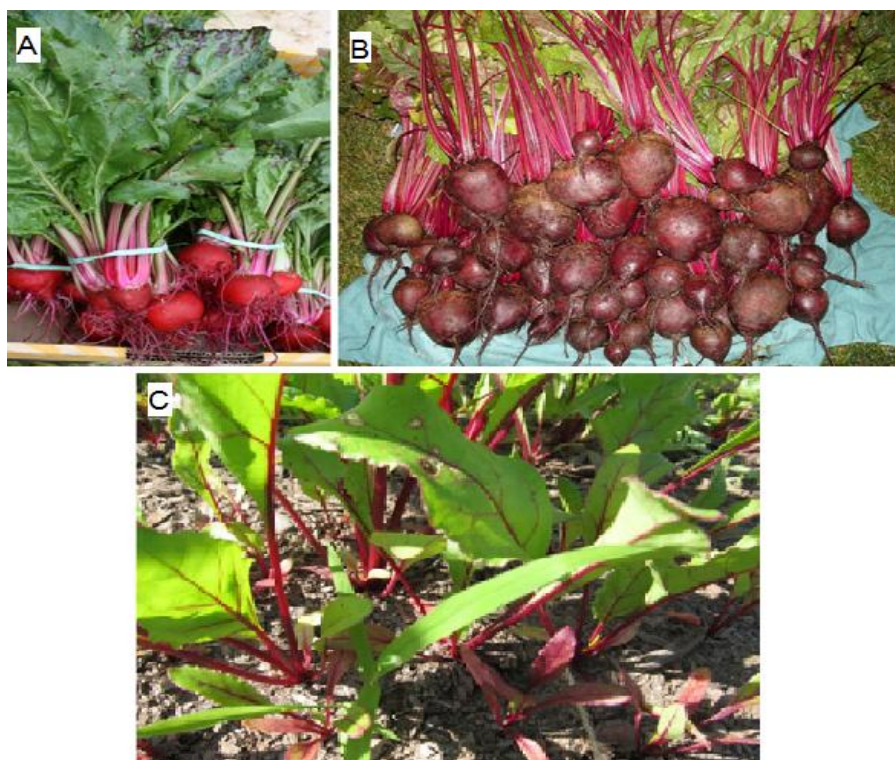


Figura 6. Principali cultivar di *Beta vulgaris L. rubra*. A) Barbabietola rossa varietà Chioggia; B) Varietà Detroit; C) Varietà Rubino Regina; modificato da [Ninfali *et al* 2013]

Botanica

La barbabietola rossa o barbabietola da giardino o da orto, viene coltivata per le sue grandi radici, ma sono utilizzabili anche le foglie. Gli steli possono essere rossi, magenta e bianco e le foglie sono piccole e verdi con delle sottili venature rosse; la barbabietola rossa viene coltivata per il fittone dallo spessore vistoso e dalla forma varia (oblata appiattita, globulare, conica, lunga e affusolata), che si forma durante la prima stagione; con la cottura il colore diffonde uniformemente attraverso la polpa; nella seconda stagione, un alto gambo ramificato e frondoso sorregge grappoli di piccoli fiori verdi, che si sviluppano in frutti color marrone sughero, comunemente chiamati germogli di semi: i colori della polpa e della buccia sono generalmente di colore rosso-porpora scuro con sfumature di bianco [Ninfali *et al* 2013].

Ecologia

La barbabietola rossa cresce su terreni friabili, con una buona consistenza drenante e abbondante materia organica; al suolo si possono aggiungere fertilizzanti commerciali contenenti azoto, fosforo e cloruro di potassio, o fertilizzanti alternativi, come i concimi verdi, i residui colturali, il letame e il concime composto, mentre il pH ottimale del terreno dovrebbe essere compreso tra 6.0 e 6.8, ma viene ben tollerato anche un pH neutro o alcalino; tuttavia, l'ambiente ideale sarebbe un ambiente ad elevata concentrazione salina, come sulla costa marina.

La raccolta della bietola rossa avviene durante l'estate, quando le foglie sono disidratate. Infatti è una pianta in grado di crescere anche in terreni con scarsa disponibilità di acqua, materia organica e condizioni di scarsa luminosità [Ninfali *et al* 2013].

Composizione chimica

Oli essenziali

I semi di *Beta vulgaris* contengono un olio essenziale la cui composizione in acidi grassi mostra un elevato contenuto di acido linoleico, seguito da una notevole presenza di acido oleico. Tra gli acidi grassi saturi, l'elemento dominante è l'acido palmitico (17%).

Polifenoli

I semi, le foglie e le radici di *Beta Vulgaris* sono ricche di composti fenolici, la cui concentrazione dipende dallo stadio di sviluppo della pianta, mostrando un tenore fenolico massimo all'incirca intorno ai 55-60 giorni dopo la semina. Trascorso questo tempo, la concentrazione fenolica tende a scendere progressivamente con l'invecchiamento.

Le concentrazioni di flavonoidi mostrano un andamento simile. Pertanto le foglie dovrebbero essere raccolte nella fase di maturità [Ninfali *et al* 2003].

Il pool fenolico della *Beta vulgaris rubra* è rappresentata da diversi tipi di molecole, che includono acidi fenolici, flavonoidi e amidi fenolici, comprese le betalaine. Gli acidi fenolici maggiormente ritrovati sono stati l'Acido 4-idrossibenzoico, l'acido caffeico e l'acido clorogenico in concentrazioni comprese tra 0,12-0,047 mg/g di estratto secco [Georgiev *et al* 2010].

I **flavonoidi** ritrovati da Geogev *et al.* (2010) e Kujala *et al.* (2002) sono stati catechina-idrato, epicatechina e rutina, nonché betagarina, betavulgarina, cocliofilina e didrossi-isoramnetina.

Le **betalaine**, descritte precedentemente, nella *Beta vulgaris rubra* sono contenute in grande quantità in concentrazioni di betacianine e betaxantine variabili da 0,04-0,21% e 0,02-0,14%, rispettivamente [Stinzing *et al* 2004].

Kujala *et al.* (2002) hanno individuato altri **amidi fenolici** supplementari quali l'N-transferuloiltirammina e l'N-trans-feruloilomovanillamina, composti che hanno poi stimolato studi per la sintesi chimica di queste molecole naturali, da utilizzare come agenti antiossidanti e antitumorali grazie alla loro eccezionale capacità scavenging di radicali e fotoprotettiva [Mee *et al* 2004].

Acidi organici e inorganici

Le radici di *Beta vulgaris rubra* contengono **nitriti (NO₂-)**, che rappresentano fattori anti-nutrizionali poiché sottraggono nutrienti durante il processo digestivo umano [Bavel *et al* 2010]. Un ruolo positivo si ha invece nella riduzione del NO₃- per conversione in ossido nitrico (NO) nel corpo attraverso varie vie, offrendo diversi meccanismi protettivi nei confronti dell'ipossia sia fisiologica che patologica [Lundberg *et al* 2008].

Altri componenti nutrizionali

La barbabietola rossa per quanto concerne i valori nutrizionali (Tabella 4) è ricca di **carboidrati, fibre, proteine e minerali (come sodio, potassio, calcio e ferro)** e l'apporto calorico è di circa 20 kcal/100 g di radice di *Beta vulgaris rubra* (<http://www.bda-ieo.it/>).

Tabella 4. Composizione bromatologica della barbabietola rossa.

Banca Dati di Composizione degli Alimenti per Studi Epidemiologici in Italia

BARBABIETOLA ROSSA

<i>Componenti Alimentari</i>	<i>Valore</i>
Contenuti in 100 g / unità	
COMPONENTI PRINCIPALI	
Parte edibile, %	82
Energia, ricalcolata, kJ	83
Energia, Ric con fibra, kJ	104
Energia, ricalcolata, kcal	19
Energia, Ric con fibra, kcal	25
Proteine totali, g	1,1
Proteine animali, g	0,0
Proteine vegetali, g	1,1
Lipidi totali, g	0,0
Lipidi animali, g	0,0
Lipidi vegetali, g	0,0
Colesterolo, mg	0
Carboidrati disponibili (MSE), g	4,0
Amido (MSE), g	0,0
Carboidrati solubili (MSE), g	4,0
Fibra alimentare totale, g	2,6
Alcol, g	0,0
Acqua, g	91,3
MINERALI ed ELEMENTI IN TRACCIA	
Ferro, mg	0,4
Calcio, mg	20
Sodio, mg	84
Potassio, mg	300
Fosforo, mg	21
Zinco, mg	0,40
VITAMINE IDROSOLUBILI	
Vitamina B1, Tiamina, mg	0,03
Vitamina B2, Riboflavina, mg	0,02
Vitamina C, mg	7
Niacina, mg	0,20
Vitamina B6, mg	0,02
Folati totali, µg	101
VITAMINE LIPOSOLUBILI	
Retinolo equivalente	
Retinolo eq. (RE), µg	tr
Retinolo, µg	0
β-carotene eq., µg	tr
Vitamina E (ATE), mg	tr
Vitamina D, µg	0,00
ACIDI GRASSI	
Acidi grassi saturi totali, g	0,00
Acidi grassi monoinsaturi totali, g	0,00
Acido oleico, g	0,00
Acidi grassi polinsaturi totali, g	0,00
Acido linoleico, g	0,00
Acido linolenico, g	0,00
Altri acidi grassi polinsaturi, g	0,00

Colorante rosso naturale (additivo E162)

Il colore degli alimenti è un importante criterio di acquisto per i consumatori e serve come un cosiddetto "indicatore di qualità"; negli ultimi anni si è notata la tendenza a privilegiare coloranti naturali come additivi alimentari e la disponibilità da parte dei consumatori a pagare di più per una colorazione sana degli alimenti.

Secondo l'Unione Europea, il pigmento di barbabietola rossa è consentito per l'uso come colorante alimentare naturale con la sigla **E162**. Esso viene commercializzato come un concentrato liquido (prodotto dalla concentrazione sottovuoto del succo di barbabietola al 60-65% del totale solido) o come polvere atomizzata (prodotta da essiccamento per congelamento o da spray-essiccamento, contenenti dallo 0,3% all'1% di pigmento di betalaina), con un potere colorante (a 535 nm/1% soluzione) compreso tra 2 e 5. La concentrazione del pigmento puro richiesto per ottenere la tonalità desiderata è relativamente piccola, raramente superiore a 50 mg⁻¹ di betalaina per kg, [Delgado-Vargas *et al* 2000-2002; Cerezal *et al* 1996].

L'E162 viene utilizzato per colorare gli alimenti o evitarne la decolorazione principalmente nei prodotti lattiero-caseari, yogurt, budini, gelati, dolci alla frutta congelati, gelatine, marmellate bevande, pasticcerie, caramelle, gomme da masticare, zuppe, carni e prodotti da forno [Obón *et al* 2009].

Come colore rosso naturale nell'industria alimentare vengono utilizzati anche il rosso carminio (E120) e gli antociani (E163), ma la betanina ha il vantaggio rispetto ad essi di possedere una colorazione ampiamente indipendente dal valore di pH. La betanina infatti è solubile in acqua mantenendosi stabile in un range di pH da 3 a 7, ed è quindi adatta per la colorazione degli alimenti sia acidi che neutri, mentre l'uso delle antocianine non è possibile a valori di pH sopra 3 a causa della loro instabilità [Strack *et al* 2003].

Biodisponibilità

Affinchè un componente alimentare sia considerato benefico per la salute deve essere biodisponibile in vivo, cioè dopo l'ingestione, i composti attivi sono assorbiti attraverso il tratto gastro-intestinale e resi disponibili nella circolazione, in quantità sufficiente, per essere utilizzati dalle cellule [Tesoriere *et al* 2013]. Tuttavia, al fine di raggiungere la circolazione sistemica e esercitare qualsiasi funzione salutistica, ogni componente alimentare deve mantenere la sua struttura molecolare attraverso le diverse fasi di digestione, le quali influenzano significativamente la sua percentuale di assorbimento [Tesoriere *et al* 2008]. E' quindi estremamente importante che qualsiasi presunto beneficio per la salute di una fonte di cibo debba in primo luogo essere verificata con studi preliminari di biodisponibilità in vitro e successivamente in vivo [Tesoriere *et al* 2008]. A questo proposito è ben nota l'elevata biodisponibilità del nitrato inorganico pari a circa il 100% [Kenjale *et al* 2011; Vanhatalo *et al* 2011]. Mentre per quanto riguarda le betalaine la percentuale di assorbimento è meno chiara.

Due studi distinti hanno investigato la biodisponibilità di betalaine misurando la loro comparsa nelle urine umane dopo l'ingestione di un singolo bolo di succo di barbabietole [Tesoriere *et al* 2004]. Kanner *et al.* [Kanner *et al* 2001] hanno identificato lo 0,5% -0,9% delle betalaine ingerite (Betanina e isobetanine) nelle urine di volontari nelle 12 ore dopo aver consumato 300 ml di succo di barbabietola. Questo indica che anche se in piccole quantità, le betalaine possono essere assorbite dall'uomo. Essi hanno inoltre dimostrato che il picco massimo di assorbimento di beta cianine si è verificato 2-4 ore dopo l'ingestione. Tuttavia, c'era un alto livello di variabilità inter-individuale entro questo periodo di tempo. Frank *et al.* [Frank *et al* 2005] hanno riportato risultati simili indagando la biodisponibilità delle betacianine. Dopo aver somministrato a sei partecipanti 500 ml di succo di barbabietola, hanno identificato le betacianine nelle urine a concentrazioni equivalenti a ~ 0,3% della dose ingerita per un periodo di 24 ore. Questi dati potrebbero essere interpretati come un basso livello di biodisponibilità. Tuttavia, è importante tener conto del fatto che le betalaine sono poco eliminabili esclusivamente attraverso la via renale [Frank *et al* 2005]. Infatti, l'uso di escrezione urinaria come unico indicatore di biodisponibilità ha ricevuto critiche perché non tiene conto del metabolismo biliare e della clearance circolatoria dei composti, sottostimando così il vero valore di biodisponibilità. Inoltre, il modo in cui le betalaine sono metabolizzate e strutturalmente trasformate in metaboliti secondari non è ancora ben caratterizzata [Frank *et al* 2005].

Date queste limitazioni, Tesoriere *et al.* [Tesoriere *et al* 2012] hanno impiegato un diverso approccio per indagare la biodisponibilità di Betalaine. Essi hanno sviluppato un modello sperimentale in cui mimavano in vitro l'epitelio intestinale umano, usando monostrati di cellule Caco-2 per simulare una barriera funzionale. Questo modello ha permesso loro di esaminare se le

betalaine possono essere assorbite attraverso la barriera intestinale e quindi, hanno dato un'indicazione della loro biodisponibilità. Essi hanno dimostrato che la betanina e in misura maggiore l'indicaxanthin erano ben assorbite attraverso il modello simulato dell'epitelio intestinale e soprattutto nella loro forma non metabolizzata. Quest'ultimo risultato è particolarmente importante, perché rivela che le betalaine possono essere assorbite nella circolazione sistemica nella loro forma originaria, permettendo loro di mantenere la struttura molecolare necessaria per espletare un'attività biologica. C'era inoltre qualche evidenza che le betanine potevano essere assorbite tramite il trasporto transcellulare. Tuttavia, è importante notare che i risultati di esperimenti in vitro, anche quando progettati per simulare l'ambiente biologico del tratto intestinale umano, non necessariamente si traducono in conclusioni certe in vivo, dato che molti altri fattori (metabolismo di primo passaggio, interazioni con microflora e proteasi di degradazione) hanno un'influenza significativa sulla concentrazione di nutrienti che alla fine raggiungeranno la circolazione.

In aggiunta alla famiglia delle betalaine, altri antiossidanti identificati nella bietola rossa, come epicatechina, rutina e acido caffeico [Ninfali *et al* 2013], sembrano essere ben assorbiti e biodisponibili nell'uomo [Clifford *et al* 2015]. Sebbene, la biodisponibilità di questi e altri composti fenolici della barbabietola non sono stati determinati singolarmente, ci sono dati che descrivono la biodisponibilità del totale dei composti fenolici presenti nella barbabietola. Netzel *et al.* (2005) hanno misurato l'escrezione urinaria di sostanze fenoliche totali a seguito di una singola somministrazione di 500 ml di succo di barbabietola. Essi hanno identificato ~ 685 mg di composti fenolici nelle urine dei partecipanti a meno di 24 h dopo l'ingestione di succo di barbabietola. Mentre la biodisponibilità relativa dei singoli composti non può essere determinata, questi risultati mostrano chiaramente che i composti fenolici costituenti della bietola rossa sono biodisponibili.

Alla luce degli studi presenti in letteratura possiamo affermare che la bietola rossa rappresenta una buona fonte di composti abbastanza biodisponibili nell'uomo. Detto questo, un ulteriore lavoro è ancora necessario per: chiarire la biodisponibilità dei singoli componenti bioattivi della bietola e stabilire la misura in cui il plasma, la via biliare e altre vie metaboliche contribuiscono alla circolazione ed escrezione di questi componenti. Questi dati dovrebbero dare una migliore comprensione della biodisponibilità fitochimica della bietola rossa e quindi chiarirne il potenziale utilizzo per la promozione della salute dell'uomo.

Tecniche di purificazione delle betalaine

In letteratura esistono vari metodi per la purificazione delle betalaine e Gonçalves *et al.* (2012) hanno effettuato un confronto sistematico di questi procedimenti, quantificando le concentrazioni di betanine e isobetanine estratte da fonti alimentari commerciali quali succo di barbabietola fresco (da *Beta vulgaris*), barbabietole liofilizzate (polvere di barbabietola alimentare commerciale) e betanine diluite con destrine (betanina commerciale E162), confrontando peraltro le prestazioni dei diversi metodi.

Analizziamo ora più dettagliatamente i metodi di isolamento delle Betalaine presenti in letteratura.

- Purificazione mediante **Cromatografia per gel filtrazione (CGF)**

La CGF è una tecnica di separazione fisica utilizzata principalmente per l'analisi di materiali polimerici ad alto peso molecolare. I gel utilizzati per l'impaccamento delle colonne lavorano con il principio del "setaccio molecolare". Il soluto che passa attraverso la colonna subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle particelle e alle dimensioni dei pori. Poiché non vi è alcun tipo di legame chimico tra soluto e gel (o almeno nessun legame che abbia forza tale da determinare un'ulteriore separazione), l'ordine dei picchi in uscita andrà dalle molecole a peso molecolare maggiore (che non passano attraverso i pori e quindi escono rapidamente) a quelle di peso inferiore, le quali percorrendo i percorsi creati dalla porosità del gel impiegheranno un tempo maggiore a percorrere la colonna. In questo metodo, sono stati utilizzate come fasi stazionarie le resine Sephadex G-25 (6 g) e Sephadex LH-20 (5 g). L'eluizione è stata eseguita con acqua deionizzata come fase mobile.

- Purificazione mediante **cromatografia su colonna a fase normale (NPC)**

La NPC è basata sull'interazione tra i siti attivi di un agente adsorbente solido (generalmente silice) con i gruppi funzionali presenti nelle molecole del soluto da separare. I soluti si legano in maniera reversibile alla fase stazionaria mediante interazioni dipolo-dipolo o interazioni dipolo-dipolo indotto. Questo tipo di interazioni è il risultato di un complesso fenomeno competitivo tra le molecole della fase mobile e del soluto per i siti attivi della fase stazionaria. Come fase stazionaria è stato usato il Gel di silice 60 (15 g) in una colonna di vetro impaccata con una miscela solvente di metanolo, acqua e acido acetico glaciale, con cui si è effettuata anche l'eluizione.

- Purificazione mediante **cromatografia su colonna in fase inversa (RPC)**

La RPC è una forma di cromatografia per ripartizione liquido-liquido in cui il carattere polare delle fasi è inverso rispetto alla cromatografia su carta: la fase stazionaria è costituita da un liquido non polare immobilizzato su un supporto solido relativamente inerte e la fase mobile rappresenta un liquido più polare. Il gel di silice 90 C18 è stato usato come fase stazionaria in una colonna di vetro, condizionata con metanolo seguito da acqua deionizzata, mentre l'eluizione è stata eseguita solo con acqua deionizzata.

- Purificazione mediante **cromatografia a scambio ionico (IEX)**

Nella cromatografia a scambio ionico la fase stazionaria è costituita da macromolecole contenenti dei siti attivi ionizzati, in cui i contro-ioni possono essere scambiati con altri aventi carica uguale, eluiti con la fase mobile; si instaura così una sorta di competizione fra i contro-ioni della fase stazionaria e quelli della miscela in fase di separazione, nei confronti dei siti attivi ionizzati della fase stazionaria. Durante la separazione gli ioni presenti nella fase mobile vengono separati gli uni dagli altri in base alla diversa affinità per ciascuno dei siti ionizzati della fase stazionaria. Come fase stazionaria è stata utilizzata la resina Q-Sepharose High Performance (reticolato di agarosio con ammonio quaternario come gruppo scambiatore in una colonna di vetro condizionata con acqua. I campioni sono stati lavati con acqua ed eluiti con un gradiente di NaCl (0,1-0,5 M).

- Purificazione mediante **estrazione acquosa a due fasi (ATPE)**

La ATPE è una metodica di laboratorio utilizzata per ottenere composti puri da fonti animali o vegetali o semplicemente per purificare sostanze impure. Vengono utilizzati due tipi di solventi, con differente livello di polarità e miscibilità reciproca per permettere il passaggio di un soluto da un solvente ad un altro.

In questo caso PEG 5000 (2 g) e (NH₄)₂SO₄ (2 g) sono stati aggiunti ai campioni poi disciolti in acqua, filtrati, riversati in un contenitore e mescolati a fondo con un agitatore magnetico per 1 ora per equilibrare e per 3 ore per ottenere la separazione, ottenendo uno strato di soprannatante color rosso magenta (contenente la betanina successivamente estratta con cloroformio) e sottoposto ad analisi UV-Visibile e HPLC [Chethana *et al* 2007].

- Purificazione mediante **cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC)**

Il campione che si vuole separare è miscelato alla fase mobile e quindi trasportato in colonna a contatto con la fase stazionaria. La molecola a seconda della sua struttura chimica avrà una diversa “affinità” per la fase mobile e per la fase stazionaria. In questo caso abbiamo una fase stazionaria apolare (di natura idrofobica non solubile in acqua) e una fase mobile polare. La cromatografia in fase inversa è stata eseguita con apparato Waters 2489 (Milford, MA) 600, dotato di un rivelatore UV-Vis (a doppia lunghezza d'onda, Waters) e colonna C18 Jupiter-15.

Il Confronto tra questi metodi ha indicato che la cromatografia a scambio ionico risulta essere molto più efficiente degli altri. Tuttavia, questo metodo richiede tempi lunghi e la quantità di **sale**, contenute nelle frazioni purificate, portano ad interferenza. I metodi di cromatografia RP-HPLC e RPC sembrano offrire il miglior equilibrio tra velocità ed efficienza.

Proprietà salutistiche delle betalaine

Le betalaine costituiscono un importante gruppo di composti fitochimici che possono essere opportunamente ritrovati nel complesso di sostanze nutraceutiche donateci dalla natura per proteggere la nostra salute. Nella farmacologia moderna, esse sono state le molecole protettive per la salute più studiate dimostrando la loro attività anti-infiammatoria, scavenger di radicali liberi, e antiossidante, non ch  quella antitumorale.

Attivit  antiinfiammatoria

In circostanze normali, l'infiammazione   considerata come un processo utile, che regola la nostra risposta innata agli stimoli biologici o fisici, come traumi, infezioni e altri agenti patogeni che possono causare il danno dell'organismo e disturbare l'omeostasi [Monteiro *et al* 2010; Ricciotti 2011; Yoon *et al* 2005]. Detto questo, l'attivazione immunitaria pu  ancora avere conseguenze indesiderabili per la salute. Nel breve termine, arrossamento, gonfiore, dolore e funzionalit  ridotta insorgono presso il sito di infiammazione; tuttavia, pi  preoccupante   la potenziale implicazione a lungo termine, se l'infiammazione persiste, ed   irrisolta [Yoon *et al* 2005; Calixto *et al* 2004]. La mancata rimozione dell'elemento scatenante e il ripristino della normale funzione immunitaria pu  causare infiammazione cronica con conseguente disfunzione delle cellule a lungo termine [Kundu *et al* 2012]. L'infiammazione cronica   spesso implicata nella insorgenza e progressione di diversi disturbi clinici, come l'obesit , malattie del fegato, il cancro e le malattie cardiache [García-Lafuente *et al* 2009; O'Byrne *et al* 2001; Monteiro *et al* 2010].

Dal 1970, il trattamento tradizionale per i disturbi infiammatori si basa su farmaci non steroidei anti-infiammatori (FANS) [Yoon *et al* 2005]. Tuttavia, questi farmaci, specialmente in dosi croniche, possono in realt  avere conseguenze deleterie per la salute ed evocare effetti collaterali negativi [García-Lafuente *et al* 2009; Page *et al* 2000]. Soprattutto, sono stati ritenuti inefficaci nel trattamento di molte patologie infiammatorie [García-Lafuente *et al* 2009]. Di conseguenza, l'attenzione si   spostata verso gli effetti anti-infiammatori di fonti alimentari naturali come alternativa ai trattamenti con FANS [Calixto *et al* 2004].

Betalaine ed estratti di barbabietola sono potenti agenti anti-infiammatori. Almeno una parte dei loro effetti anti-infiammatori sembra essere mediata da interazione con cascate di segnalazione pro-infiammatorie. La pi  importante di queste   la via di segnale del Nuclear Factor-kappa B (NF-kB), in quanto direttamente attiva nella trascrizione della maggior parte dei geni che regolano e amplificano la risposta infiammatoria, come ad esempio, le citochine e chemochine [Baker *et al* 2001]. Di conseguenza, l'attivit  di NF-kB svolge un ruolo centrale nei processi infiammatori che si

manifestano nella malattia cronica [Baker *et al* 2001]. In uno studio recente [El Gamal *et al* 2014], l'attività di NF-kB di legare il DNA, era attenuato nei ratti nefrotossici somministrando un estratto di barbabietola per 28 giorni (250 mg o 500 mg/kg/bw). Inoltre, omogenati di rene di ratti, trattati con la barbabietola avevano concentrazioni più basse di molecole segnale come TNF-alfa, IL-6 e mieloperossidasi (MPO) e ridotti segni di danno ossidativo (MDA), che potrebbero essere direttamente collegate alla via NF-kB. Questi effetti sono suscettibili dall'essere mediati, almeno in parte, dalle betalaine presenti nella barbabietola. Dati recenti mostrano che il trattamento con betanina (25 e 100 mg/kg/bw per 5 giorni) inibisce significativamente NF-kB [Tan *et al* 2015]. Inoltre è stato anche dimostrato che le Betalaine inibiscono l'espressione in vitro della cicloossigenasi-2 (COX-2), che è un importante molecola precursore di metaboliti dell'acido arachidonico, ovvero dei pro-infiammatori noti come prostaglandine [Reddy *et al* 2005; Vidal *et al* 2014; Zielińska-Przyjemska *et al* 2009]. Reddy *et al.* (2005) hanno trovato che la betanina inibiva l'attività dell'enzima cicloossigenasi-2 (COX-2) del 97%.

Un recente studio condotto da Vidal *et al* [Vidal *et al* 2014] ha fornito un ulteriore supporto per gli effetti anti- infiammatori di Betalaine.

Ci sono alcuni studi che dimostrano che gli integratori di barbabietola hanno effetti anti-infiammatori in vivo. Pietrkowski *et al.* (2010) hanno dimostrato che la somministrazione terapeutica di capsule ricche di betalaina, erano in grado di alleviare l'infiammazione in pazienti affetti da problemi osteoarticolari. Dopo 10 giorni di supplementazione (100, 70 o 35 mg al giorno), le citochine pro-infiammatorie, il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) e l'interleuchina-6 (IL-6), erano diminuiti rispetto al basale. L' oncogene-alfa (GRO- α) e l'attivazione delle cellule T (RANTES) sono stati anche marcatamente inibiti dal trattamento con bietola rossa. Inoltre, la risposta infiammatoria moderata coincideva con una significativa riduzione del dolore auto-riferito sul McGill Pain Questionnaire.

Krajka-Kuźniak *et al.* (2012) hanno esaminato l'effetto protettivo di succo di barbabietola (8 ml/kg/bw/die) su marcatori di danno epatico e infiammazione, indotti dalla sostanza chimica tossica N-nitrosodietilamina (NDEA) nei ratti. Rispetto ad un controllo non trattato, il succo di barbabietola ha conferito protezione epatica significativa contro una serie di marker infiammatori indotti dalla somministrazione di NDEA. I marker erano: lattato deidrogenasi, aspartato aminotransferasi, gamma glutamil transferasi e alanina amino transferasi, i quali hanno dimostrato tutti un'importante attenuazione. In uno studio più recente, El Gamal *et al.* (2014) hanno utilizzato ratti alimentati sia con placebo che con dosi orali di estratto etanolic di barbabietola (250 o 500 mg/kg /bw/die) per 28 giorni. Dal giorno 20-28 sono stati trattati con gentamicina, farmaco nefrotossico (85 mg · kg ·

bw/die). Dopo 28 giorni, omogenati di rene di entrambi i gruppi sono stati rimossi e analizzati per diversi marcatori di danno renale. I topi trattati con barbabietola avevano concentrazioni significativamente più basse di diversi mediatori pro-infiammatori, tra cui IL-6, TNF- α , la mieloperossidasi (che rappresenta l'infiltrazione dei neutrofili) NF-kB. Hanno trovato anche ridotto lo stress ossidativo (MDA, acido urico) e una maggiore attività antiossidante endogena negli omogenati prelevati dai topi pre-trattati con barbabietole. Presi insieme, questi studi supportano l'idea che la supplementazione con barbabietola offra una protezione anti-infiammatori in vivo. Studi clinici, a lungo termine sono chiaramente necessari per chiarire se tale strategia potrebbe aiutare nella gestione di disturbi infiammatori.

L'attività antiossidante e anti-infiammatoria della barbabietola ha portato anche ad interesse nel suo potenziale uso in malattie caratterizzate da funzione delle cellule immunitarie aberranti. Infatti, l'infiammazione cronica è sempre più implicata nello sviluppo di tumori maligni e diversi esperimenti suggeriscono che gli estratti di betalaine ottenuti da bietola rossa possono inibire o prevenire l'insorgenza di queste patologie. Per esempio, Lechner et al (2010) hanno esaminato se a lungo termine (35 settimane), il trattamento con un estratto contenente betacianina (78 mg/ ml/ die) di E162 potesse essere in grado di inibire l'incidenza di tumori nei ratti esposti a un potente promotore tumorale (N -nitrosomethylbenzylamine). Rispetto al controllo, i topi trattati con betacianina mostravano una proliferazione cellulare marcatamente inibita, inibizione di angiogenesi e di tumorigenesi nelle lesioni esofagee, effetti sostanzialmente attribuiti alla attività radical scavenging e anti-infiammatoria di betacianina. Ciò è stato dimostrato dal numero notevolmente ridotto di linfociti infiammatori presenti nei tumori dell'esofago dei soli ratti trattati con betacianina. Gli effetti chemio-preventivi di estratti betacianina sono stati osservati anche in cellule polmonari, cutanee e in modelli animali di cancro del fegato, prostata, pelle, seno e pancreas [Das *et al* 2013; Kapadia *et al* 2011; Kapadia *et al* 2003; Kapadia *et al* 2013]. Inoltre, la co-somministrazione di estratti di barbabietole con doxorubicina, un efficace farmaco chemioterapico ma altamente tossico, riduce in modo significativo la sua citotossicità, probabilmente modulando l'induzione del farmaco di RONS (**Reactive Oxygen Nitrogen Species**) nelle cellule tumorali [Das *et al* 2013; Kapadia *et al* 2013]. Anche se lontano dall'essere conclusivi, questi risultati in linee cellulari umane e animali, suggeriscono che la supplementazione di estratti di bietola rossa rappresenta una promettente strategia per ridurre alcuni dei sintomi di infiammazione nel cancro.

Stress Ossidativo e Nrf2

Una dieta arricchita con bietola rossa potrebbe essere una strategia utile per rafforzare le difese antiossidanti endogene, contribuendo a proteggere i componenti cellulari dal danno ossidativo. In condizioni metaboliche normali, l'ambiente biologico di una cellula è considerato in uno stato di equilibrio redox, quando esiste un equilibrio tra antiossidanti e pro-ossidanti [Kannan *et al* 2001; Kohen *et al* 2011]. Molecole in grado di ossidare sono comunemente note come specie di ossigeno e azoto reattive (RONS: **Reactive Oxygen Nitrogen Species**) e sono continuamente generati nel metabolismo cellulare [Kohen *et al* 2011]. A basse concentrazioni, i RONS svolgono un ruolo importante in vari processi cellulari e biochimici, tra cui l'espressione genica, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la contrazione muscolare [Kannan *et al* 2001; Kohen *et al* 2011; Baker *et al* 2001; Powers *et al* 2008]. Tuttavia, l'eccesso di esposizione di una cellula a stress ossidativo, genera tanti RONS che possono sopraffare le difese antiossidanti cellulari, causando uno squilibrio nella omeostasi redox [Kohen *et al* 2011]. Questo squilibrio può sopraffare la rete di difesa antiossidante endogena lasciando le strutture del DNA, carboidrati, proteine e lipidi sensibili all'ossidazione [Madamanchi *et al* 2005; Reuter *et al* 2010; Schinella *et al* 2007]. In alcuni casi, le cellule possono soffrire di periodi acuti di stress ossidativo che indeboliscono temporaneamente le difese antiossidanti [Lobo *et al* 2010]. Tuttavia, in molti stati patologici umani, come il cancro, lo stress ossidativo è una situazione cronica perpetuata da una produzione di RONS che inducono a lungo termine problemi cellulari [Lobo *et al* 2010; Liu *et al* 2013]. Una stima ha suggerito che lo stress ossidativo gioca un ruolo nella patofisiologia di oltre 200 condizioni cliniche [Kohen *et al* 2002]. Non sorprende perciò che molte fonti di cibo antiossidanti siano state valutate per la loro capacità di catturare RONS ed evitare lo stress ossidativo.

La betanina, è stata dimostrata in vitro essere in grado di proteggere i componenti cellulari dal danno ossidativo [Kanner *et al* 2001; Reddy *et al* 2005; Tesoriere *et al* 2008]. Ad esempio, nello studio di Kanner *et al*. [Kanner *et al* 2001] due metaboliti betalaminici (Betanina e betanidina) hanno dimostrato essere in grado di ridurre il danno indotto da linoleato citocromo C ossidasi e l'ossidazione dei lipidi di membrana indotta da metmioglobina/ H₂O₂ e ferro libero. Gli autori hanno anche riferito che betanina, la più abbondante betalaina presente nella barbabietola (300-600 mg/kg-1), si è dimostrata essere il più efficace inibitore della perossidazione lipidica. Un'altra importante attività antiossidante svolta da Betanina sembra derivare dalla sua eccezionale capacità di donare elettroni e disinnescare radicali altamente reattivi su bersagli come i lipidi delle membrane cellulari [Kanner *et al* 2001]. Tuttavia, come accennato in precedenza, le betalaine non sono i soli composti antiossidanti presenti nella barbabietola. Oltre a vari composti fenolici

altamente bioattivi, come rutina, epicatechina e acido caffeico, che sono anche noti per essere ottimi antiossidanti [Georgiev *et al* 2010; Frank *et al* 2005, Manach *et al* 2005]. Ci sono i nitriti e altri donatori di NO, che hanno dimostrato di sopprimere la formazione di radicali e catturare direttamente i RONS [Lundberg *et al* 2011; Wink *et al* 2001; Wink *et al* 2011].

Un certo numero di studi riportano che la barbabietola, sotto forma di un supplemento di succo di frutta, protegge contro i danni ossidativi le strutture del DNA, lipidi e proteine in vitro [Kujawska *et al* 2009; Winkler *et al* 2005; Pietrzkowski *et al* 2010]. Wootton-Beard *et al* [Wootton-Beard *et al* 2011], hanno visto che due succhi di barbabietola, disponibili in commercio, hanno inibito in vitro la formazione di radicali in 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH •) e (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) ABTS del 100% e 92%, rispettivamente. Quando questi test sono stati ripetuti, in condizioni tali da simulare il processo digestivo umano, i succhi conservavano ancora il $\geq 55\%$ di capacità antiradicalica. Inoltre, la capacità antiossidante di entrambe le bevande, misurata col metodo FRAP, indicava una capacità antiossidante che aumentava dopo la digestione simulata, rispetto al succo tal quale. Questo è probabilmente una conseguenza dei diversi composti antiossidanti che si formano nel processo digestivo e che possiedono elevata capacità antiossidante [Wootton-Beard *et al* 2011 a; Wootton-Beard *et al* 2011]. Un ulteriore lavoro di questo gruppo ha dimostrato che la capacità antiossidante del succo di barbabietola è paragonabile o superiore a una varietà di frutta e ortaggi [Wootton-Beard *et al* 2011; Ryan *et al* 2010]. È interessante notare che la capacità antiossidante del succo di barbabietola col metodo DPPH FRAP era molto più grande rispetto ai succhi di verdura più noti, come il pomodoro e la carota, e succhi di frutta, come l'arancio e ananas. Solo il succo di melograno possedeva una capacità antiossidante superiore alle bietole nel test FRAP.

Studi sull'attività antiossidante di bietola rossa radicali e bietola rossa sono stati condotti anche in vivo. In uno studio recente [Vulić *et al* 2014], i ratti sono stati nutriti con 1-3 ml/kg/bw di un estratto di barbabietola, per 7 giorni, prima di essere esposti a 2 ml/ kg/ bw di carbonio tetracloruro (CCl₄), un agente cancerogeno ben consolidato e generatore RONS. Dopo la somministrazione CCl₄, il fegato omogeneizzato è stato rimosso da ratti pre-trattati con gli estratti di barbabietola e dai controlli. I ratti trattati con estratti di barbabietola esprimevano livelli significativamente più bassi di perossidazione lipidica, misurata come sostanze reattive di acido tiobarbiturico (TBARS). Inoltre, gli estratti di barbabietola sembravano mantenere l'attività endogena antiossidante (glutazione ridotto, glutazione perossidasi ed enzimi catalasi) a concentrazioni normali cellulari [Vulić *et al* 2014]. Ciò ha portato gli autori a ipotizzare che, in risposta a CCl₄, la barbabietola può presentare effetti antiossidanti indiretti che agiscono per regolare i meccanismi di difesa antiossidanti [Vulić *et al* 2014].

Effetti antiossidanti simili sono stati segnalati anche in altri studi che utilizzano succo di barbabietola a dosi maggiori e tempi più lunghi.

Ad esempio il succo di barbabietola è stato somministrato ai ratti (8 mL/kg/bw/die) per 28 giorni, ed è stato dimostrato essere in grado di attenuare la perossidazione lipidica, l'ossidazione delle proteine e il danno al DNA. In un più recente studio, i ratti sono stati nutriti con succo di barbabietola (8 mL/kg/bw/die per 28 giorni) e trattati con la sostanza cancerogena 7,12-dimetilbenz-antracene (DMBA) [Szafer *et al* 2014]. Diversi marcatori di danno epatico e infiammazione aumentavano significativamente in seguito al trattamento DMBA; tuttavia, questi sono stati notevolmente ridotti nei ratti pretrattati con succo di barbabietola rispetto al gruppo di controllo. Non ci sono state differenze di danni al DNA tra i gruppi. Curiosamente, i ratti non trattati con DMBA hanno mostrato una maggiore attività di enzimi disintossicanti (GST e NQO1), che svolgono un ruolo importante nella difesa antiossidante endogena. Questi effetti potrebbero essere correlati, in parte, alla betanina e al suo effetto sulle vie di segnale che mediano la trascrizione dei geni antiossidanti. Esatbeyoglu *et al*. [Esatbeyoglu *et al* 2014] hanno rilevato che betanina 5-15 μ M) dose dipendente (5-15 μ M ha aumentato l'attività del fattore nucleare (eritroide-derivato 2) -come 2 (Nrf2), un fattore di trascrizione che attiva una sequenza del gene promotore ARE responsabile per la trascrizione di numerosi enzimi antiossidanti endogeni [Esatbeyoglu *et al* 2014; Satoh *et al* 2016; Nguyen *et al* 2009]. Krajka-Kuźniak *et al* (2013) hanno presentato risultati simili, mostrando che betanina (2, 10 e 20 μ M) attiva l'espulsione di Nrf2 in linee cellulari epatiche umane non tumorali. Inoltre, questo ha portato alla aumentata attività di mRNA di diversi enzimi di fase II disintossicanti, compreso glutatione S-tranferasi e NAD (P) H-chinone ossidoreduttasi, che svolgono un ruolo importante nella difesa dell'ospite contro xenobiotici. Ciò solleva la possibilità che il potenziale antiossidante di barbabietola non sia limitato al solo scavenging e soppressione di RONS, ma includa anche la capacità di rafforzare la rete antiossidante endogena. Tuttavia, se tali effetti si traducono in vivo, in particolare negli esseri umani deve ancora essere indagato.

Alla luce di questi risultati, si deve anche considerare che altri composti presenti nella barbabietola e nei metaboliti a valle, possiedono effetti simili a Betanina sulla attività trascrizionale. Così, in vivo, questi composti e metaboliti possono lavorare sinergicamente per attivare il percorso Nrf2-ARE, che, a sua volta, media un aumento dell'attività antiossidante endogena (Figura 7). Tale possibilità merita ulteriore attenzione.

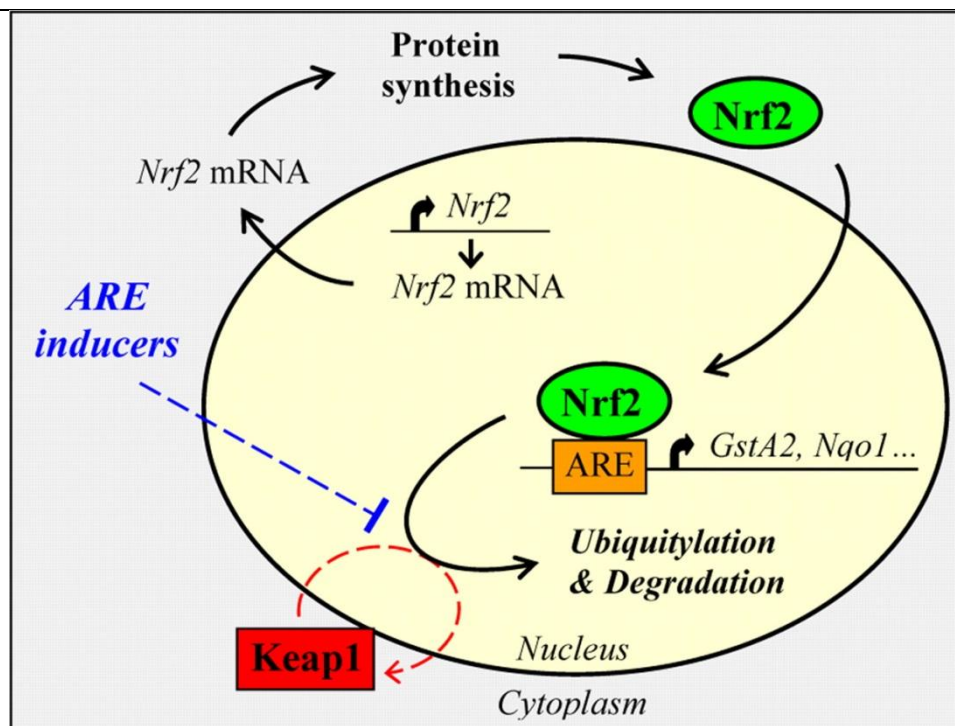


Figura 7. Pathway Nrf2-ARE per la regolazione della risposta antiossidante della cellula. ARE: Antioxidant Responsive Element. Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1. Gsta2: Glutathione S Transferase A2. NQO1: NADPH Quinone Oxidoreductase 1.

Collettivamente, gli studi dimostrano che la bietola rossa è un'ottima fonte di antiossidanti che protegge i componenti cellulari dall'ossidazione in vitro e in vivo. La supplementazione di barbabietola potrebbe essere una strategia promettente per contrastare lo stress ossidativo in danni epatici o in presenza di cancro. Detto questo, c'è ancora una mancanza di sperimentazione umana ben condotta, per arrivare a raccomandazioni definitive. Inoltre, i dati sono attualmente limitati a situazioni che inducono stress ossidativo attraverso xenobiotici, mentre i RONS, generati per via endogena svolgono un ruolo significativo nella malattia umana [Halliwell *et al* 1994]. A questo proposito, un estenuante esercizio fisico potrebbe servire da modello utile per studiare il potenziale antiossidante di barbabietola e dei suoi componenti negli esseri umani. Ci sono diversi studi che documentano che i danni meccanici e metabolici dei muscoli durante l'esercizio intenso inducono stress ossidativo a breve termine, che può persistere per diversi giorni fino a quando l'equilibrio redox viene ripristinato [Bell *et al* 2014; Howatson *et al* 2010]. Pertanto, si deve considerare che l'applicazione di un preparato di barbabietola rossa, dopo un intenso esercizio, potrebbe servire come modello utile per verificarne un eventuale efficacia come agente antiossidante nell'uomo, e,

soprattutto, fornire una comprensione più approfondita delle sue potenziali applicazioni in ambito clinico.

Funzione endoteliale

Il nitrato fornito tramite il succo di barbabietola rossa viene metabolizzato in nitrito, che può essere ulteriormente ridotto per la produzione di NO [Lundberg *et al* 2008, Hobbs *et al* 2013]. La conversione del nitrito in NO può essere catalizzata da un certo numero di donatori di elettroni, da diverse proteine (ad esempio, deoxymyoglobina, xantina ossidoreduttasi) e antiossidanti (ad esempio, la vitamina C) [Lundberg *et al* 2008; Gladwin *et al* 2005; Kim-Shapiro *et al* 2014]. Una delle funzioni più importanti di NO endogeno è quella di mantenere la funzione endoteliale [Hobbs *et al* 2013; Davignon *et al* 2004]. L'endotelio svolge un ruolo critico nella regolazione dell'omeostasi vascolare, mantenendo l'attività trombotica, la funzione piastrinica, il tono vascolare e il delicato equilibrio tra il rilascio di vasodilatatore (vale a dire, NO, prostaciclina) e agenti vasocostrittori (cioè, endotelina-1, trombossano) [Davignon *et al* 2004; Celermajer *et al* 1997].

Un impoverimento nella disponibilità di NO, come si è visto con l'invecchiamento, è stata individuata come la causa principale della disfunzione endoteliale [Davignon *et al* 2004]. La disfunzione endoteliale si propone come un fattore di rischio primario per diversi disturbi cardiovascolari ed è stato implicato nella patogenesi di ipertensione e aterosclerosi [Lidder *et al* 2013; Joris *et al* 2013]. Pertanto, la bietola rossa, essendo un donatore di NO naturale, è stato proposto come un approccio nutrizionale per preservare o ripristinare la funzione endoteliale.

Webb *et al.* (2008) furono i primi a studiare gli effetti di un supplemento di bietola rossa sulla funzione endoteliale nei soggetti sani. Hanno misurato la funzione dell'arteria endoteliale brachiale (BA) utilizzando la tecnica flusso mediata di dilatazione (FMD), che prevede il calcolo della dilatazione di BA, prima e dopo un insulto ischemico di 20 min. La procedura ischemica (BA occlusione) è stata efficace a indurre disfunzione endoteliale, come dimostra la diminuzione del 60% di inviare la risposta BA FMD. Tuttavia, quando i soggetti sono stati pre-trattati 2 ore prima con una singola porzione di succo di barbabietole (500 ml; 23 mmol di nitrati) la risposta BAFMD è stata mantenuta a livelli pre-ischemici, suggerendo che il succo di barbabietola ha agito per preservare la funzione endoteliale.

Hobbs *et al.* (2013) hanno esteso questi risultati, esaminando l'assunzione acuta di pane arricchito con barbabietola (100 g barbabietola +1.1 mmoli nitrati, nitrati; 1,1 mmol) sulla micro funzione vascolare e la rigidità arteriosa periferica nei giovani maschi sani. Il pane di barbabietola aumenta la vasodilatazione micro vascolare, come misurato da cambiamenti nella perfusione cutanea utilizzando doppler laser (LDI). La vasodilatazione Endotelio-indipendente (unità di perfusione) è

stata ~ 343% maggiore nelle 6 ore dopo l'ingestione del pane arricchito con barbabietole rispetto al pane di controllo. È importante sottolineare che questo studio ha fornito la prova che anche un piccolo carico di nitrati (1,1 mmoli) può apportare notevoli miglioramenti nella funzione intravascolare. Effetti vascolari simili sono stati segnalati anche in uno studio con le popolazioni anziane. Utilizzando soggetti apparentemente sani ma leggermente obesi, di età attorno ai 61 anni. Joris *et al* (2013) hanno esaminato se la supplementazione di succo di barbabietola poteva impedire modificazioni postprandiali postprandiali in BA-FMD. In un esperimento d'incrocio randomizzato, la risposta di BA FMD è scesa dell' 1,6% nella condizione di controllo, mentre dopo il succo di barbabietola (140 ml, 500 mg nitrati;), la perdita di valore è stata solo dello 0,4%, indicativo di un effetto protettivo, bietola mediato, su funzione endoteliale postprandiale.

La replica dei risultati di cui sopra nei volontari con grave disfunzione endoteliale si è rivelata più difficile. Per esempio, Kenjale *et al* (2011) hanno riferito che l'assunzione acuta di succo di bietola (500 ml) non aveva alcuna influenza sulla funzione endoteliale nei pazienti affetti da arteriopatia periferica (PAD), come valutato dalla risposta BA FMD (%dilatazione arteriosa) ad uno stimolo iperemico. In un altro studio, di tipo 2, volontari con diabete sono stati nutriti sia con succo di barbabietola (250 ml/ die/7,5 mmol nitrato) o un nitrato impoverito usato come placebo per 14 giorni [Gilchrist *et al* 2013]. Dopo il periodo di trattamento, la risposta BA FMD è risultata simile tra il gruppo di controllo e quello trattato con il succo di barbabietola (4,94% contro 4,97% di cambiamento nel diametro del vaso.

Funzione cognitiva

La funzione cognitiva si deteriora con l'età. Uno degli eventi patologici chiave che precede il suo sviluppo è la riduzione del flusso ematico cerebrale [Bond *et al* 2013; Spilt *et al* 2005; Bondonno *et al* 2014]. Una compromissione della perfusione cerebrale è stata implicata in diversi disturbi neurologici associati alla scarsa capacità cognitiva, come danni cerebrali, demenza clinica e malattia di Alzheimer [De la Torre *et al* 2000, Poels *et al* 2008]. Uno dei principali fattori scatenanti e di rischio per l'insorgenza e lo sviluppo di ipo-perfusione cerebrale è una perturbazione nella funzione neurovascolare; un effetto che è, in parte, mediato da alterata attività di NO [De la Torre *et al* 2000; Poels *et al* 2008]. Una diminuita capacità di generare NO può compromettere la normale funzione del metabolismo energetico cerebrale neuronale che nel lungo periodo potrebbe indurre neurodegenerazione e deficit cognitivi [Spilt *et al* 2005; Bondonno *et al* 2014; De la Torre *et al* 2000]. Pertanto, è concepibile che un generatore di NO come la bietola ha il potenziale per migliorare il flusso sanguigno cerebrale e migliora la funzione cognitiva.

Due recenti studi sull'uomo hanno esaminato l'influenza di nitrati dalla bietola rossa sul flusso sanguigno cerebrale. Presley *et al* (2011) hanno misurato la perfusione cerebrale dopo aver fornito a un gruppo di adulti più anziani (~ 75 anni) una dieta ad alto contenuto di nitrati (~ 12 mmol) tra cui succo di bietola, o una dieta di nitrato impoverito (~ 0,09 mmol) per 24 ore. La risonanza magnetica (MRI) ha rivelato che la dieta ad alto contenuto di nitrati ha stimolato un notevole aumento della perfusione frontale della corteccia, una regione del cervello responsabile per processi cognitivi essenziali. Ulteriori lavori da parte di Bond *et al.* (2013) sostengono queste conclusioni, mostrando una diminuzione della resistenza arteriosa cerebrovascolare (indicativo di un aumento del flusso sanguigno cerebrale) a seguito di una singola porzione di succo di barbabietole (500 mL) ricco di nitrato. Tuttavia, è importante notare che i soggetti in questo studio erano giovani (~ 21 anni), asintomatici e apparentemente liberi da malattie, limitando l'applicazione di questi risultati in popolazioni anziane e malate.

Anche se gli studi clinici a lungo termine devono ancora essere condotti, due recenti studi preliminari hanno esplorato l'influenza della supplementazione acuta di barbabietola sulle funzioni cognitive legate all'età. In uno di questi studi soggetti di 67 anni diabetici tipo 2, nutriti con 250 ml di succo di barbabietola (nitrato: 7,5 mmol) per 14 giorni, hanno mostrato un significativo miglioramento dei tempi di reazione semplice rispetto ad un gruppo di controllo [Gilchrist *et al* 2014] . Tuttavia, senza effetti sono stati altri test cognitivi associati con il processo decisionale, l'elaborazione rapida, la forma e la memoria spaziale [Gilchrist *et al* 2014]. Un altro studio dello stesso gruppo [Kelly *et al* 2013] ha studiato gli effetti di un supplemento di succo di barbabietole (140 mL/die + 9.6 mmol nitrato) sulla funzione cognitiva in adulti anziani, sani (~ 63 anni). Dopo 3 giorni di supplementazione, non sono riusciti a rilevare eventuali cambiamenti nelle prestazioni cognitive per la concentrazione, la memoria, l'attenzione, l'informazione, la capacità di elaborazione tra il succo di barbabietola e condizione di controllo. Inoltre, una serie di metaboliti cerebrali associati con il funzionamento neuronale (N-acetilasparginato, creatina, colina e mio-inositolo) non erano, incrementati dopo l'assunzione di succo di barbabietola. I risultati un po' contrastanti tra questi due studi possono essere in parte spiegati dalle differenze nella coorte partecipante (diabetici di tipo 2 vs sani adulti più anziani), e dai test cognitivi impiegati. Ciò nonostante, gli aumenti dei tempi di reazione mediati da barbabietola rossa riportati da Gilchrist *et al* (2014) sono degni di ulteriori indagini, dati i potenziali benefici clinici per le popolazioni.

Di conseguenza , vi è spazio per ulteriori ricerche per indagare il ruolo potenziale di succo di barbabietola in funzione cognitiva a riposo e durante l'esercizio fisico.

In sintesi sulla base dei dati disponibili, la bietola rossa sembra essere una potente fonte alimentare di agenti di promozione della salute, potenzialmente utilizzabile come trattamento terapeutico per

diversi disturbi patologici. Il potere antiossidante, gli effetti anti -infiammatori e la protezione vascolare offerta da bietola rossa e dai suoi costituenti sono stati dimostrati da diversi studi in vitro e in vivo. Negli studi sugli esseri umani fino ad oggi, la supplementazione di barbabietola è stata segnalata per ridurre la pressione sanguigna, attenuare l'infiammazione, prevenire lo stress ossidativo, preservare la funzione endoteliale e ripristinare l'emodinamica cerebrovascolare [Lansley *et al* 2011; Cermak *et al* 2012].

Attività antitumorale

Le betalaine sono riconosciute nel fornire effetti antitumorali attraverso vari meccanismi; il primo meccanismo antitumorale, proposto è stato quello di un'interruzione nello scambio di metaboliti tra cellule tumorali e i tessuti circostanti, in modo tale da ostacolare la capacità di infiltrazione delle cellule tumorali [Reddy *et al* 2005].

Sreekanth *et al.* (2007) hanno indagato profondamente l'effetto anti-proliferativo della betanina, usato come colorante naturale (E162), sulla linea cellulare della leucemia mieloide cronica umana K-562, rilevando una diminuzione dose-dipendente e tempo dipendente della proliferazione cellulare del tumore; i loro esperimenti hanno anche rivelato che la betanina induce apoptosi attraverso la via intrinseca, mediata dal rilascio di citocromo-C da parte dei mitocondri e dalla scissione della Poly ADP-ribosio polimerasi (PARP).

Vulic *et al.* (2013) inoltre hanno dimostrato un'attività citotossica contro le cellule del carcinoma di Ehrlich, attraverso un esperimento che prevedeva un modello murino in cui sono state impiantate cellule di carcinoma di Ehrlich. La somministrazione dell'estratto di barbabietola, ricco di polifenoli e betalaine, era in grado di ridurre il numero di cellule di carcinoma e la quantità di ascite prodotta rispetto agli animali di controllo trattati con placebo.

Stabilizzazione delle betalaine

Tuttavia, a causa della scarsa stabilità delle betalaine, la loro potenziale applicazione per prodotti farmaceutici e cosmetici è gravemente compromessa. Vi è una mancanza di rapporti scientifici sulla stabilizzazione della betalaine come prodotti farmaceutici e cosmetici.

La Betanina (CEE n E162), approvata come colorante alimentare rosso dall'Unione Europea [Downham *et al* 2000], nella Sezione 73.40 nel capitolo 21 del codice dei regolamenti federali (CFR) della Food and Drug Administration (FDA) negli stati Uniti [Griffiths 2005], è stato per molto tempo utilizzato come colorante per prodotti alimentari, come ad esempio caramelle yogurt, gelati, condimenti per insalata, prodotti surgelati, miscele per torta, macianato di carne e salsicce, miscele di sugo, caramelle marshmallow, bibite e dolci di gelatina [Delgado-Vargas *et al* 2000]. Nella maggior parte delle applicazioni alimentari una quantità di 50mg/Kg bw di betanina potrebbe essere sufficiente per donare ai cibi il colore desiderato [Delgado-Vargas *et al* 2000]. Gli usi di betalaine sono però notevolmente ridotti a causa della scarsa stabilità, che pone un problema significativo quando paragonato con altri coloranti sintetici [Ozela, 2004]. Un elenco di fattori che riducono / migliorano la stabilità della betalaina è presentato in Figura 8 a.

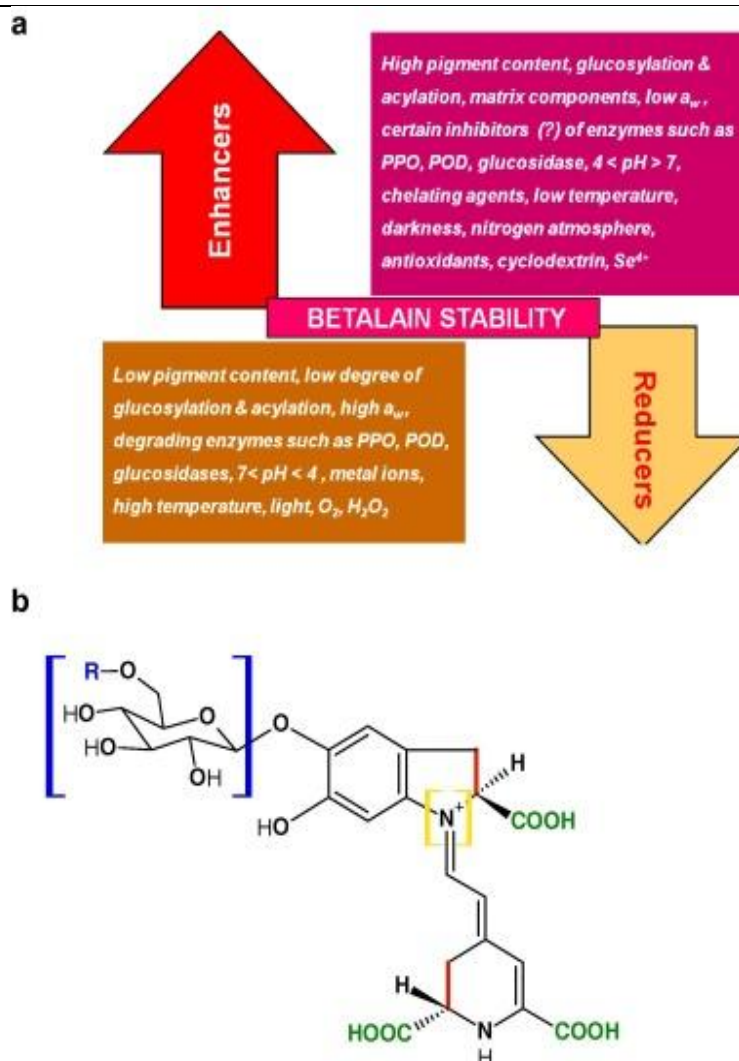


Figura 8. Grafico che indica i punti vulnerabili da tenere sotto controllo durante la purificazione delle betalaine e i siti di rischio di deglicosilazione. a) Fattori che influenzano la stabilità delle betalaine. b) siti a rischio di deglicosilazione (staffa blu), decarbossilazione (verde), deidrogenazione (rosso) e attacco nucleofilo (staffa giallo) in beta cianine. Aggiornato da Herbach, Stintzing, et al. (2006) e Manchali et al. (2013). PPO - polifenolo ossidasi, POD- perossidasi. [M.I. Khan 2016]

Manchali *et al* (2013) elencano i possibili cambiamenti che le betalaine possono subire durante la degradazione, come rottura del legame aldiminico, deidrogenazione, deglicosilazione, decarbossilazione e isomerizzazione (Fig. 2b). Per aumentare le applicazioni commerciali, dei pigmenti di betalaina bisogna rallentare questi cambiamenti attraverso tecniche di stabilizzazione. Esistono diversi modi di stabilizzare le betalaine fra cui troviamo: la formazione di un complesso, la copigmentazione e l'incapsulamento che sembrano essere tecniche promettenti.

Formazione del complesso betalaine-ioni metallici

Uno spostamento batocromico nell'assorbimento del colore è stato osservato, indicando la formazione del complesso di betalaine (soprattutto betanina) con ioni metallici, quali Cu^{2+} [Butera *et al* 2002; Kuusi *et al* 1977], Cu^{+} , Hg^{2+} [Kuusi *et al* 1977], Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} [Spórna-Kucab *et al* 2011], ed è stato confermato con l'aggiunta di EDTA, che potrebbe annullare le modifiche spettrali. Sembra che tali complessi riducano la stabilità del colore come nel caso di Fe^{2+} , Cu^{2+} [Khan *et al* 2014; Pasqua *et al* 1979; Spórna-Kucab *et al* 2011], e Ni^{2+} , Co^{2+} [Spórna-Kucab *et al* 2011]. D'altra parte, la β -ciclodestrina (β -CD) –complessate con betanina è stata segnalata per stabilizzare il colore [Hamburg *et al* 1991]. Questo effetto è stato attribuito all'assorbimento di acqua libera da β -CD. In assenza di luce e O_2 , sono state segnalate le β -CD per migliorare la stabilità di betalaina [Drunkler *et al* 2006]. Recentemente, è stato dimostrato che le β -CD formano un complesso di inclusione con betanina 1:1, dato confermato mediante spettroscopia IR e studi di diffrazione di raggi X [Norasiha *et al* 2009]. In particolare, il complesso di inclusione era chiaramente diverso da quella miscela 1:1 non inclusa in ciclodestrine. α , β , γ -CD sono oligosaccaridi contenenti da sei a otto residui di glucosio collegati da legami alfa-1,4-glicosidici. Queste macromolecole sono disposte in una forma toroidale in cui la cavità centrale è idrofobica, e la superficie esterna è idrofila con gruppi idrossilici esposti. È stato proposto che un farmaco/biomolecola può depositarsi nella cavità che forma un complesso di inclusione con CD [rivisto da Stella *et al*, 2008] (Figura 9), sia nella fase solida che nella soluzione.

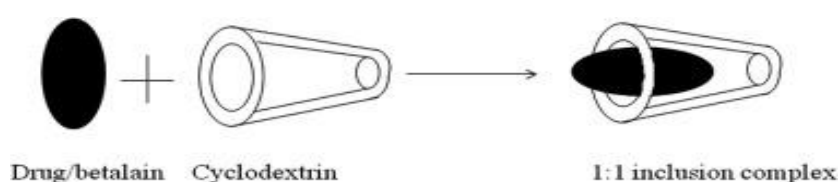


Figura 9. Legame farmaco-ciclodestrina in equilibrio 1:1 con i complessi di inclusione. [M.I. Khan 2016]

Le β -CD, idrossipropil- β -CD (HP- β -CD) e sulfobutylether- β -CD (SBE- β -CD), non sono tossiche in vivo. Pertanto, HP- β -CD e SBE- β -CD sembrano essere promettenti agenti stabilizzanti per prodotti contenenti betalaine. Inoltre, le β -CD migliorano la qualità sensoriale globale senza ridurre l'aroma del campione [Andreu-Sevilla *et al* 2011].

Recentemente, sono stati pubblicati alcuni interessanti studi che utilizzano matrici inorganiche come agenti stabilizzanti di betalaine. Lima *et al.* (2009) hanno studiato varie matrici, tra cui γ -

allumina, Mg-Alò, Mg, Zn-Alò, e zeolite per l'adsorbimento e il sequestro di betalaine. È stato osservato, attraverso sofisticati strumenti analitici, quali la spettroscopia NMR, che l'adsorbimento di Betalaine in γ -allumina potrebbe stabilizzare il pigmento per più di venti mesi attraverso l'interazione acido-base. In un altro studio, particelle di ceramica (tetraetilortosilicato, TEOS) sono state proposte per la stabilizzazione delle betalaine contro raggi UV [Estévez, Méndez, Vargas, García, e Rodríguez, n.d.].

Particelle di ceramica TEOS sono state segnalate per formare nuovi legami carbonile-ossigeno-silicio in condizioni acide con i gruppi carbonile di betalaine [Molina *et al* 2014]. Il nuovo complesso è relativamente più stabile a UV, pH e temperatura, apparentemente da tempra fotoni UV-Vis, ritardando cambiamenti strutturali delle betalaine a diversi pH, e dissipando il calore per mascherare l'effetto della temperatura sulle Betalaine. Il nuovo complesso è stato caratterizzato mediante spettroscopia FTIR, che ha rivelato la comparsa di una banda a 530 cm^{-1} , questo potrebbe essere indicativo di un segnale di vibrazione gruppo CO-Si in accordo con un'ipotetica struttura del nuovo complesso generato usando un programma software e simulando spettri IR. Come risultato della nuova formazione di strutture, c'era: spostamento o scomparsa di alcuni dei segnali corrispondenti al gruppo di acido carbossilico nel pigmento non modificato. Nel caso di estratto *Rivina humilis* Berry, un possibile complesso acido ascorbico-Se-betalaina è stato segnalato [Khan *et al* 2014]. Acidi fenolici, come l'acido gallico [Khan *et al* 2014], l'acido clorogenico, e flavanoidi come catechina, quercetina, e butilidrossianisolo si sono in passato visti sia nel non avere nessun effetto, sia nel ridurre la stabilità delle betalaine [Attoe *et al* 1985]. Al contrario, la stabilizzazione delle betalaine in presenza di flavonoidi è stata proposta in un brevetto [Tsai *et al* 2010]. Gli inventori hanno affermato che 0,005 M catechina era sufficiente a stabilizzare le betalaine in soluzione, e che dopo il trattamento termico durante la rigenerazione dei pigmenti si formava un complesso relativamente stabile con base di Schiff tra le betalaine e catechina. Tuttavia, questo studio ha alcuni inconvenienti come la concentrazione di pigmento non ben chiarita e di conseguenza anche la quantità di betalaine libere e del complesso betalaine- catechina non era ben chiaro. Questa informazione è importante, soprattutto perché la relativa abbondanza di ioni nella spettroscopia di massa era molto bassa. Inoltre, è stata utilizzata una sola concentrazione dello stabilizzatore. Inoltre la formazione del complesso è scarsamente supportata dai dati analitici. D'altra parte, le osservazioni possono essere causa di un fenomeno di copigmentazione, che non comporta necessariamente la formazione del complesso.

Copigmentazione tra beta cianine e altri pigmenti

Willstätter e Zollinger (1916) hanno scoperto il fenomeno della copigmentazione da pigmento di uva, (in seguito nominato come malvidina 3-glucoside), quando la sua tonalità cambiava in un rosso più blu, dopo l'aggiunta di tannino o di acido gallico. Più tardi, Maud e Robert (1931) hanno riportato lo stesso pigmento per la produzione di diverse tonalità di colore in diverse parti della pianta. La Copigmentazione comporta la formazione del complesso, diretta o mediante interazioni deboli tra antociani e altri composti naturali, provocando la formazione di una vasta gamma di colori. Copigmenti potrebbero essere i metalli, fenoli, alcaloidi, aminoacidi, acidi organici, nucleotidi, polisaccaridi, metalli, e antociani stessi [Mazza *et al* 1990]. Attraverso la copigmentazione, l'intensità del colore e la stabilità di antociani sono stati migliorati in modo naturale. L'aumento della intensità del colore di antociani è attribuita ad uno spostamento batocromico nel suo spettro di assorbimento e concomitante hyperchromaticity [Mazzaracchio *et al* 2004]. Nel caso di betalaine, stabilizzanti, come l'acido ascorbico, l'acido isoascorbico, e acido citrico, rimuovono O₂ dalla soluzione e riducono la polarità N - 1 posizione, che è suscettibile di attacco nucleofilo da acqua [Herbach *et al* 2006 e Kearsley *et al* 1980].

Inoltre glucosilazione a C-6 di betanidin sembra aumentare la resistenza cromatica del pigmento, come nel caso di gomphrena, a causa di una conformazione più rigida. Tuttavia, ulteriori glucosilazioni non possono migliorare la stabilità [Huang *et al* 1986]. Recentemente, è stato osservato che la presenza di Se e acido ascorbico sono in grado di migliorare la stabilità e l'intensità del colore (ipercromaticità) dovuto a un trasferimento batocromico dello spettro di assorbimento betanina da 535 nm a 544 nm nel succo di frutta *R. humilis* [Khan *et al* 2014]. È plausibile che i cambiamenti osservati possono essere attribuiti alla formazione di un acido ascorbico (copigment) coordinate complesso -Se-betanina simile a quella del complesso acido ascorbico metal-antocianine [Sarma *et al* 1997]. La matrice naturale di estratti vegetali contengono vari co-pigmenti che possono aiutare nella stabilizzazione e rigenerazione. Nel caso di succhi di frutta di cactus, l'autossidazione di Betalaine si è verificata meno nella matrice [Meri *et al* 1987], il trattamento termico ripetuto non ha comportato significativa decolorazione o imbrunimento non enzimatico [Mosshammer *et al* 2005], e inoltre c'era una sorta di effetto sinergico sulla stabilità delle Betalaine osservate in presenza della matrice di succo e additivi rispetto al campione privo di matrice [Herbach *et al* 2006; Mosshammer *et al* 2007; Skopinska *et al* 2015]. Risultati simili sono stati ottenuti nel caso di *R. humilis* betaciani succo di bacche e betaciani parzialmente purificati [Khan *et al* 2014]. Gli autori riportano inoltre che, in presenza di acido ascorbico e selenio, la stabilità di betaciani era molto migliorata a 5 ° C e 90 ° C. Il profilo spettrale di betaciani parzialmente purificati acquisiti prima e

dopo il trattamento termico a 90 ° C, o la conservazione a 25 ° C per circa 3 settimane, ha rivelato un cambiamento batocromico di 9 nm nell'assorbimento della betanina, indicando la possibilità di formazione del complesso [Khan *et al* 2014].

Questo ha dimostrato che, oltre alla stabilizzazione, pigmenti / stabilizzatori possono realizzare la trasformazione chimica del pigmento con interventi semplici, come il trattamento termico. In una matrice alimentare complessa formulata con succo *R. humilis* bacche come colorante naturale in presenza di acido citrico e sodio benzoato come conservanti, la conservazione del colore era ~68% dopo 6 mesi di conservazione a 5 ° C [Khan *et al* 2015]. Questo era paragonabile alla conservazione e stabilità della betalaina nel succo di bacche *R. humilis* durante la frigoconservazione, suggerendo in tal modo l'idoneità di betalaine come colorante in una matrice alimentare complessa. La maggior parte di questi studi ha indicato una migliore stabilità di Betalains in una matrice di succo rispetto ai pigmenti purificati con o senza stabilizzanti aggiunti esternamente. Ulteriori studi sono necessari sui pigmenti di betalaine in un prossimo futuro per valutare se la stabilizzazione delle betalaine influenza la biodisponibilità dei pigmenti.

Incapsulamento di betalaine in varie matrici

L'incapsulamento è stato studiato negli ultimi tempi come un metodo per stabilizzare, migliorare la biodisponibilità e la facilità di gestione di polifenoli [Fang *et al* 2010; Krishnaiah *et al* 2014]. Nell'industria alimentare, l'incapsulamento è effettuato impiegando la tecnologia spray-drying; è economico, flessibile, può essere azionato in continuo, e produce capsule di buona qualità. Il processo è tipicamente usato per produrre fitochimici incapsulati che sono asciutti, stabili e utilizzati come coloranti alimentari, additivi e aromi. Il processo prevede la miscelazione del materiale di base con un materiale della parete / rivestimento. La miscela omogeneizzata di materiale del nucleo e materiale della parete viene immessa in un essiccatore a spruzzo. Attraverso un ugello, goccioline atomizzate vengono strippate, l'acqua nelle goccioline evapora facendo circolare aria calda, e capsule sferiche di dimensioni medie comprese fra di 10-100 micron [Fang *et al* 2010]. Per quanto riguarda l'incapsulamento di betalaine, è stato suggerito che l'uso di polisaccaridi, come la pectina, gomma guar o come materiali per ridurre l'igroscopicità, aumentando così la stabilità [Lejeune *et al* 1983]. Ulteriori esplorazioni in questo settore sono state fatte nel 2000 in cui betaciani *Amaranthus* sono stati incapsulati [Cai *et al* 2000] utilizzando maltodestrina (MDE, 10-25 destrosio equivalente), e amido nativo / modificato come l'agente di rivestimento in una miscela di alimentazione del 20 % di solidi totali. Essi hanno osservato che la

temperatura di ingresso superiore ($> 180\text{ }^{\circ}\text{C}$) causava maggiore perdita di asciugatura ($> 4\%$) di pigmento e ridotta stabilità allo stoccaggio. Gli autori hanno raggiunto una stabilità di stoccaggio superiore di pigmenti incapsulati con MDE di destrosio equivalenza mista (DE) basata sulla constatazione che c'è stata una perdita del 10-16% di colore, che era relativamente meno, per un periodo di conservazione di quattro mesi. È stato confermato da incapsulamento con MDE (10 DE) di *Opuntia lasiacantha* Pfeiffer (pera rossa d'India) betanina estratto, con una conseguente perdita di solo il 14% per un periodo di conservazione al riparo dalla luce e con $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ [Díaz *et al* 2006]. Nel caso di betalaine barbabietola rossa, incapsulamento protetto i pigmenti in modo indipendente di concentrazione MDE, limitando in tal modo il degrado di solo il 10% nel corso di sei mesi di conservazione a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ [Azeredo *et al* 2007]. Queste osservazioni sono state ulteriormente supportate da risultati simili ottenuti da diversi ricercatori [Obón *et al* 2009; Saénz *et al* 2009]. Saenz *et al.* (2009) hanno riportato che indicaxanthin in estratto incapsulato era più stabile di betacyanin a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ciò è stato confermato da Gandía-Herrero *et al* (2010) che hanno incapsulato indicaxanthin purificata con successo con MDE (20%, w / v) per stabilizzare il pigmento senza compromettere l'intensità del colore. Essi hanno osservato che non vi era alcuna perdita significativa di pigmento incapsulato durante la conservazione al buio a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per più di sei mesi. Dalle relazioni di cui sopra emerge che la stabilità del pigmento incapsulato dipende dal tipo di pigmento viz. betaciani o betaxanthins. Inoltre, questi rapporti sottolineano il fatto che l'incapsulamento ha una grande promessa per le betalaine igroscopiche e poco stabili di ampliare le sue applicazioni commerciali attraverso la stabilizzazione. A questo proposito, Pietrzkowski e trebbiatrice (2010) hanno brevettato una formulazione di MDE (20%) ed estratto rosso barbabietola essiccata con il 15% (w / w) betalaine in un prodotto scorrevole contenente 5% (w / w) betalaine che era stabile e altamente solubile in acqua. A parte MDE, gomma arabica è stata utilizzata anche come agente incapsulante [Pitalua *et al* 2010]. C'è la possibilità di inserimento di alcuni additivi che possono conferire una migliore funzionalità di pigmenti incapsulati di betalaina come riportato da Chik *et al* (2011). Ci sono fonti di betalaine, come *Basella rubra* e *Opuntia* frutti ficus-indica, che contengono sostanze gommose naturali, che se estratto e / o ricostituita con pigmenti, possono agire come agente intrinseca per la stabilità così come il valore-aggiunto di imprimere bioattività, come ad esempio la disintossicazione, la digestione (USDA SR23, 2010) e il miglioramento dei parametri ematologici [Bamidele *et al* 2010], che hanno bisogno di ulteriori indagini. La mucillagine cactus cladodi mescolato con MDE (DE 20) potrebbe anche essere un agente incapsulante [Otàlora *et al* 2015] con i valori funzionali della mucillagine [El-Mostafa *et al* 2014]. Gelatina-MDE [Castro-Munoz *et al* 2014] e Capsul® [Vergara *et al* 2014] sono stati testati anche per migliorare l'efficienza di incapsulamento, ritenzione di pigmento, stabilità allo stoccaggio e l'attività antiossidante delle

microparticelle. Qualunque sia la strategia utilizzata per mantenere il pigmento durante lo spray-drying, la polvere di betalaina trasformata dovrebbe essere accettabile per i consumatori. Tuttavia, un recente rapporto indica scarsa risposta dei consumatori, se la stabilità di stoccaggio a temperature era fino a 20 ° C [Kaimainen *et al* 2015].

Spray-drying nella preparazione di betalaine in polvere

Di tutti i processi di essiccazione, spray-drying prevede un tempo di asciugatura molto breve. Il tempo di essiccazione di goccioline dalla poltiglia è determinata dai parametri operativi, come portata, velocità della pompa, velocità di aspirazione e temperatura di ingresso. Dopo aver esaminato la letteratura sul incapsulamento di betalaina, le condizioni ottimali per atomizzazione di MDE (DE ~ 20) estratto + betalaina / betalaina-ricchi sono: miscela di alimentazione (~ 20% di solidi totali), betalaine: MDE (1: 3), temperatura di ingresso, 140-150 ° C; temperatura di uscita, 65-70 ° C; velocità di avanzamento, 4-5 ml / min; flusso d'aria, 5-6 l / min; essiccazione flusso d'aria, 40-45 m³ / h oppure 20 psi. Con questa operazione, la resa di pigmento incapsulato potrebbe essere ovunque tra 90-98% e con un contenuto di umidità inferiore al 5%. Il contenuto di umidità o il valore *a_w* è direttamente correlata alla scissione del legame aldimine di betalaine come *a_w* aumenta la mobilità dei reagenti e solubilità dell'ossigeno così come attacco nucleofilo al N -. 1 [Herbach *et al* 2006; Herbach *et al* 2006; Kearsley *et al* 1980]. Pertanto, il valore *a_w* deve essere inferiore a 0,6 per migliorare la stabilità della betalaina [Kearsley *et al* 1980]. Il contenuto di resa e di umidità di polvere di betalaina atomizzata sembra diminuire con l'aumento della temperatura di ingresso. Compromettendo l'efficienza del processo di essiccazione e la stabilità dei pigmenti di betalaina, Gandía-Herrero *et al* (2013) hanno dimostrato che sarebbe possibile incapsulare con successo betanidin e co-incapsulare la miraxanthin V. Per carotenoidi, come ad esempio beta-carotene e bissina, 62% [Desobry *et al* 1997; Loksuwan *et al* 2007], e il 54% [Barbosa *et al* 2005] sono stati riportati i rispettivi rendimenti: per incapsulamento di antocianine i valori vanno dal 80% al 97% [Ferreira *et al* 2009], e da 65% a 93% in presenza di additivi, come gomma di acacia e fosfato tricalcico, sono stati segnalati [Nayak *et al* 2010]. Allo stesso modo, il recupero di betalaina dopo atomizzazione potrebbe essere migliorato utilizzando MDE mescolato con gomma xantana come agente incapsulare [Ravichandran *et al* 2014]. Gli autori hanno anche osservato che, rispetto all'atomizzazione, la liofilizzazione è stata più efficace nel migliorare il recupero di betalaine dopo l'incapsulamento. Tuttavia, ci sono solo alcuni rapporti relativi alla liofilizzazione di Betalaine. Questa è un'area importante da esplorare perché la liofilizzazione potrebbe essere il metodo

migliore per la disidratazione di succo di frutta e alimenti senza compromettere il colore e valore nutritivo fornito dalla matrice. Nel 2009, la domanda mondiale di coloranti alimentari era 45,000-50,000 tonnellate [Manchali *et al* 2013] e si può ritenere che circa il 10% della domanda è stata soddisfatta dalle betalaine ottenute dalla barbabietola rossa [Hilpert *et al* 2007]. I recenti sviluppi dei metodi per la stabilizzazione e la produzione di polvere di betalaina a flusso libero aiuteranno a rivendicare una quota maggiore nel mercato dei coloranti naturali per le applicazioni nei settori: alimentare, farmaceutico e cosmetico.

Scopo della tesi

Il presente lavoro è stato intrapreso per dimostrare se i composti fitochimici di maggiore interesse presenti nella bietola rossa e nella bietola verde potevano formare un fitocomplesso sinergico con marcata attività chemio preventiva ed in particolare con effetto antitumorale. I composti fitochimici più interessanti sono stati selezionati sulla base di studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio, per quanto riguarda la bietola verde e nei laboratori di Luisa Tesoriere (presso l'Università di Palermo) per quanto riguarda la bietola rossa. Più precisamente tra le molecole bioattive presenti nelle due cultivar sono state scelte la Vitexin-2-O-xyloside, che è il flavonoide più interessante tra quelli presenti nella bietola verde, e le betalaine, ovvero betaxantine e betacianine tra le molecole presenti nella bietola rossa. Lo studio si avvantaggiava del fatto che la Vitexin-2-O-xyloside veniva purificata regolarmente nel nostro laboratorio con una procedura collaudata, mentre per le betalaine bisognava individuare un metodo di isolamento completamente nuovo, che separasse le beta cianine dalle beta xantine e che fosse in grado di fornirne una quantità di vari mg per eseguire tutti gli studi richiesti. In letteratura infatti sono presenti soprattutto metodi separativi idonei per la purificazione di piccolissime quantità di prodotto, chiaramente insufficienti per gestire la fase di esperimenti con le molecole singole e in combinazione con la Vitexin-2-O-xyloside. La purificazione delle betalaine e l'isolamento delle beta xantine dalle beta cianine è stato eseguito partendo da un estratto di bietola rossa, cultivar Detroit. La cultivar è stata selezionata dopo uno screening di diverse varietà in cui si è evidenziata la netta superiorità in termini di concentrazione di betalaine della cultivar Detroit rispetto alle altre.

Oltre alla parte purificativa, lo scopo della tesi era quello di individuare le linee tumorali più vulnerabili all'effetto citotossico delle molecole in esame, usate singolarmente e in combinazione. Sulle linee tumorali più sensibili ci si proponeva di indagare i meccanismi molecolari che giustificano l'effetto anti-proliferativo o citotossico e/o pro-apoptotico. Gli strumenti a nostra disposizione per raggiungere questo obiettivo erano i primers per RTqPCR per l'amplificazione di geni coinvolti nei processi di cancerogenesi umana, dopo aver verificato, tramite strumenti bioinformatici (come il programma BLAST) che i primers fossero i più adatti per i nostri studi. Insieme ai primers per RTqPCR sono stati utilizzati degli anticorpi monoclonali specifici per le proteine di segnale di maggiore interesse per lo studio delle vie apoptotiche. L'obiettivo era quello di intercettare e quantificare tutti i principali markers molecolari che potevano descrivere il fenomeno chemio preventivo nella sua globalità.

Tutto questo background di risultati nelle nostre intenzioni poteva rappresentare una base sufficiente per potere passare alla sperimentazione *in vivo* delle nostre molecole naturali.

MATERIALI E METODI

Estrazione di Betalaine

Per l'estrazione delle betalaine si è partiti dalla radice di bietola *Rossa Beta vulgaris Rubra*. Le foglie nonostante contengano notevoli quantità di betalaine sono state eliminate in quanto l'elevata presenza di clorofilla potrebbe inficiare le operazioni di estrazione. La radice, compresa di buccia e petiolo, è stata lavata, asciugata e immersa per 5 minuti in una soluzione composta da etanolo 70%, 10mM Na-acetate buffer, EDTA 0.01% in pH 5.0, per prevenire l'eventuale ossidazione derivante dalle operazioni meccaniche di sminuzzamento. Trascorsi i 5 minuti la radice è stata grattugiata per poi procedere con un'estrazione solido liquido (1:10w/v) con etanolo 70% , EDTA 0.01% in pH 5.0 per 2 ore al buio a 4-6°C con agitatore magnetico. Terminate le 2 ore l'estratto è stato filtrato e concentrato con rotavapor fino al raggiungimento del 10% del suo volume iniziale. L'estratto è stato poi essiccato tramite savant, per poi essere conservato a -20°C fino al suo utilizzo.

Middle Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

La purificazione dei composti dall'estratto liofilizzato è avvenuta con due passaggi cromatografici consecutivi mediante cromatografia su colonna, utilizzando pompe che lavorano a pressioni prossime ad 1 atm.

La prima cromatografia utilizzava come fase stazionaria la resina a scambio anionico DEAE fast flow (GE Healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Sweden) paccata su colonna di vetro (5x30cm) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO), per l'eluizione delle molecole di interesse è stata utilizzato un gradiente di NaCl da 0 a 0.5M in 10mM di Na-phosphate buffer pH 7.5. Durante tutta la durata della corsa cromatografica la colonna cromatografica è stata ricoperta con carta alluminata per evitare che lo stress luminoso potesse rovinare la composizione delle frazioni. Il flusso in uscita è stato seguito analizzandolo mediante spettrofotometria, ottenendo frazioni riunite successivamente in gruppi denominati R e numerati, letti allo spettrofotometro (KONTRON UVITRON 930) a due lunghezze d'onda: 480 nm per la quantificazione delle BX e 540nm per le BC. Si è poi passati a stabilire la concentrazione di ogni riunito ottenuto tramite il calcolo del coefficiente di estinzione molare $\epsilon=1120$ per la Betaxantina e $\epsilon=750$ per la Betacianina.

Per favorirne la stabilizzazione, dopo lettura spettrofotometrica le frazioni R1, R2 e R3 sono state portate ad un pH di 5.5, liofilizzate e mantenute a -20°C fino al successivo step cromatografico. Dato l'elevato contenuto di NaCl nelle frazioni R1, R2, R3, si è reso necessario un secondo step cromatografico con gel filtrazione.

La seconda cromatografia è stata eseguita tramite ÄKTApurifier 10, la resina utilizzata è stata la sephadex G®-10 paccata su colonna di vetro (1x 55 cm) (Supel co, St.Louis, MO), mantenendo la fase mobile di acqua bidistillata in isocratica. Allo strumento cromatografico era collegato un rilevatore di assorbanze impostato a lunghezza d'onda fissa di 480, 540 e 330 nm oltre che un conducimetro per rilevare la presenza dei sali nelle singole frazioni eluite. Dal caricamento della frazione R1 sono stati ottenuti 3 picchi R1A, R1B e R1C, per la frazione R2 sono stati ottenuti 2 picchi, R2A e R2B, per la frazione R3 sono state ottenute 3 frazioni R3A, R3B e R3C.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Le frazioni ottenute nei precedenti steps cromatografici sono state analizzate in HPLC/DAD (High-performance liquid chromatography with photodiode array detection) per valutare l'effettiva purezza dei riuniti, come riportato da [Lee *et al* 2013], è stata usata una colonna analitica (Spherisorb ODS 2, Waters, 4.6x250mm, 5 µm). Il solvente A usato è stato l'acqua, il B metanolo, entrambi contenenti 0.01% acido acetico; il gradiente programmato come segue: da 0 a 60% solvente B in 45 min al flusso 1 ml/min, poi fino al 100% B per 5 minuti. Gli standard e i campioni sono stati iniettati al volume di 20 µl.

L'HPLC-MS (HPLC accoppiata a spettrofotometria di massa) è stata utilizzata per l'identificazione delle betalaine nei picchi R1,R2 e R3 come riportato in letteratura da Gasztonyi *et al.* (2001), utilizzando una colonna Alltima C18 (250x4.6mm) 5µm - T 30°C con fase mobile metanolo/NaH₂PO₄ 0.01M pH 4 (20:80 v/v); il volume d'iniezione era di 20 µl e il flusso di 1 ml/min; i composti sono stati identificati analizzando il rapporto m/z degli ioni molecolari e i tempi di ritenzione, acquisendo i dati in modalità positiva o negativa a seconda del segnale di fondo.

Dosaggio dei polifenoli

Il contenuto polifenolico totale (TPC) dall'estratto di bietola rossa è stato determinato utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu, secondo il metodo descritto da Singleton [Singleton *et al* 1999]. Il reattivo Folin-Ciocalteu è una miscela ossidante costituita da acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico. In tale metodo si sfrutta una reazione di ossido riduzione in cui il Folin, agente ossidante, reagisce con i gruppi ossidrilici dei composti fenolici presenti nel campione, producendo un viraggio della miscela di reazione verso il blu.

L'intensità di colorazione blu è direttamente proporzionale alla concentrazione dei composti fenolici. I campioni, sono stati opportunamente diluiti prima del dosaggio.

In eppendorf sono stati aggiunti nell'ordine: 75 µl di acqua distillata, 25 µl di campione diluito, 50 µl di reattivo di Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Milano, Italia). La soluzione è stata miscelata con il vortex e lasciata a temperatura ambiente per 3 minuti. Trascorsi i 3 minuti, sono stati aggiunti nell'ordine: 300 µl di carbonato di sodio saturo (Na₂CO₃) e 550 µl di acqua distillata, arrivando ad un volume finale di 1ml.

La miscela è stata poi vortexata e lasciata a temperatura ambiente per 30 minuti. La soluzione è stata poi centrifugata per 12 min a 3000 rpm, per far precipitare il carbonato di sodio. È stato poi prelevato 1 ml di soluzione che è stato versato nelle cuvette scanalate. La lettura dei campioni è stata effettuata allo spettrofotometro UV-vis a 725 nm (spettrofotometro Kontron Instruments, Milano), contro un bianco costituito solo dai reattivi di reazione.

Il dosaggio è stato eseguito sempre in triplo su 3 diverse concentrazioni di campione (25,50 e 100µl). Il contenuto totale dei polifenoli è stato calcolato secondo la seguente formula:

$$(\Delta \text{ netto} \times A \times B) / 126000 = \text{mg/ml}$$

$$\text{mg/ml} \times K = \text{mg/g di estratto}$$

dove: Δ netto era la differenza di assorbanza campione-bianco, A era l'eventuale diluizione del nostro campione, B era la diluizione in cuvetta (40 per 25µl, 20 per 50µl e 10 per 100µl). K era il rapporto tra gli ml di soluzione ed i grammi di estratto etanolic. Il fattore 126000 è stato calcolato tramite curva di taratura dell'acido caffeico, utilizzato come standard di riferimento. La concentrazione dei polifenoli è stata quindi espressa in mg di equivalenti di acido caffeico per grammi di estratto etanolic.

Dosaggio dei Flavonoidi

Il dosaggio dei flavonoidi è stato effettuato utilizzando il metodo colorimetrico descritto da Eberhardt [Eberhardt *et al* 2000]. I campioni sono stati diluiti prima del dosaggio.

In eppendorf sono stati aggiunti nell'ordine: 250µl di campione, 1 ml di acqua distillata, 75µl di 5% NaNO₃. La soluzione è stata miscelata con il vortex e lasciata a temperatura ambiente per 6

minuti. Successivamente son stati aggiunti 150 μ l di 10% di tricloruro di alluminio AlCl₃*6 H₂O. La soluzione è stata vortexata e mantenuta a temperatura ambiente per 5 minuti.

In fine sono stati aggiunti 500 μ l di NaOH 1M e 525 μ l di acqua distillata, arrivando così ad un volume finale di 2.5 ml. La miscela è stata opportunamente agitata e immediatamente letta allo spettrofotometro UV-vis a 510 nm (spettrofotometro Kontron Instruments, Milano). La lettura è stata effettuata contro un bianco. Costituito solo dai reattivi di reazione.

Il dosaggio è stato eseguito sempre in doppio, su due diverse concentrazioni del campione (250 μ l, 125 μ l).

Il contenuto totale dei flavonoidi è stato calcolato con la seguente formula:

$$(\Delta \text{ netto} \times A \times B) / 31493 = \text{mg/ml}$$

$$\text{mg/ml} \times K = \text{mg/g di estratto}$$

dove: Δ netto era la differenza di assorbanza campione-bianco, A era l'eventuale diluizione del nostro campione, B era la diluizione in cuvetta. K era il rapporto tra gli ml di soluzione ed i grammi di estratto etanólico.

Il fattore 31493 è stato calcolato utilizzando la curva di taratura della catechina, utilizzata come standard di riferimento. La concentrazione dei polifenoli è stata quindi espressa in mg di equivalenti di catechina per grammi di estratto etanólico.

Determinazione della capacità antiossidante mediante il metodo ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity)

Il test ORAC [Prior *et al* 2004] misura la capacità *scavenging* (cioè l'attività antiradicalica) degli antiossidanti di un campione alimentare o biologico verso i radicali perossidici (ROO[•]), che sono una delle più comuni specie reattive dell'ossigeno (ROS) presenti nell'organismo e sono importanti composti intermedi nel danneggiamento di molecole organiche funzionali come proteine, lipidi, carboidrati, DNA, RNA. Questo test si basa sul danno che i radicali liberi apportano ad un marker fluorescente, misurando la variazione dell'intensità della fluorescenza nel tempo.

In presenza di un antiossidante, l'inibizione del danno da radicali liberi si riflette nella protezione verso la riduzione della fluorescenza del marker. I composti antiossidanti, infatti, interagendo per

primi con i radicali liberi, prevengono l'interazione con il marker fluorescente e di conseguenza riducono la perdita dell'intensità della fluorescenza.

Il radicale che viene testato è il perossidico, la cui struttura schematica è R-O-O·. Il composto chimico che lo genera è l'AAPH (2,2 azobis (2-amidinopropano) diidrocloreuro), che alla temperatura di 37°C forma i radicali perossidici ROO· tramite decomposizione termica spontanea, perdita di una molecola di azoto e ossidazione, per reazione con l'O₂ di una soluzione di aria satura.

Il rapporto molare tra AAPH/antiossidanti è molto elevato (> di 2'000), quindi questo crea un'elevata specificità e permette di misurare direttamente la capacità di un campione di inattivare i radicali liberi. Il marker fluorescente maggiormente adottato e diffuso è la fluoresceina.

La riduzione della fluorescenza viene calcolata in relazione al tempo e rispetto ad un bianco in cui non è stato aggiunto il campione da testare, ma solo il solvente. Il fatto di utilizzare la misurazione della fluorescenza come parametro per determinare l'attività non dà i problemi di interferenza che derivano dall'assorbanza di composti colorati, usati in altri metodi. Questo è molto importante per le analisi di frutta e verdura, che contengono sostanze naturali che possono interferire perché formano soluzioni colorate [Ninfali *et al* 2005].

Procedura ORAC

Reagenti:

- Tampone Fosfato: 0.075 M, pH 7.0.
- AAPH: Preparare una soluzione 0.33 M.
- Fluoresceina: diluire la soluzione 0.06 M (*stock solution 1*) fino ad ottenere la soluzione 0.06mM (*stock solution 2*). Per una piastra da 96 completa diluire 480µl di fluoresceina in 30 ml di Tampone Fosfato. Questa soluzione va preparata fresca al momento dell'uso.
- Trolox: diluire la soluzione 1 mM fino ad ottenere le soluzioni 100, 50 e 25 µM.
- Campioni: le diluizioni dei campioni (3 per campione) vengono calcolate in base al dosaggio dei polifenoli fatte precedentemente.

Strumentazione:

- Spettrofluorimetro

Procedura di caricamento:

Pipettare nei pozzetti nell'ordine (Tabella 5):

- 20µl di campione o standard o Tampone Fosfato (Bianco). Per ciò che riguarda lo standard, il Trolox utilizzare le concentrazioni 100 µM, 50 µM, 25 µM per ottenere la curva di taratura
- 200µl di Fluorescina *Stock solution 2* preincubata a 37°C.

L'iniettore automatico dello strumento deve essere impostato per caricare in ciascun pozzetto 80µl di AAPH solution.

Tabella 5. Esempio di uno schema di caricamento della piastra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp
B	Tamp	C1:50	C1:50	C1:50	C1:50	C1:50	C1:50	T100	T50	T25	Bianco	Tamp
C	Tamp	C1:50	C1:50	C1:50	C1:50	C1:50	C1:50	T100	T50	T25	Bianco	Tamp
D	Tamp	C1:100	C1:100	C1:100	C1:100	C1:100	C1:100	T100	T50	T25	Bianco	Tamp
E	Tamp	C1:100	C1:100	C1:100	C1:100	C1:100	C1:100	T100	T50	T25	Bianco	Tamp
F	Tamp	C1:150	C1:150	C1:150	C1:150	C1:150	C1:150	T100	T50	T25	Bianco	Tamp
G	Tamp	C1:150	C1:150	C1:150	C1:150	C1:150	C1:150	T100	T50	T25	Bianco	Tamp
H	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp	Tamp

Tamp: tampone fosfato

T25-T50-T100: Trolox 25,50, 100 µM.

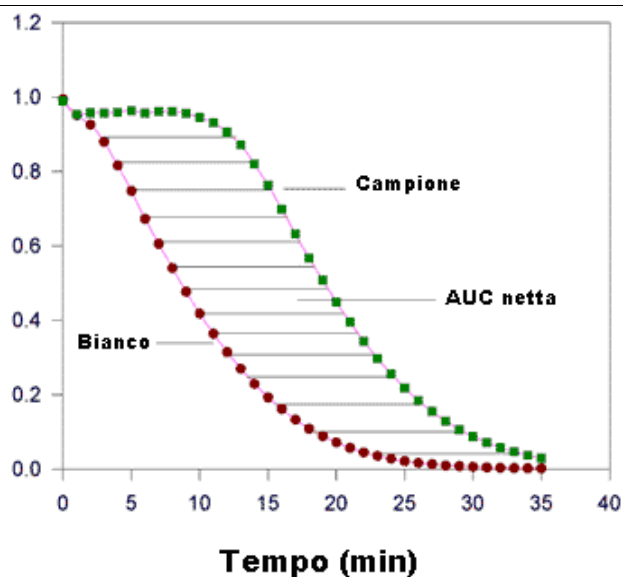


Figura 10. Attività antiossidante di un campione testato espresso come area netta sotto la curva.

Le due curve (Figura 10) rappresentano la riduzione della fluorescenza nel tempo. Quella più esterna verde è data dal campione, mentre quella interna rossa dal suo solvente. La differenza tra le aree racchiuse dalle due curve (parte tratteggiata in blu) rappresenta l'attività del campione. Naturalmente il campione presenta una pendenza della curva meno ripida e racchiude un'area maggiore, perché la presenza di antiossidanti che interagiscono con i radicali perossidici rallentano l'interazione con il marker fluorescente e quindi la sua perdita di fluorescenza.

La determinazione con un unico valore, sia della percentuale di inibizione della formazione di radicali, sia della durata dell'inibizione, è rilevante soprattutto perché fornisce un dato completo dell'attività del campione. Altri metodi misurano soltanto uno dei due parametri: o la percentuale di inibizione ad un determinato tempo o la durata del tempo di inibizione ad una percentuale di inibizione prefissata.

Il calcolo dei valori ORAC si esegue determinando l'area sotto la curva (AUC) (Figura 11) nel seguente modo:

$$\text{AUC} = 0.5 + F1/F0 + F2/F0 + F3/F0 + \dots + Fn/F0$$

Valore ORAC relativo = $[(AUC \text{ campione} - AUC \text{ bianco}) / (AUC \text{ standard} - AUC \text{ bianco}) \times (\text{molarità dello standard} / \text{molarità del campione})]$

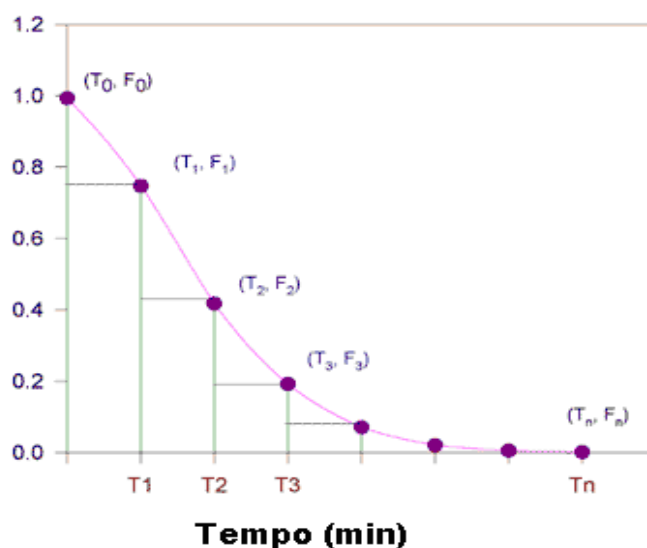


Figura 11. Misurazioni (intensità fluorescenza e tempo) e calcoli per arrivare ai valori ORAC.

Il test ORAC, attraverso l'espressione dei risultati con specifiche unità di misura, consente di fare confronti con dati di letteratura, anche rispetto ad alimenti come frutta e verdura e soprattutto consente di fare riferimento a dosi consigliate per una buona protezione giornaliera.

Il test ORAC quindi si conferma come mezzo per l'analisi quantitativa e la comparabilità di prodotti vegetali costituiti da miscele chimiche complesse.

Dosaggio delle betalaine

la quantità di betalaine estratte dal campione di partenza e dalle frazioni R1 e R2 è stata valutata leggendo l'assorbanza a 540nm e 480 nm ed utilizzando il coefficiente di estinzione molare $\epsilon_{1\%} = 1120$ per le beta cianine e $\epsilon_{1\%} = 750$ per le betaxantine [Nilsson 1970].

L'isolamento delle singole molecole è risultata però difficile in quanto in natura esistono più di 50 forme diverse di betalaine. Pertanto si è proceduto al raggruppamento di molecole simili tra di loro in base al colore delle frazioni dei picchi ottenuti.

Spettrofotometria di assorbimento molecolare

La spettrofotometria di assorbimento è una tecnica strumentale d'indagine che fornisce importanti informazioni sulla natura e su altri importanti parametri di composti organici e inorganici. Essa consiste nel far interagire una radiazione luminosa con la materia in esame e nel misurare l'entità dell'assorbimento relativo a una ben precisa lunghezza d'onda oppure, come nel nostro caso, a lunghezze d'onda comprese nella zona dello spettro più o meno ampia delle onde elettromagnetiche.

La spettrofotometria UV-VIS è in grado di lavorare tra 200 e 780nm.

Dal momento che le molecole con cui abbiamo lavorato, avevano una λ max di 480 e 540 nm, rispettivamente per le betaxantine e betacianine, abbiamo effettuato sia letture a lunghezza d'onda fissa per la quantificazione (insieme al coefficiente di estinzione molare) delle becianine e betaxantine all'interno dei riuniti R1, R2 e R3, che scansioni spettrofotometriche in assorbimento, in un range di lunghezza d'onda compreso fra 250 e 700 nm.

Estrazione del flavonoide Vitexina-2-O-Xyloside (XVX)

L'estrazione del flavonoide Vitexina-2-O-Xyloside è stata fatta da semi di bietola verde (*Beta vulgaris ssp Cicla*). Nel dettaglio, 200 g di semi (Suba e Unico, Cesena, Italy) sono stati polverizzati in mixer e immediatamente estratti con etanolo 70% (1:4 w/v) a 60°C per 1 ora, al fine di bloccare l'azione di enzimi, quali le perossidasi. Successivamente l'estrazione è continuata all'interno della camera di espansione dell'estrattore Timatic[®] (tecnolab, Spello, Italy) con etanolo 70% per 2 ore. L'estratto è stato centrifugato a 15.000 rpm per 30 minuti e concentrato con evaporatore rotante (Buchi, Milano, Italy) fino a 1/10 del volume iniziale. Con l'ausilio di un'imbutto separatore, i flavonoidi d'interesse sono stati estratti due volte con etilacetato 1:10 w/v e l'estratto è stato poi tirato a secco in evaporatore rotante Savant.

Middle Pressure liquid Chromatography (MPLC) per XVX

La purificazione dei composti dall'estratto in etilacetato è avvenuta con 2 passaggi cromatografici consecutivi mediante cromatografia su colonna, utilizzando pompe che lavoravano a pressioni prossime a 1 atm.

Per il primo step cromatografico si è utilizzata come fase stazionaria la resina Diaion HP-20 su colonna di vetro (150 x 55 mm), mantenendo la fase mobile in etanolo 30% in isocratica. Da questa cromatografia sono state ricavate 2 frazioni: il picco A e il picco B. Solamente il picco B conteneva la molecola di interesse.

Il picco B è stato quindi ulteriormente purificato su resina Davisil C18 su colonna di vetro (30x1.5cm), con un gradiente di acido formico 0.5% (tampone A) ed etanolo (tampone B). Il gradiente si sviluppava come segue: da 0%B a 17% B in 135min; 17% B isocratica per 60 minuti; da 17% B a 40% B in 256 min. il flusso era di 1 ml/min e le frazioni sono state lette allo spettrofotometro a 320 nm.

HPLC-ESI-MS

Le frazioni cromatografiche ottenute nei precedenti Step cromatografici sono state analizzate con tecnica HPLC-ESI-MS. Lo strumento presentava il seguente equipaggiamento: due micro pompe serie 200 per HPLC (Perkin Elmer, Norwalk, CT) interfacciate su spettro di massa API 150 EX (Applied Biosystems, Foster City CA) con sorgente ESI. La separazione è stata ottenuta su colonna cromatografica Altech Altima C18 (150 x 4.6 mm ID) con particelle da 5 µm di diametro e con pre-colonna Altech C18 (7.8 x 4.6 mm ID) (Grace Davison, Deerfield, IL). Il volume iniziale era di 20 µl e il flusso di 1ml/min, splittato a 0.2 ml/min alla sorgente ESI. I composti sono stati identificati analizzando il rapporto m/z degli ioni molecolari, acquisendo i dati in modalità positiva o negativa a seconda del segnale di fondo.

COLTURE CELLULARI***Cellule CaCo-2***

Le cellule di tumore al colon CaCo-2 sono state acquistate alla American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) e mantenute in DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) 10%, 2mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina e 100µM di MEM non-essential amino acid solution. Terreno e supplementi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Le cellule crescono a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Cellule HepG2

Le cellule di epatocarcinoma HepG2 sono state acquistate alla American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) e mantenute in DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) 10%, 2mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina e 100µM di MEM non-essential amino acid solution. Terreno e supplementi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Le cellule crescono a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Cellule T24

Le cellule T24 di cancro alla vescica sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) e mantenute in DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) 10%, 2mM di glutammina, 50 µg/ml di gentamicina. Le cellule crescono a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Cellule NCTC 2544

Le cellule NCTC 2544 appartenenti ai cheratinociti ed utilizzati come linea umana di controllo sana sono state acquistate da American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) e mantenute in DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) 10%, 2mM di glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml streptomina. Le cellule crescono a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂.

Cellule HuH-7

Le cellule di epatocarcinoma umano HuH7 (institute of Applied Cell Culture, Munich, Germany) erano mantenute in alta concentrazione di glucosio (4.5 g/l). Nel terreno Dulbecco's modified Eagle's medium (con sodio piruvato e L-glutammina) supplementato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml di streptomina a 37°C e 5% di CO₂.

Cellule C6

Le cellule di glioblastoma C6, gentilmente fornite dal Dr. Frank Dietz (University of Bremen), erano mantenute a 37°C in fiasche di 175 cm² contenenti medium (90% DMEM con 25 mM glucosio, 10% FCS, 18 U/mL penicillina G, 18 µg/mL streptomina e 1 mM di sodio piruvato) in presenza del 10% di CO₂ con atmosfera umidificata grazie all'incubatore Sanyo (Osaka, Japan). Le subculture delle cellule erano iniziate lavando le cellule quando erano all'80% di confluenza con phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, contenente 150 mM sodium chloride) precedentemente scaldato a 37° C. Le cellule erano successivamente staccate con 10 mL 0.05% di trypsin in PBS pre-riscaldato per 5 min. Dopo l'aggiunta di 10mL di terreno di coltura la sospensione cellulare era centrifugata (5 min a 400g), il supernatante era eliminato e la densità cellulare era determinata nella risospensione del pellet dopo nigrosin-staining nella camera di conta di Neubauer, come precedentemente descritto [Hampracht *et al* 1985; Hohnholt *et al* 2011]. Per gli esperimenti, le cellule sono state piastrate in 1 mL di terreno alla densità di 2×10⁵ cellule per mL nelle piastre 24 well, e utilizzate poi dopo 24 h dalla piastratura.

Sulforodamina B (SRB) assay e valutazione della sinergia

Il saggio SRB è basato sull'abilità del colorante SRB di legarsi ai residui aminoacidici basici delle proteine. Il totale del colorante incorporato dalle cellule indica il numero di cellule. Un totale di (5×10³/well per le T24 e le NCTC 2544, di 1×10⁴/well per le CaCo-2 e di 2×10⁴/well per le HepG2) sono state piastrate in piastre 96 well e trattate con XVX, R1, R2 e la combinazione di XVX+R1 o XVX+R2 o XVX+R1+R2 per 24-48 e 72h. Al termine dei trattamenti fitochimici, il terreno è stato rimosso, e le cellule sono state trattate come precedentemente descritto [Papi *et al* 2013].

I risultati sono stati espressi in percentuale di cellule vive, comparate con il controllo. Al fine di valutare il sinergismo fra i composti fitochimici, la misura della vitalità cellulare (V%) è stata convertita in % di effetto inibitorio della crescita, tramite il seguente calcolo: % GIE= (100-V%), e il suo valore è stato preso come indicatore dell'effetto citotossico. La citotossicità della mix misurata sperimentalmente è stata divisa per la "citotossicità attesa", la quale è la somma della citotossicità derivata dai fitochimici individuali. Se la citotossicità sperimentalmente è stata valutata significativamente più alta rispetto al valore atteso, i.e. Rapporto Misurato/ Atteso > 1.0 (p<0.05),

gli effetti sinergici sono stati verificati; il rapporto Misurato/ Atteso =1.0 ($p<0.05$) indica invece un'interazione additiva.

LDH ASSAY

La lattato deidrogenasi (LDH) catalizza la riduzione del piruvato a lattato, con conseguente ossidazione di NADH, formando NAD^+ . La velocità di decremento della concentrazione di NADH, misurata per via fotometrica, è proporzionale alla attività di LDH presente nel campione.

Test di citotossicità sulle C6

Il rilascio dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) nel terreno di coltura viene utilizzato come uno dei marker della tossicità cellulare in vitro. Le cellule di glioblastoma C6 sono state seminate a una concentrazione di 50.000 cells/ml in piastre da 24 pozzetti, sono state poi incubate con concentrazioni crescenti di R2. Dopo 24-48 e 72 ore, il surnatante è stato trasferito in eppendorf da 1.5ml per il dosaggio dell'LDH extracellulare, mentre, il pellet, dopo 2 lavaggi con PBS, è stato incubato 30 minuti a 37°C con 1ml di Triton1% in initial buffer. Successivamente 20 μl di ogni campione (lisato e surnatante) sono stati trasferiti nella 96 well, in cui ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 160 μl di LDH buffer e 180 μl di reaction mix. Ogni campione è stato poi risospeso in 100 μl di buffer di lisi (Tris-HCl 0.2 M pH 8.0 e Triton X-100 1%,) ed incubato per 30 min a 4°C. L'assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 490 nm e i risultati sono espressi come percentuale dell' LDH totale rilasciato dal controllo.

Test di citotossicità sulle Huh7

Il saggio colorimetrico LDH è stato utilizzato per determinare la vitalità cellulare delle cellule Huh7. Queste cellule sono state piastrate ad una densità di 150.000 cells/well in piastre da 24 pozzetti, sono state incubate con concentrazioni crescenti da (1 a 100 μM) di R2B e estratto grezzo e 1% di triton X come controllo negativo per 24h. 100 μl di surnatante sono stati trasferiti nella piastra 96 wells. Successivamente, 100 μL della reaction mix ("Takara Bio Europe/Clontech") sono stati aggiunti alla 96 wells e incubati per 10 minuti al buio. L'assorbanza è stata misurata a $\lambda=492$ nm nel lettore di piastra (Labsystems, Helsinki, Finland).

Trasfezione delle cellule Huh7 e saggio reporter della luciferasi per l'attività di Nrf2

Le cellule Huh7, sono state transientemente transfettate con pARE_GIGPx_Luc (fornito da A. Banning e R. Brigelius-Flohé, DIFE, Potsdam, Germany), il gene reporter della luciferasi sotto il controllo della regione promotrice ARE di GIGPx: human gastrointestinal glutathione peroxidase 2 [Banning *et al* 2005]. Il vettore pRL-TK (Promega, Mannheim, Germany) contiene il gene *Renilla reniformis* luciferase utilizzato per normalizzare. Entrambi i plasmidi sono stati transfettati utilizzando jetPEI in accordo con quanto descritto dal produttore. Dopo 24 h, il terreno è stato rimosso e le cellule Huh7 sono state incubate con 1, 5 e 15 μ M di R1, R2, R3 e estratto grezzo, così come 5 μ M di sulforaphane come controllo positivo per 24h. Successivamente, le cellule sono state lisate con passive lysis buffer e l'attività fluorescente delle *Renilla* luciferase è stata misurata utilizzando Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Mannheim, Germany) in accordo con le istruzioni del protocollo usando il lettore Tecan Infinite 200 microplate (Tecan Group Ltd., Crailsheim, Germany). L'attività fluorescente della luciferasi è stata normalizzata con l'attività della *Renilla* luciferase.

Western blot

Al fine di determinare i livelli proteici di Bcl2-like protein 4 (Bax), protein B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2), Caspase 3 e poly (ADP-ribosio) polimerasi-1 (PARP-1). Le cellule CaCo-2 sono state piastrate e trattate per 24h XVX, R1 e R2 individualmente e in combinazione fra loro. Dopo il trattamento, le cellule sono state distaccate, riunite e centrifugate a 3000g per 5 minuti; il pellet è stato poi sospeso in lysis buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.5% Triton x-100, 5 μ M Na₃VO₄) e sonicate in ghiaccio, con la presenza di inibitore delle proteasi. Le proteine (50 μ g) provenienti da cellule lisate sono state frazionate tramite SDS-PAGE con un gel di poliacrilamide al 12%, e trasferite poi in Hybond TM-C Extra membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), secondo protocolli standard [Papi *et al* 2013]. Dopo la fase di bloccaggio, le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari utilizzati alle concentrazioni suggerite dalla ditta produttrice: anti-caspase 3 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), anti-PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA), Anti-Bax (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA), Anti-Bcl2 (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). L'anticorpo primario è stato diluito in TBS-5% milk e i rispettivi anticorpi secondari sono stati diluiti 1:1000. Le proteine sono state rilevate tramite luminol (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Le bande sono state quantificate utilizzando il software di analisi densitometrica (Image Master VDS, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden).

Il loading delle proteine è stato controllato tramite l'anticorpo per l'actina (1:1000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), monitorato dopo stripping delle membrane con stripping solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). I valori sono stati normalizzati contro i valori dell'actina e sono poi stati statisticamente valutati.

Reactive Oxygen Species (ROS) assay

La generazione di ROS in cellule CaCo-2 è stata monitorata tramite la conversione di 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato (DCFH-DA) nel composto dichlorofluorescein (DCF). DCFH-DA è stata trasformata dalle esterasi cellulari nella forma ridotta non fluorescente DCFH, la quale in presenza di ROS, è ossidata a DCF. Le cellule vengono fatte crescere in coverslips (2×10^4 /well) in piastre 24 well e trattate per 24h con R1 e R2 individualmente e in combinazione e poi incubate con 1 mM H_2O_2 per 1 ora a temperatura ambiente. Il controllo cellulare non ha ricevuto nessun trattamento, mentre un altro campione è stato trattato solo con 1mM di H_2O_2 per 1 ora come controllo positivo. Dopo il lavaggio con PBS, tutti i campioni sono stati incubati al buio per 20 minuti con 10 μ M DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St. LOUIS, USA) dissolto in PBS. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate 3 volte con PBS e risospese in una soluzione di Hoescht (10 μ g/ml) e 1.4-dizabicyclo [2.2.2] octane (DABCO) (entrambi acquistati da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). I campioni sono stati poi monitorati con un microscopio epifluorescente (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Holland) equipaggiato con filtri per Hoescht e FITC. Le cellule che mostravano una intensa fluorescenza luminosa verde sono state considerate come positive, mentre le cellule senza o con bassa fluorescenza sono state considerate negative. Per ogni campione sono stati analizzati almeno 3 campi e sono state contate almeno 100 cellule per campo. I risultati sono stati espressi come % di cellule DCF positive rispetto al controllo.

Estrazione dell'RNA, PCR e esperimenti di RTqPCR

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule tumorali utilizzando il TriReagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), seguendo il protocollo della ditta. L'RNA è stato quantificato utilizzando il NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e 1 μ g di ogni campione è stato retrotrascritto utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem Inc., Foster City, USA) seguendo le istruzioni fornite dal kit. La reazione è stata incubata come riportato: 25°C per 10', 37° C per 120' e 85°C per 5', quindi il loro volume è stato portato a 50 μ l con acqua DEPC- trattata. Esperimenti di PCR semi quantitativa sono stati fatti utilizzando la

Hot Star Taq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nella Vrti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA). 1µl di cDNA per ogni campione è stato amplificato con gli stessi primer poi utilizzati negli esperimenti di RTqPCR. Le condizioni relative al programma di amplificazione utilizzato sono: 95°C per 10', seguiti da 40 cicli di 15'' a 95°C, 15'' a 60°C, 15'' a 72°C. I prodotti di PCR sono stati analizzati in gel di agarosio TBE 3% [w/v] con il 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA) utilizzato come marker per il peso molecolare. L'analisi di RTqPCR dei campioni di cDNA è stata realizzata tramite la Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystem Inc., Foster City, USA) e con lo strumento ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystem Inc., Foster City, USA).

Abbiamo utilizzato il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak method) per la relativa quantificazione dei livelli di espressione dei geni. β - Actina è stato utilizzato come gene housekeeping.

La seguente lista di primers è stata utilizzata (per l'analisi dei livello di mRNA di COX-2 e IL-8 nelle CaCo-2, le cellule sono state pre-incubate per 25' con LPS 1µg/ml):

β -Actin F: 5'-GCGAGAAGATGACCCAGATC-3' , R: 5'-GGATAGCACAGCCTGGATAG-3' (77bp),

BCL2 F:5'-GGCTGGGATGCCTTTGTG-3', R: 5'-GCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3' (64bp),

BAX F: 5'-GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT-3', R: 5'-TCCAATGTCCAGCCCATGAT-3' (356 bp),

BIRC5 (Survivin) F: 5'-ATTCGTCCGGTTGCGCTTTCC-3', R: 5'-CACGGCGCACTTTCTCCGCAG-3' (162 bp),

CTNNB1(β -Catenin),F:5'-AAAATGGCAGTGCGTTTAG-3', R:5'TTTGAAGGCAGTCTGTGTA-3' (144 bp).

COX-2 F: 5'- CCTGTGCCTGATGATTGC-3', R:5'- CTGATGCGTGAAGTGCTG-3' (162bp)

IL-8 F: 5'-GCTTTCTGATGGAAGAGAGC-3', R: 5'-GGCACAGTGGAACAAGGACT-3' (220bp)

Apoptosi valutata tramite FACS

L'apoptosi è stata analizzata tramite citofluorimetria di flusso, utilizzando il kit Annexin V-FITC Apoptosi Detection (Invitrogen, Carlsbad, USA), in accordo con le indicazioni fornite [Koopman *et al* 1994]. I campioni sono stati analizzati utilizzando il Beckman Coulter EPICS XL per citometria di flusso. Per ogni campione sono stati acquisiti 10000 eventi. Annexin V-FITC è rilevata come un segnale verde fluorescente e il propidium iodide è rilevato come un segnale rosso fluorescente. I dati acquisiti sono stati quantificati in percentuale e analizzati tramite il programma FCS Express Program (De Novo Software, CA, USA).

Estrazione del citosol e determinazione dell'attività delle caspasi 3 ed 8

Le cellule T24 non trattate, o trattate con 2.5 µg/ml XVX, 50 µg/ml R2, 2.5 µg/ml XVX+50 µg/ml R2 per 24h, sono state poste in ghiaccio dopo il trattamento. Il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate con 4 ml di Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x. 100 µl di Cell Lysis Buffer (BioVision, Milpitas, USA) sono stati aggiunti ad ogni piastra petri e le cellule sono state "scraped" per 10 min, quindi il lisato per ogni campione è stato recuperato e trasferito in nuove eppendorf da 1.5 ml. I campioni sono stati messi a -80°C per 30 min, quindi sono stati scongelati in ghiaccio e sonicati per 25 minuti a temperatura ambiente in "water-sonication bath". I campioni sono stati centrifugati a 12000 x g a 4°C per 10 min, quindi il surnatante (citosol) è stato recuperato e trasferito in nuove eppendorf da 1,5 ml. Il contenuto di proteine per ogni citosol è stato indagato tramite saggio di Bradford (BioRad laboratories, Hercules, USA), la misura dell'assorbanza è stata effettuata a $\lambda=595\text{nm}$.

L'attività delle caspasi 3 e 8 è stata indagata tramite il kit Caspase Colorimetric Assay (BioVision, Milpitas, USA) in accordo con le indicazioni fornite dalla casa produttrice. 100 µg di proteine del campione non trattato o trattato con i composti fitochimici sono stati incubati con il caspases reaction buffer (25 mM Hepes pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.05% CHAPS, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 5mM DTT), quindi il substrato (200 µM di concentrazione finale) DEVD-pNA per la caspase 3 o IETD-pNA per la caspase 8 è stata aggiunta e i campioni sono stati trasferiti nella piastra 96-wells. Tutti i campioni sono stati incubati a 37°C per 2h. L'assorbanza, rappresentante l'attività delle caspasi, è stata misurata a $\lambda=405\text{nm}$ nel lettore di piastra (BioRad Laboratories, Hercules, USA).

Analisi Statistica

I risultati sono stati espressi come la media \pm SD e la significatività statistica è stata valutata tramite test ANOVA ad una via, utilizzando il software PRISM 5.1 (Graph pad Software, La Jolla, Usa). I risultati sono stati considerati statisticamente significativi quando $p < 0.05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Estrazione di betalaine

La radice fresca tal quale di bietola rossa è stata il materiale di partenza per la purificazione delle betalaine; tuttavia, abbiamo condotto anche studi relativi all'estrazione di betalaine a partire da: bietola rossa bollita, cotta al vapore, congelata, foglie e estratto commerciale E162 (dati non pubblicati).

La scelta di estrarre betalaine a partire da diversi tipi di stoccaggio della bietola rossa, è stata quella di valutare l'eventuale presenza e stabilità di betalaine nei diversi metodi di cottura e conservazione. Lo svantaggio di utilizzare radice fresca è legata alla ciclicità di crescita della pianta e di conseguenza al fatto di poter effettuare le estrazioni solo in periodi limitati dell'anno. Il vantaggio è però legato alla maggiore presenza di betalaine nel prodotto fresco rispetto a tutte le condizioni di stoccaggio analizzate. Le foglie presentano un'elevata quantità di betalaine non superiore a quella della radice, ma presentano anche un'elevata quantità di clorofilla che ha reso difficile le operazioni di estrazione e purificazione.

Alla luce delle motivazioni sopra spiegate, abbiamo messo a punto un protocollo di estrazione e purificazione a partire da radici di bietola rossa. In Figura 12 è riportato un diagramma di flusso che schematizza l'estrazione e purificazione delle betalaine.

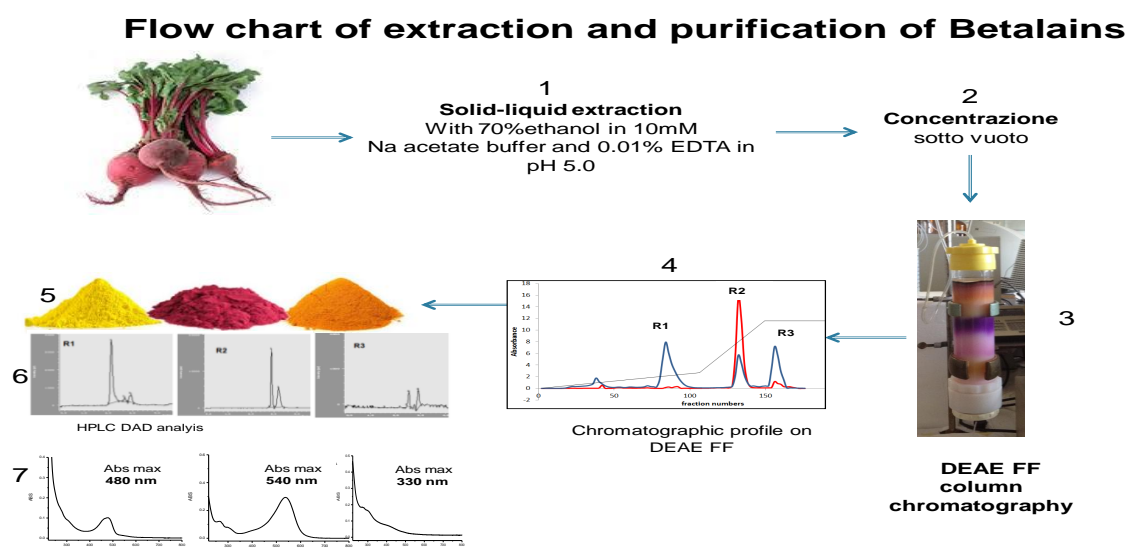


Figura 12. Diagramma di flusso relativo all'estrazione e purificazione di Betalaine a partire da radice di *Beta vulgaris Rubra*.

In breve, 100g di radice (non privata né di polpa né di petiolo), sono stati immersi per 5 minuti in 200ml di una soluzione alcolica al fine di inibire l'azione ossidante, successivamente la radice è stata finemente sminuzzata e risospesa in 1:10 w/v in etanolo 70%, sodio acetato 10 mM, EDTA 0.01%, lasciata in agitazione e al riparo dalla luce e fonti di calore per 2 ore. Terminato questo tempo, la soluzione è stata filtrata, la parte liquida contenente le molecole d'interesse è stata concentrata prima al rotavapor, poi liofilizzata per sublimazione tramite savant. La polpa ormai esausta è stata invece eliminata.

Concentrazione sotto vuoto dell'estratto grezzo

L'estratto grezzo è stato filtrato, la parte liquida è stata poi sottoposta a 2 concentrazioni sotto vuoto consecutive. La prima con evaporatore rotante (Buchi, Milano, Italy) fino a 1/10 del volume iniziale.

Per eliminare tutta la parte liquida rimasta è stata effettuata una seconda liofilizzazione con savant.

Identificazione delle molecole presenti nell'estratto grezzo

Una volta concentrato, prima di essere caricato in colonna l'estratto grezzo è stato letto tramite scansione UV/VIS in un range che va da 250 a 800 nm, quindi analizzato tramite HPLC (Figura 13).

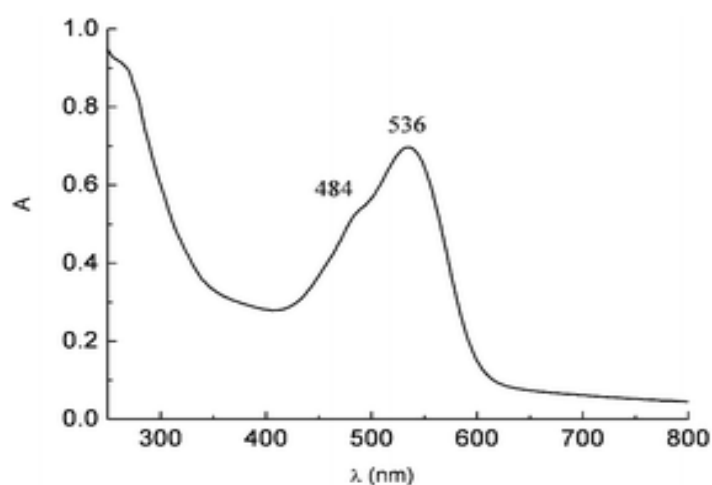


Figura 13. Spettro UV-vis di estratto intero di bietola rossa. Lo spettro mostra due picchi massimi di assorbimento (A), uno a 484 nm relativo a BX (Betaxantine) e uno a 536 nm relativo a BC (Betacianine).

Dalla scansione UV/VIS (Figura 13) si evidenzia la presenza di due picchi massimi di assorbimento, in particolare il primo a λ_{max} di 484nm, e il secondo a λ_{max} di 536nm.

L'analisi HPLC dell'estratto grezzo identifica alla lunghezza d'onda di 536 nm (Figura 14A) solo il picco relativo alle Betacianine, mentre alla lunghezza d'onda di 470 nm (Figura 14B) è possibile evidenziare la presenza di entrambe le molecole, betacianina e betaxantina.

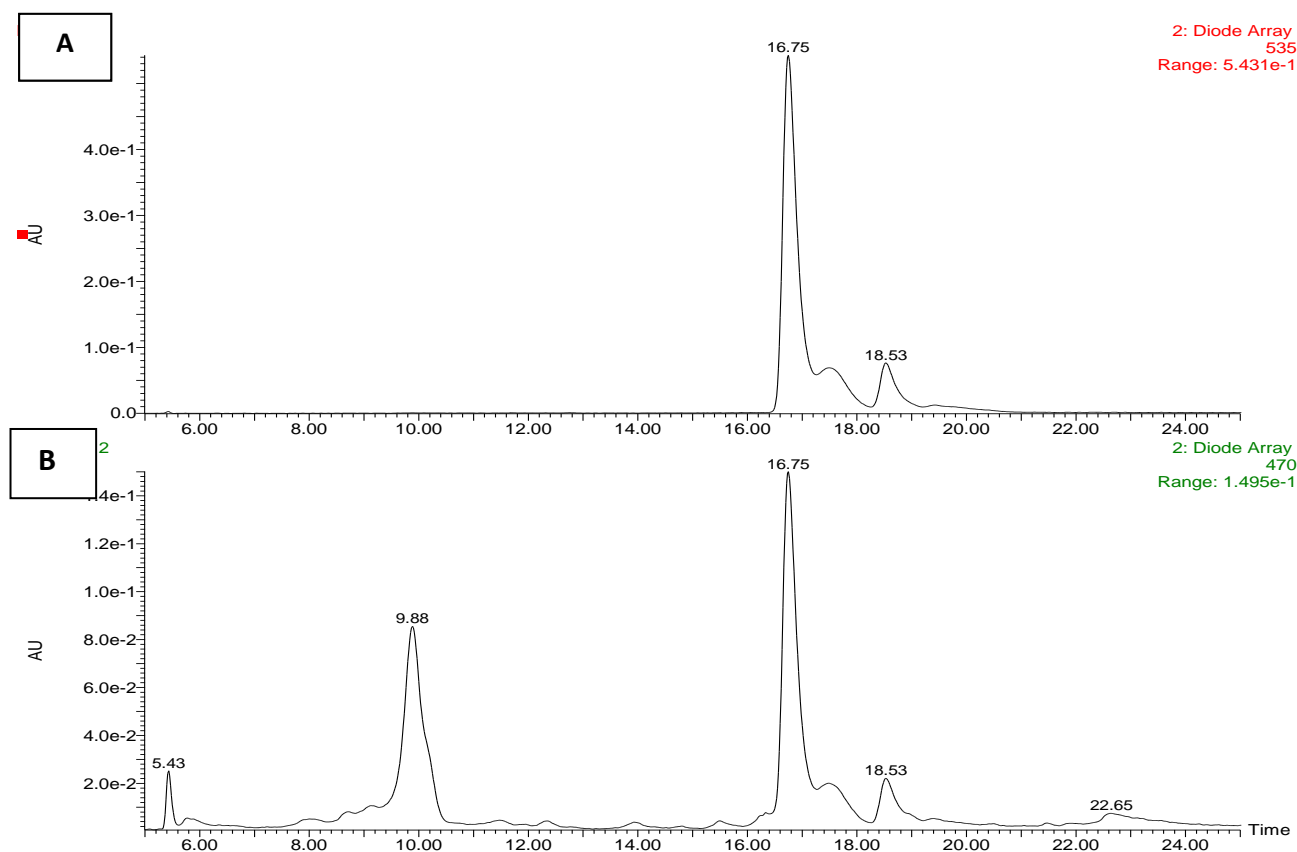


Figura 14. HPLC-DAD relativo all'estratto intero di betalaine. A) lettura effettuata a 470 nm. B) lettura effettuata a 535 nm.

Profilo cromatografico relativo alla purificazione di betalaine su resina DEAE Fast Flow

Il profilo cromatografico relativo alla separazione e purificazione delle molecole con DEAE FF è riportato in Figura 15. La corsa cromatografica è stata eseguita risospesando 5g dell'estratto grezzo liofilizzato di bietola rossa in 40 ml di tampone di equilibrio (tampone fosfato pH 7.5). Il campione prima di essere caricato è stato portato ad un pH 7.5 per favorire una maggiore affinità alla resina, quindi è stato caricato su colonna cromatografica paccata con resina a scambio anionico DEAE FF.

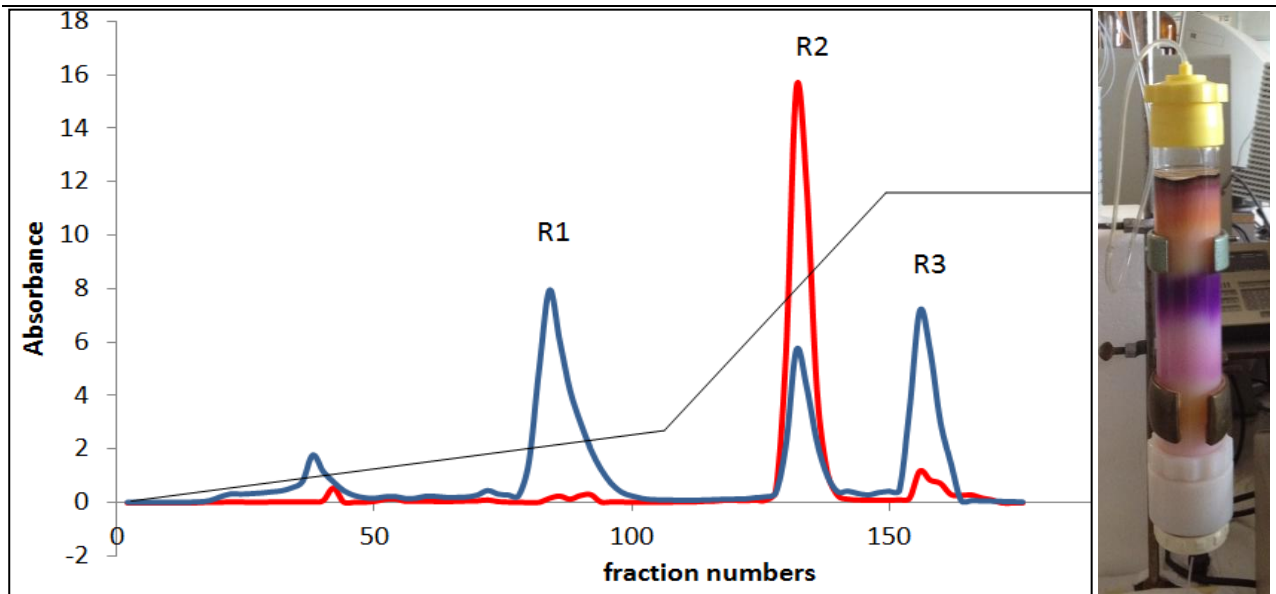


Figura 15. Cromatogramma relativo alla separazione cromatografica di betaxantine e betacianine su colonna di DEAE Fast Flow.

Considerando l'area totale sottesa sotto ai picchi, è stato determinato che le betaxantine presenti nel picco R1 costituiscono l'11% dell'area totale, l'area del picco R2 contenente betacianine rappresenta il 61%, mentre l'area del picco R3 rappresenta il 28% del totale. Dal cromatogramma è inoltre possibile notare come la resina, grazie anche ad un gradiente di NaCl, abbia separato nettamente le diverse molecole oggetto di studio.

Tutte le frazioni ottenute dalla cromatografia sono state lette tramite spettrofotometro ad un'assorbanza di 480 e 540nm. Dalla corsa cromatografica si osserva la presenza di 3 picchi principali R1, R2, R3.

Il primo picco R1 è eluito con un'assorbanza a 480nm dalla frazione 80 a 100 con un gradiente di tampone fosfato 10mM in pH7.5 e tampone fosfato 10mM + 0.08M NaCl in pH 7.5.

Il secondo picco R2 è eluito con un'assorbanza di 540nm dalla frazione 130 alla 140, è il più alto di tutta la cromatografia ed è eluito con un gradiente di tampone fosfato 10 mM + 0.08M NaCl in pH 7.5 e tampone fosfato 10 mM + 0.25 M NaCl in pH 7.5.

Il terzo picco R3 è eluito con un'assorbanza di 480nm dalla frazione 152 a 162 in isocratica con tampone fosfato 10 mM + 0.25 M NaCl in pH 7.5.

Le frazioni corrispondenti ai rispettivi picchi R1, R2 e R3 sono state riunite, e di ciascun riunito è stato determinato il volume, il pH, il contenuto di betalaine, polifenoli e flavonoidi. Di R1 è stato raccolto un volume pari a 210 ml con un pH 8.0 e il picco era di colore giallo; R2 di colore viola ha misurato un volume di 110 ml e pH 7.8, infine di R3 di colore giallo-arancio è stato raccolto un volume pari a 100 ml con pH 7.75.

Tutti i 3 picchi ottenuti sono stati portati ad un pH di 5.5, tenuti al riparo di fonti di calore e luce, al fine di favorirne la stabilità evitando la formazione di complessi e sottoprodotti di degradazione.

IDENTIFICAZIONE DELLA COMPOSIZIONE DEI PICCHI R1, R2 E R3

I picchi R1, R2 e R3 sono stati analizzati tramite valutazione dell'assorbanza UV/VIS, analisi HPLC DAD e MS.

Assorbanza UV/VIS

Nella Figura 16A è riportata la scansione UV/VIS relativa al riunito R1, nella quale è possibile notare un picco di assorbimento massimo a 480 nm, a conferma della presenza di beta xantine. Nella figura 16B è riportata la scansione UV/VIS relativa al riunito R2, dove è presente un picco di assorbimento massimo a 540nm, a conferma della presenza di betacianine. Nella figura 16C è riportata la scansione UV/VIS relativa al riunito R3 dove è possibile notare un picco di assorbimento massimo a 330 nm, dovuto probabilmente alla presenza di catechine e altri materiali di degradazione eventualmente presenti.

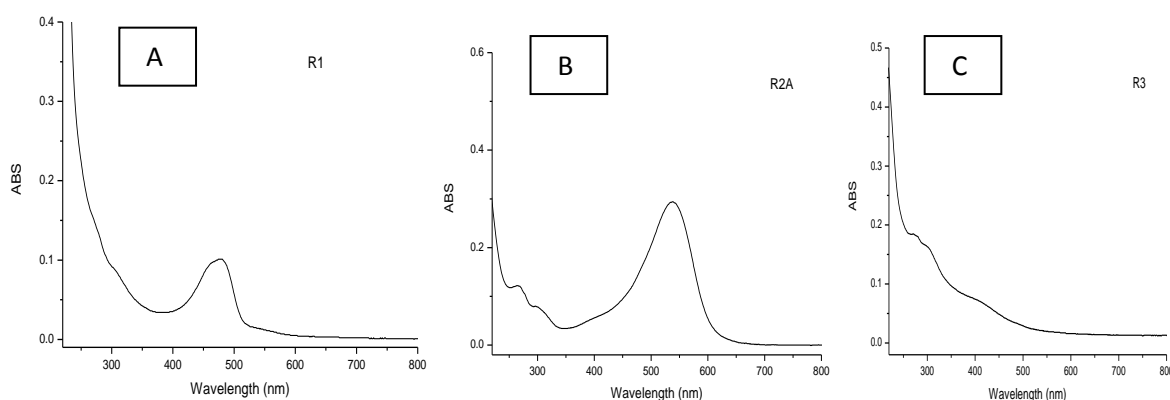


Figura 16. Scansione UV/VIS dei riuniti ottenuti dalla colonna cromatografica di DEAE FF. A) si riferisce al riunito R1 il quale presenta un picco massimo di assorbanza a 480 nm. B) si riferisce al picco R2 il quale

presenta un picco massimo di assorbanza a 540 nm. C) si riferisce al picco R3 il quale presenta un picco massimo di assorbanza a 330 nm.

Analisi HPLC DAD e MS

Per indagare l'effettiva purezza dei riuniti R1,R2,R3 ottenuti dai precedenti step cromatografici, e liofilizzati in savant, sono stati risospesi nella fase mobile e analizzati tramite HPLC DAD come riportato da [Cejudo Bastante *et al* 2014]. I cromatogrammi relativi alla corsa HPLC DAD sono riportati in Figura 17.

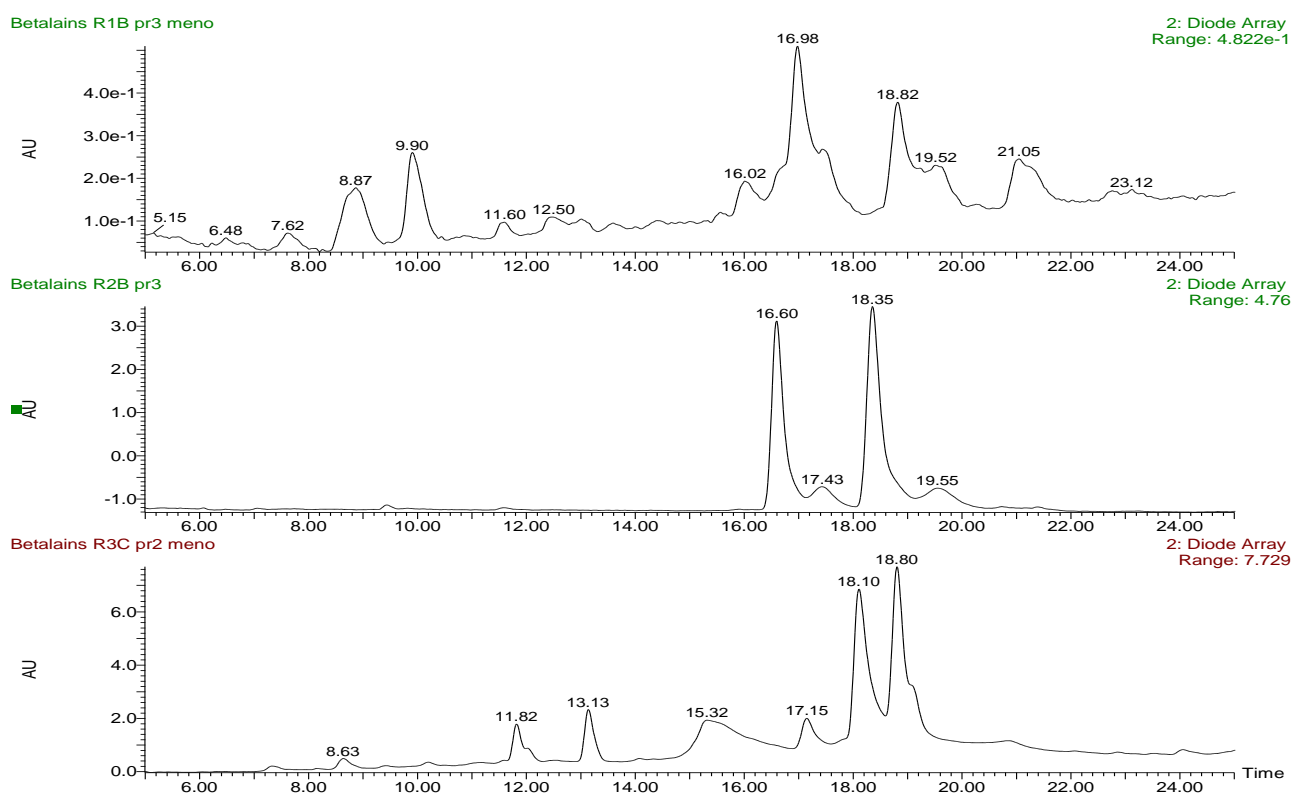


Figura 17. Cromatogramma HPLC relativo ai riuniti R1, R2 e R3. In R1 le principali betaxantine sono presenti in picchi a tempi di ritenzione di 8.87 e 9.90 min, mentre in R2 le beta cianine sono presenti a tempi di ritenzione di 16.60 e 18.35min. In R3 non ci sono betalaine identificabili.

Le stesse frazioni sono state poi analizzate tramite HPLC-ESI-MS, la colonna e i gradienti sono i medesimi utilizzati per l'HPLC DAD. I composti sono stati identificati analizzando la m/z di ioni molecolari (ESI^+) e confrontandoli con i relativi dati presenti in letteratura. I dati sono riportati in tabella 6.

Tabella 6. Tempo di ritenzione, assorbimento e massa dei composti individuati nelle frazioni R1,R2 e R3.

Peack	t.r.	Abs max	mass	Compound
R1	8.87	471	359	Phenilananine BX
	8.90	471	340	Vulgaxntin I
	16.98	520	550	Betanin
	17.43	520	550	Isobetatin
	18.82	533	550	Gomphrenin I
	19.55	533	550	Iso Gomphrenin I
R2	16.98	534	550	Betanin
	17.43	534	550	Isobetatin
	18.35	534	550	Gomphrenin I
	19.55	534	550	Iso Gomphrenin I
R3	23.55	460	515	Unknown BX
	18.45	317	474	Unknown phenolic acid
	15.48	470	548	Neobetatin
	18.10	419	502	Unknown phenolic acid
	13.13	317	355	Unknown phenolic acid
	18.80	354	474	Unknown phenolic acid

Determinazione della capacità antiossidante

La capacità antiossidante è stata misurata tramite Oxygen Radical Antioxidant Capacity (ORAC), in accordo con quanto precedentemente descritto da [Ninfali *et al* 2014]. I valori relativi all'analisi ORAC sono stati riportati in micromoli di Trolox equivalente (TE)/g di frazioni disidratate di bietola rossa. I valori sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7. Capacità antiossidante, polifenoli e flavonoidi totali misurati sulle frazioni R1,R2,R3.

	BETALAINS	ORAC	POLIFENOLI	FLAVONOIDI
	mg/g dry extract	$\mu\text{MolTE/g}$	(mg)*	(mg)*
R1	114 \pm 16	7761 \pm 641	5.41 \pm 0.80	3.36 \pm 0.80
R2	881 \pm 56	11933 \pm 562	5.97 \pm 0.20	3.26 \pm 0.50
R3	/	12800 \pm 235	2.25 \pm 0.24	4.51 \pm 0.10

*su 100g di campione di bietola rossa

Desalificazione

Al fine di rimuovere l'NaCl eventualmente presente all'interno delle frazioni R1, R2 e R3. Dopo liofilizzazione sono state risospese in acqua bidistillata e caricate in colonna cromatografica (1.5 x 90 cm) paccata con resina ad esclusione dimensionale Sephadex G10, eluendo poi in isocratica con acqua bi distillata. La colonna era collegata ad AKTA purifier e conducimetro (Figura 18), che ci ha permesso di individuare le frazioni in cui era presente il sale.



Figura 18. AKTA purifier utilizzato per gel filtrazione su resina G-10 per la desalificazione delle frazioni purificate su DEAE-FF. Le dimensioni della colonna erano 90x1.5cm, la fase mobile era acqua bi-distillata e il flusso era 1ml/min.

Desalificazione picco R1

Nello specifico, per quanto riguarda la desalificazione del picco R1, il cui cromatogramma è presentato in Figura 19, è possibile evidenziare la presenza di 3 picchi di colore blu: 1A, 1B e 1C, separati grazie al setaccio molecolare. I picchi di colore giallo, rappresentano invece i sali, che sono stati così separati dal campione di partenza. Nell'inserto sono state riportate le scansioni spettrofotometriche dei riuniti 1A, 1B e 1C.

Tutti i riuniti scansionati spettrofotometricamente presentano un picco massimo di assorbanza a 480nm.

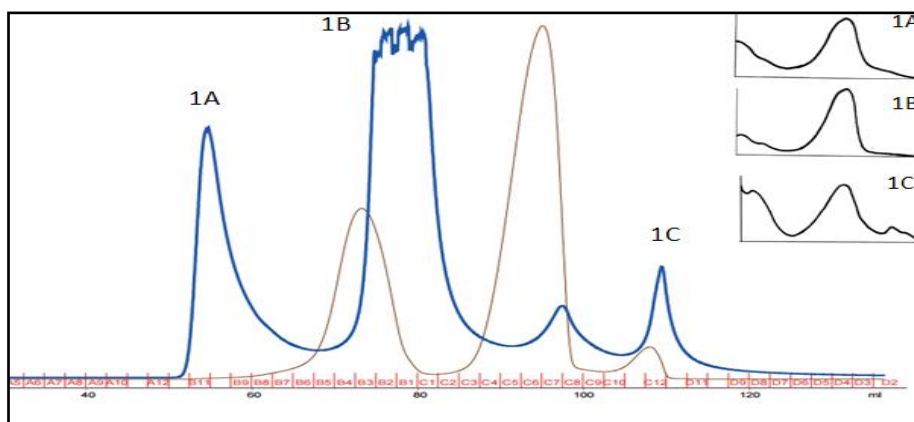


Figura 19. Cromatogramma relativo alla desalificazione della frazione R1 su G-10. Nell'inserto sono presenti le scansioni relative ai picchi cromatografici 1A , 1B e 1C.

Desalificazione picco R2

Nello specifico, per quanto riguarda la desalificazione del picco R2, il cui cromatogramma è presentato in Figura 20, è possibile evidenziare la presenza di 2 picchi di colore blu: 2A e 2B separati grazie al setaccio molecolare. I picchi di colore giallo, rappresentano invece i sali, che sono stati così separati dal campione di partenza. Nell'inserto sono state riportate le scansioni spettrofotometriche dei riuniti 2A e 2B. Il riunito 2A ha presentato un picco doppio di assorbanza con un massimo a 480nm e 540 nm, il riunito 2B ha presentato un solo picco con assorbanza a 540 nm.

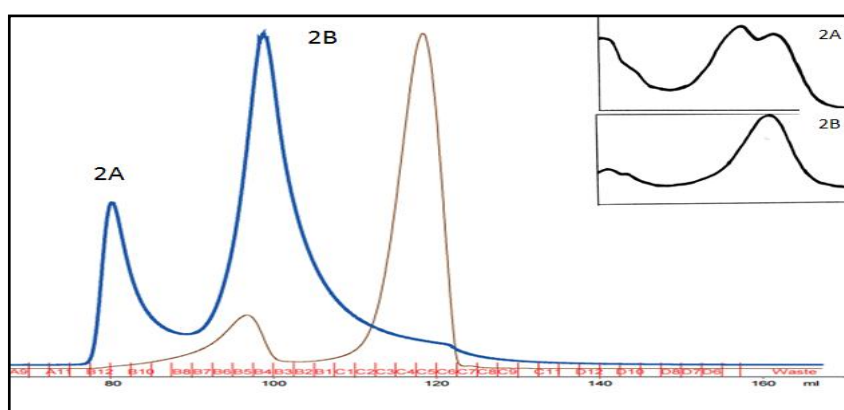


Figura 20. Cromatogramma relativo alla desalificazione della frazione R2 ottenuta su G-10. Nell'inserto sono presenti le scansioni relative ai picchi cromatografici 2A e 2B.

Desalificazione picco R3

Nello specifico, per quanto riguarda la desalificazione del picco R3, il cui cromatogramma è presentato in Figura 21, è possibile evidenziare la presenza di 3 picchi di colore blu: 3A 3B e 3C separati grazie al setaccio molecolare. I picchi di colore giallo, rappresentano invece i sali, che sono stati così separati dal campione di partenza. Nell'inserto sono state riportate le scansioni spettrofotometriche dei riuniti 3A, 3B e 3C. Il riunito 3A non ha presentato un picco di assorbanza, 3B ha mostrato un picco di assorbanza massimo a 330 nm, infine 3C ha mostrato un picco di assorbanza massimo a 480 nm.

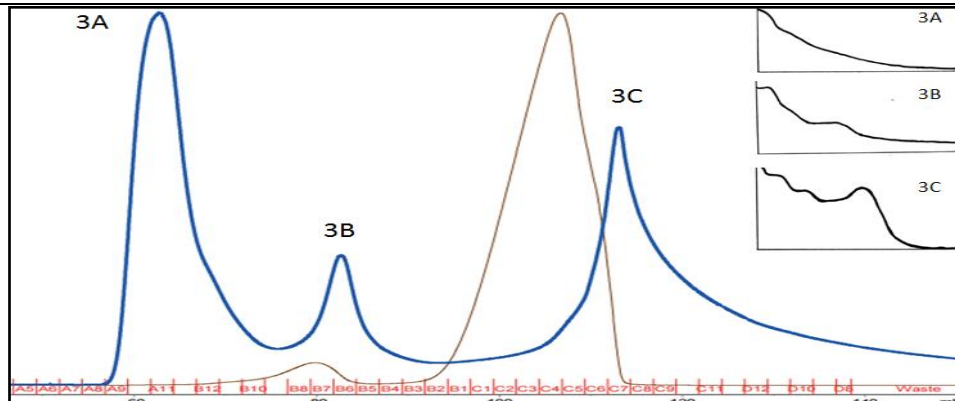


Figura 21. Cromatogramma relativo alla de salificazione della frazion R3 ottenuta su G-10. Nell'inserto sono presenti le scansioni relative ai picchi cromatografici 3A, 3B e 3C.

Caratterizzazione delle frazioni R1, R2 e R3

Una volta desalificati, i 3 riuniti sono stati caratterizzati per contenuto di polifenoli, flavonoidi, potere antiossidante (ORAC) e quantificazione del contenuto betalainico (Tabella 7).

Purificazione di vitexina-2-O-Xiloside

I semi di bietola verde sono stati il materiale di partenza per la purificazione della vitexina-2-O-xiloside. In Figura 22 è mostrato un diagramma di flusso che schematizza il processo di purificazione di Vitexina 2-O-Xiloside. In Figura 23 è riportata L'HPLC e la scansione UV del picco contenente la molecola d'interesse Vitexina 2-O-Xiloside. L'effettiva purezza è confermata anche dallo ione molecolare di XVX (565 Da) Figura 24.

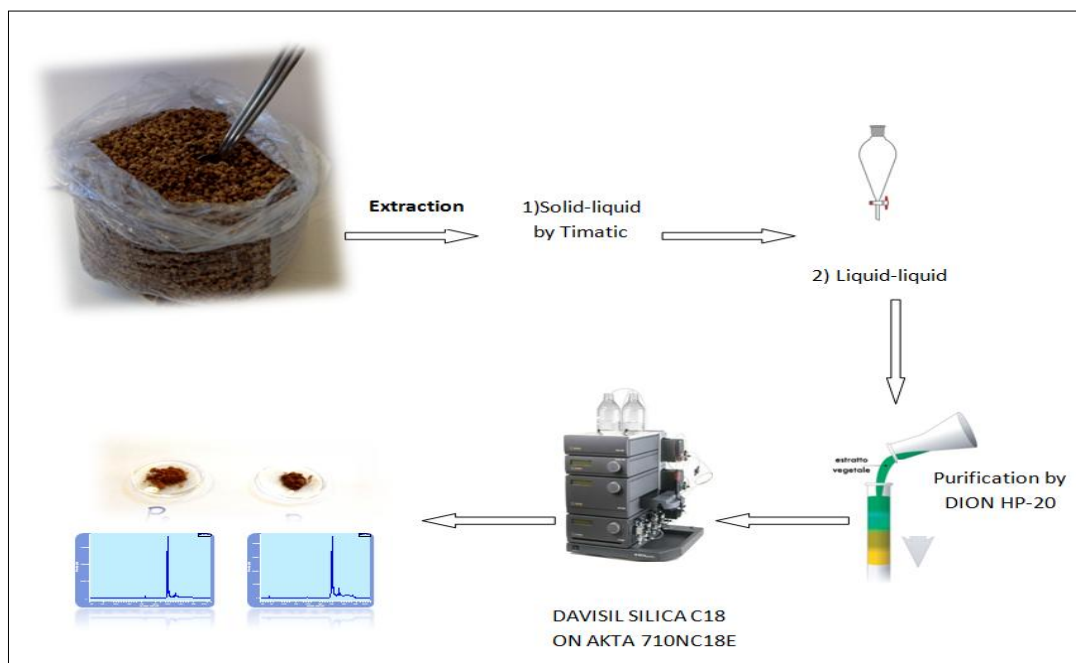


Figura 22. Graphical abstract relativo alla purificazione e estrazione di Vitexina-2-O-xyloside (XVX) a partire da semi di bietola verde

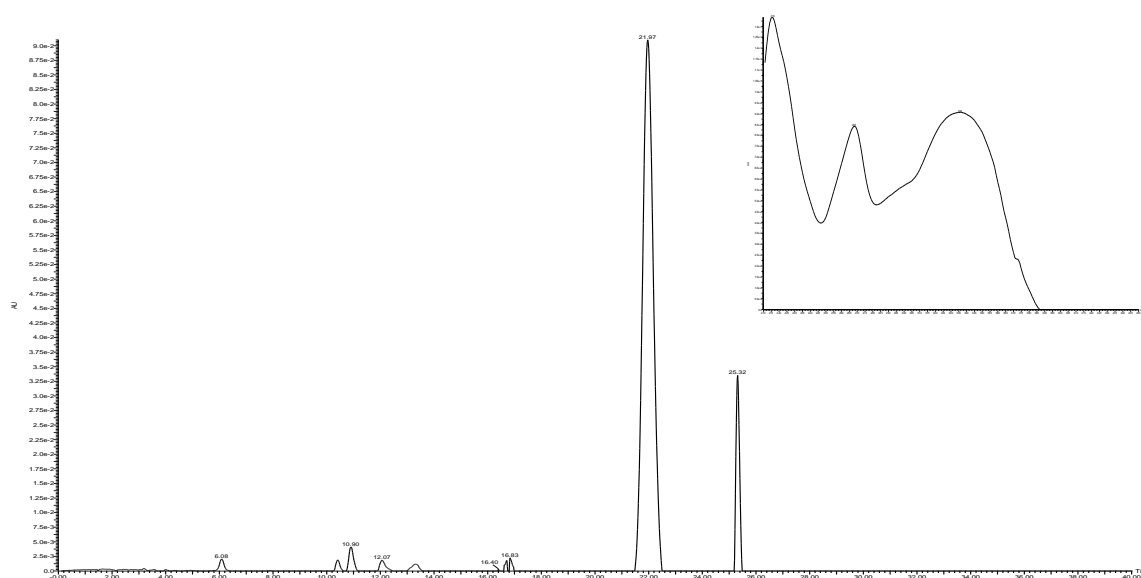


Figura 23. HPLC e scansione UV relativa alla Vitexina-2-O-xyloside estratta da semi di bietola verde.

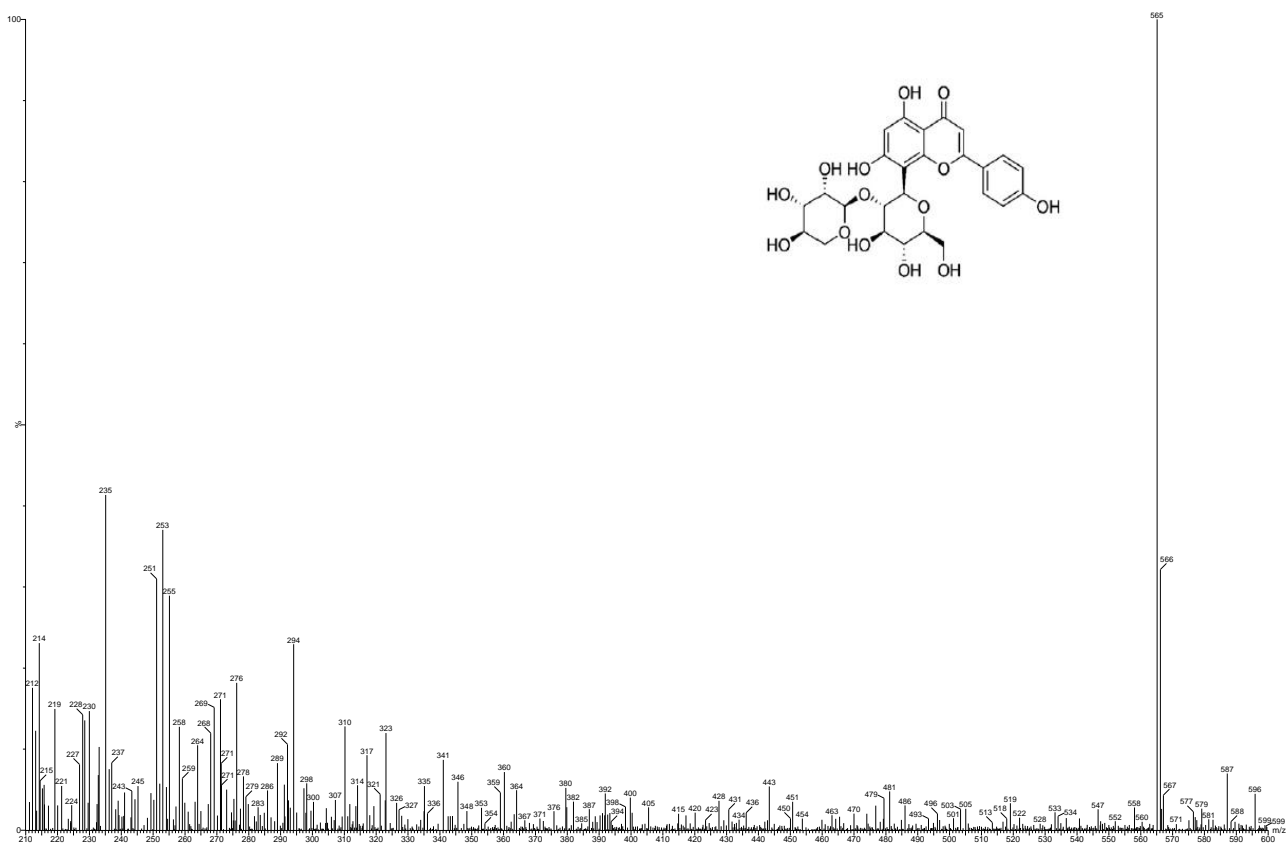


Figura 24. HPLC-MS relativa alla Vitexina-2-O-xyloside

TEST CELLULARI

Cellule CaCo-2

Per prima cosa è stata valutata la citotossicità di ogni singolo composto fitochimico. Le cellule CaCo-2 sono state incubate con diverse concentrazioni di R1 e R2, quindi analizzate tramite test SRB. Si è inoltre osservato in questo tipo di cellule un effetto ormetico, la citotossicità era infatti più pronunciata a basse concentrazioni rispetto che ad alte concentrazioni (Figura 25).

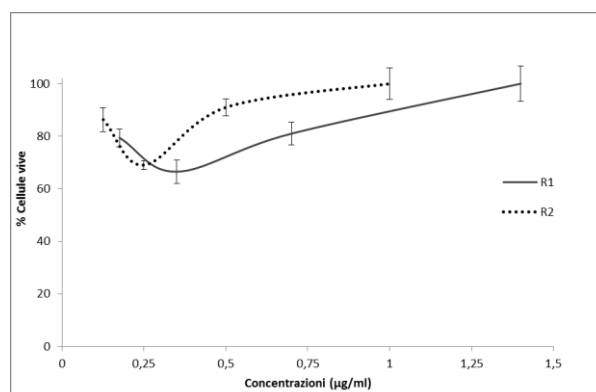


Figura 25. Percentuale di cellule CaCo-2 dopo esperimenti di citotossicità effettuati in relazione all'ormesi di R1 e R2.

Riguardo alle specifiche concentrazioni citotossiche, il miglior effetto è stato osservato a 0.35 µg/ml di R1 e 0.25 µg/ml di R2. L'effetto citotossico di R1 e R2 è stato testato individualmente con esperimenti in time-course. L'effetto di 0.35 e 0.25 µg/ml di R1 e R2, rispettivamente in cellule CaCo-2 incubate per 24, 48 e 72 h, è mostrato in Figura 26.

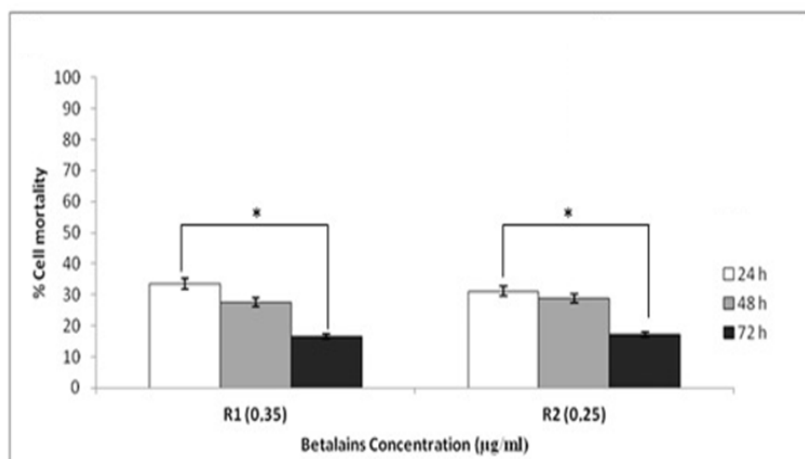


Figura 26. Attività citotossica di betalaine R1 e R2, dose e tempo dipendente in cellule CaCo-2. *p<0.05

La citotossicità di entrambi R1 ($p=0.036$) e R2 ($p=0.026$) è significativamente diminuita dopo 72h di trattamento, questo indica che le cellule CaCo-2 sono in grado di metabolizzare e/o espellere R1 e R2. Una volta individuate le concentrazioni ottimali di R1 e R2, siamo passati all'utilizzo di XVX, estratta da bietola verde. La XVX è stata testata singolarmente per 24, 48 e 72 h, eseguendo poi il test della sulforodamina B (SRB). La dose risposta dell'effetto citotossico di XVX nel range di 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$ è mostrato in Figura 27.

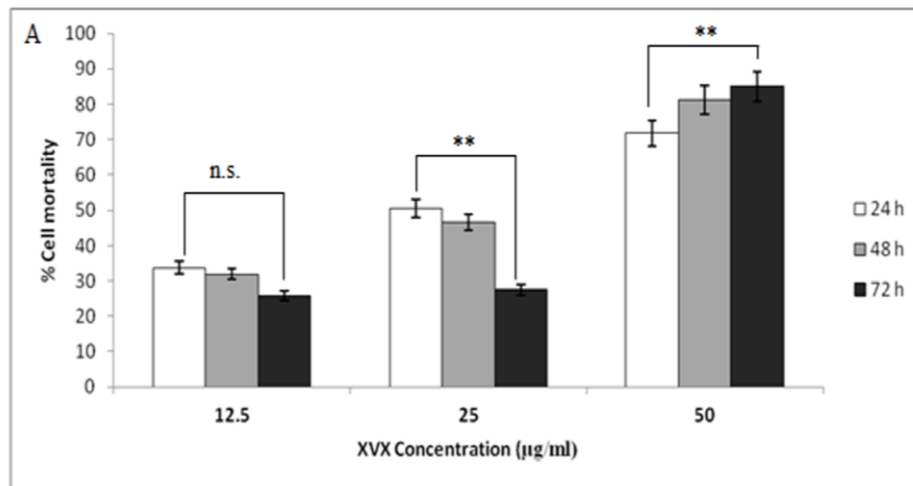


Figura 27. Attività citotossica di xilosil 2-0-vitexin (XVX), dose e tempo dipendente in cellule CaCo-2. ** $p<0.01$; n.s. not significant.

La XVX mostra il miglior effetto citotossico quando utilizzata alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$. La valutazione dell' IC_{50} ha riportato un valore di 25 $\mu\text{g/ml}$ dopo 24 e 48 h di incubazione. La mortalità cellulare decresce a 72h ($p=0.004$), indicando che le cellule CaCo-2 hanno la possibilità di metabolizzare o eliminare parte della XVX a 72h. Al contrario, alla concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ di XVX, l'effetto citotossico aumenta rispettivamente a 24 e 48 h raggiungendo il suo massimo a 72h ($p=0.002$). Quindi, a queste concentrazioni, la XVX mostra un importante effetto citotossico a tutti i tempi testati, d'altra parte le cellule mostrano una bassa efficacia nel metabolizzare e escludere le alte concentrazioni di XVX.

Al fine di valutare il possibile effetto sinergico di XVX utilizzata in combinazione con R1 e R2, la concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$ XVX (corrispondente all' IC_{50}), è stata utilizzata in combinazione con 0.35 o 0.25 $\mu\text{g/ml}$ di R1 e R2 rispettivamente. XVX combinata con R1 ($p=0.003$) o R2 ($p=0.007$), mostra in entrambi i casi un forte e significativo effetto citotossico che aumenta dopo 72 h di trattamento (Figura 28).

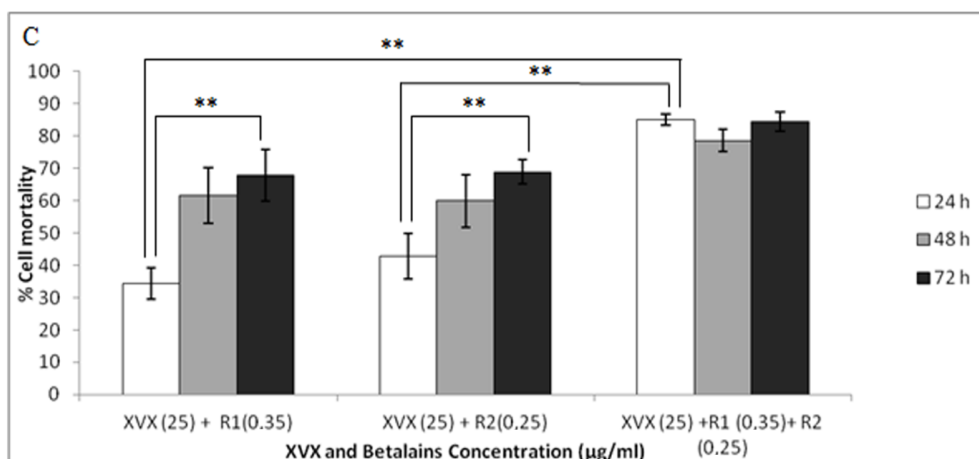


Figura 28. Attività citotossica in cellule Caco2 relativa a combinazioni di XVX+R1, XVX+R2, XVX+R1+R2. ** $p < 0.01$

Infatti la combinazione di XVX +R1 induce il 67.7 ± 7.9 % di mortalità cellulare, mentre la combinazione di XVX +R2 induce il 68.9 ± 3.8 % di mortalità cellulare. I risultati mostrano che sia R1 che R2 hanno un effetto citotossico sinergico quando utilizzati in combinazione con XVX. La sinergia è stata valutata calcolando il rapporto fra la citotossicità misurata/attesa con valori pari a 1.53 ± 0.15 per XVX +R1 e 1.54 ± 0.15 per XVX +R2 (Tabella 8).

Tabella 8. Mortalità delle cellule CaCo-2 trattate con composti fitochimici a 72h di incubazione.

Compounds	Mortality (%) measured	Mortality (%) expected	Measured/Expected ratio
XVX	27.50 ± 3.00		
R1	16.70 ± 4.80		
R2	17.20 ± 6.10		
XVX+R1	67.65 ± 8.00	44.20 ± 3.90	1.53 ± 0.15
XVX+R2	68.90 ± 3.80	44.70 ± 4.55	1.54 ± 0.16
XVX+R1+R2	85.60 ± 5.10	61.40 ± 4.63	1.39 ± 0.14

L'abilità delle betalaine di accrescere la citotossicità di XVX è dovuta, probabilmente, alla loro capacità di ostacolare il catabolismo della XVX o inibire la sua espulsione dalle cellule, tramite la

modulazione del sistema multidrug-resistance (MDR) (Eid, El-readi, Fatani, e Wink, 2013). L'effetto citotossico della tripla combinazione XVX+R1+R2, (25µg/ml per XVX, 0.35 µg/ml per R1 e 0.25 25 µg/ml per R2) è stata testata nelle cellule CaCo-2. La tripla combinazione era più citotossica per le cellule CaCo-2, rispetto al trattamento con XVX+R1(p<0.001) o XVX +R2 (p<0.001), specialmente quando usati nelle 24h di trattamento (Figura 28). Questi risultati mostrano l'abilità della tripla combinazione di mantenere la citotossicità fino a 72 h quando la mortalità cellulare era di 85.6 ±5.1% e il rapporto misurato/atteso era 1.39 ±0.14 (Tabella 8). Questi risultati richiedono l'analisi degli effetti molecolari dei singoli composti fitochimici e della tripla combinazione e dei target molecolari responsabili dell'attivazione dell'apoptosi in cellule CaCo-2, come precedentemente dimostrato per XVX, epigallocatechin-3-gallato e "raphasatin" [Papi *et al* 2013].

Attività antiradicalica di R1 e R2 individuata tramite DCF-DA assay

Lo stress ossidativo è stato indotto nelle cellule Caco-2 con H₂O₂, in grado di provocare la formazione di ROS, i quali possono essere facilmente rilevati tramite il test DCF-DA. Le cellule CaCo2 sono state trattate per 24h con R1, R2 e R1+R2. Il terreno è stato rimosso e le cellule sono state incubate per 1h con 1mM di H₂O₂; la presenza di ROS è stata valutata con test DCF-DA (Figura 29).

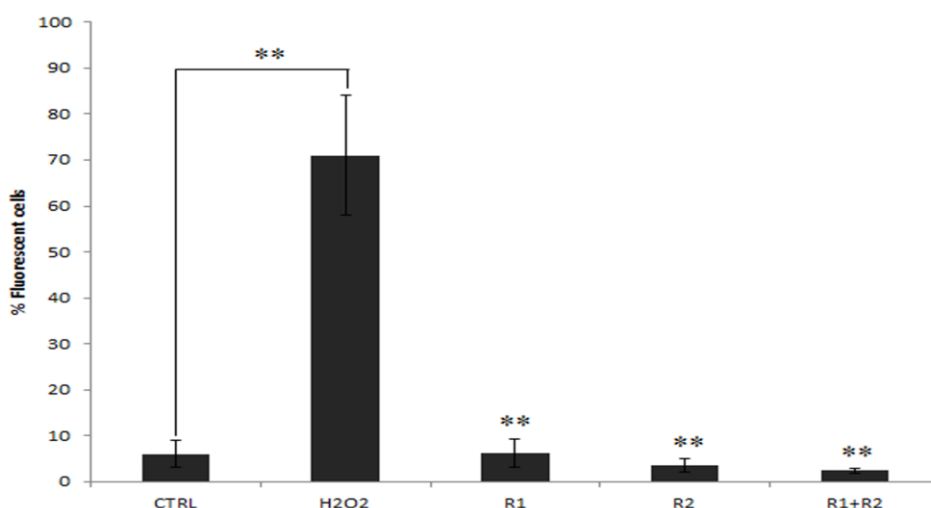


Figura 29. Percentuale di cellule Caco-2 fluorescenti dopo incubazione con H₂O₂ da sola o pre incubate con le frazioni di betalaine R1(0.35µg/ml) o R2 (0.25 µg/ml) o R1+R2 per 24h. **p<0.01.

Le cellule che producono ROS, mostrano un'intensa fluorescenza verde che può essere facilmente valutata. Nelle cellule di controllo non trattate, solo poche cellule positive sono state individuate ($6\pm 3\%$), d'altronde nelle cellule CaCo2 trattate solo con H_2O_2 , la percentuale di cellule positive incrementa fino al $71\pm 13\%$ (Figura 29). La percentuale delle cellule positive diminuisce al $6.2\pm 3.1\%$ e $3.5\pm 1.4\%$ quando le cellule CaCo2 sono state pretrattate con R1 o R2 rispettivamente. D'altronde, la fluorescenza delle cellule diminuisce al $2.4\pm 0.6\%$ quando pretrattate con R1+R2 (Figura 29). Questi risultati confermano il grande potere antiossidante sia di R1 che R2, quando usati da soli o in combinazione. Il fatto che R1 e R2 siano in grado di ridurre lo stress ossidativo indotto da H_2O_2 nelle cellule, indica che le beta xantine e le beta cianine contenute nelle frazioni R1 e R2 sono in grado di attraversare la membrana cellulare, estendendo la loro attività all'interno delle cellule tumorali.

Induzione dell'apoptosi nelle cellule CaCo2

Le cellule CaCo2 sono state incubate per 24h con XVX, R1 e R2 usati da soli o in combinazione tripla e sono stati valutati i livelli di espressione di Bcl-2, bax, Caspase 3 e poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). Gli effetti di questi composti fitochimici nell'espressione dei sopra menzionati target molecolari, i quali sono coinvolti nei processi apoptotici, sono mostrati in Figura 30.

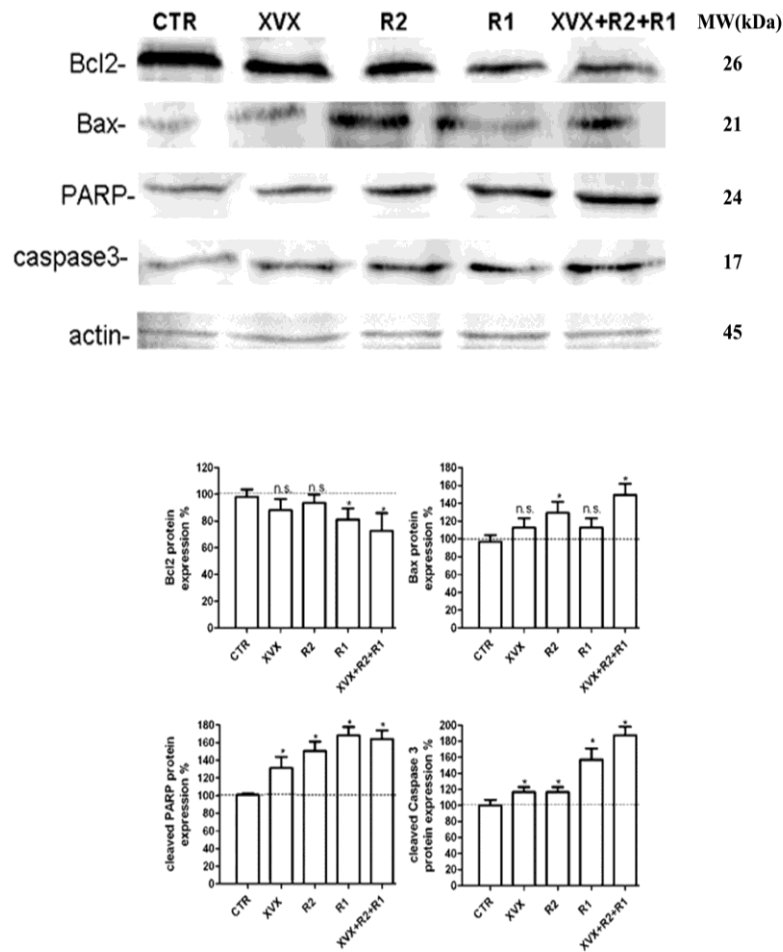


Figura 30. Marker di Apoptosi individuati tramite Western Blot in cellule CaCo2 trattate con XVX, R1 e R2. Cellule non trattate (CTR), o trattate con XVX (25µg/ml), R2 (0.25µg/ml), R1(0.35 µg/ml) o con XVX+R1+R2 alla stessa concentrazione per 24h. I marcatori di apoptosi Bcl2, Bax, PARP1 clivato (PARP) e caspase 3 clivata, sono stati indagati in lisati di cellule Caco2. Il peso molecolare (MW) di questi marker apoptotici, espresso in kDa, è mostrato a destra della figura. I dati di densitometria sono stati normalizzati con i livelli di actina e i livelli di ciascun target molecolare sono stati espressi con la percentuale dei livelli proteici (media ±DS) in campioni trattati, rispetto al controllo. Tre ripetizioni, con tre campioni per ogni ripetizione, sono stati realizzati. *p<0.05; ns non statisticamente significativo.

I livelli di espressione della proteina Bcl-2 decrescono significativamente in presenza di R1 e XVX+R2+R1, ma non in presenza di R2 o XVX singolarmente. D'altronde i livelli d'espressione della proteina Bax incrementano con concentrazioni individuali di R2, così come con la combinazione di XVX+R2+R1, ma non quando trattati con R1 o XVX da soli. I livelli di PARP-1

clivata incrementano significativamente quando comparati con cellule non trattate, entrambe con la concentrazione individuale di XVX, R2 e R1 così come con la combinazione di XVX+R2+R1. I livelli della caspase 3 clivata incrementano significativamente con trattamenti singoli di XVX, R2 e R1, così come con la tripla combinazione (Figura 30). È stata quindi osservata una down regolazione di Bcl-2, insieme con una over espressione della proteina proapoptotica Bax, con qualche composto individuale, ma sempre con la combinazione tripla. Il rapporto Bcl2/Bax decresce, indicando quindi un'attivazione del pathway intrinseco (mitocondriale) di apoptosi [Khan *et al* 2008]. I risultati sperimentali sottolineano anche l'attivazione della caspase 3 ed il taglio del suo substrato PARP1. La caspase 3 gioca un ruolo centrale nella esecuzione dell'apoptosi cellulare, è infatti responsabile del clivaggio proteolitico di PARP-1, un enzima nucleare implicato nel riparo e nella stabilità del DNA, il quale è tagliato dopo attivazione della caspase 3. In generale, i nostri risultati mostrano l'attivazione del pathway di apoptosi intrinseca in cellule CaCo-2, innescato da differenti concentrazioni dei composti individuali XVX, R1 e R2, ma ancor di più dalla loro combinazione. Questo indica che c'è un potente effetto chemio-preventivo esercitato dai 3 nutrienti. D'altronde, queste molecole hanno dimostrato essere largamente biodisponibili [Tesoriere *et al* 2013], e citoprotettive a livello intestinale, così come nei tessuti periferici e nel fegato.

Inibizione trascrizionale di di COX-2 e IL-8 in cellule Caco-2

Esperimenti di RTqPCR sono stati eseguiti per valutare i livelli di mRNA di IL-8 e COX-2, markers pro infiammatori i quali supportano la over proliferazione di cellule tumorali del colon [Sheng *et al* 1998; Suh *et al* 2009]. Livelli rilevabili di mRNA per CoX-2 e IL-8 sono stati osservati solo dopo trattamento con LPS, sostanza nota per la sua capacità di indurre infiammazione.

XVX da sola induce un lieve decremento nei livelli dell' mRNA di COX-2. Anche R1 porta ad un leggero decremento, mentre R2 ne riduce marcatamente i livelli di mRNA. R1+R2 così come così come la tripla combinazione XVX+ R1 +R2 erano entrambi in grado di ridurre significativamente i livelli di espressione di COX-2 (Figura 31A).

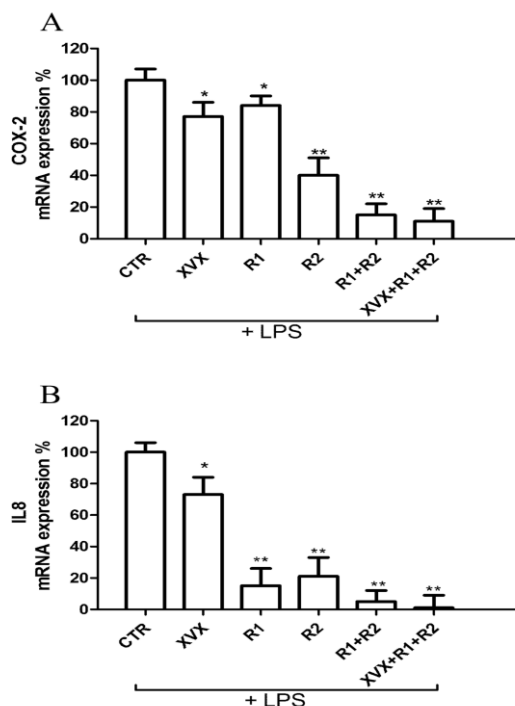


Figura 31. Effetto di XVX, R1 e R2 in cellule Caco2, sui livelli di espressione di COX-2 e IL-8 indagati tramite RTqPCR. Le cellule sono state incubate con LPS (1 μ g/ml) e non trattate (CTR); trattate con XVX (25 μ g/ml) (XVX), trattate con R1 (0.35 μ g/ml) (R1), trattate con R2 (0.25 μ g/ml) (R2), trattate con R1+R2 (R1+R2) o trattate con XVX+R1+R2 (XVX+R1+R2) per 24h. COX-2 (A) e IL-8(B): i livelli di mRNA sono stati misurati e normalizzati con i livelli di mRNA del gene house Keeping β -Actin. * p <0.05; ** p <0.01.

La combinazione di R1+R2 e anche la tripla combinazione XVX+R1+R2 inibiscono l'espressione di COX-2 e conseguentemente il suo prodotto PGE2, il quale non è più in grado di indurre l'over espressione di Bcl-2, la proteina anti apoptotica [Suh *et al* 2009]. Questa serie di eventi rafforza l'effetto citotossico di composti fitochimici in cellule di cancro al colon CaCo-2.

Siccome la IL-8 è la principale citochina coinvolta nei processi infiammatori che possono portare allo sviluppo di cancro al colon [Lee *et al* 2012], è stata indagata l'abilità dei composti fitochimici di regolare i livelli di espressione della IL8. Un lieve nei livelli di mRNA della IL-8 dopo trattamenti con XVX è stato osservato; d'altronde i trattamenti con R1, R2, R1+R2 e XVX+R1+R2 erano in grado di ridurre significativamente i livelli di mRNA della IL-8 (Figura 31B).

Cellule T24

Effetto di R2 e XVX nella proliferazione di cellule tumorali T24

L'effetto antiproliferativo delle diverse frazioni di betalaine e XVX in cellule T24 di cancro alla vescica è stato investigato con SRB assay, conducendo esperimenti di dose-risposta e time-course (Figura 32).

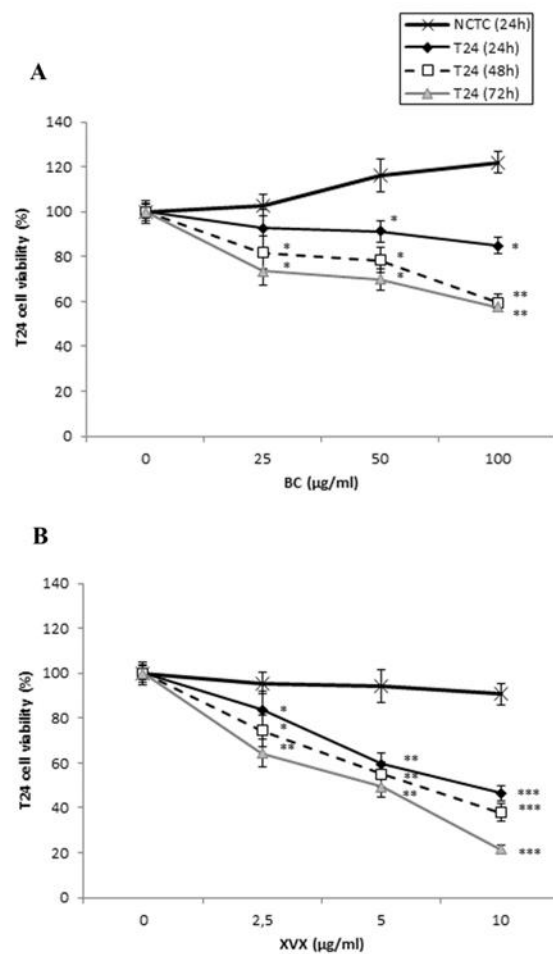


Figura 32. Effetto citotossico di betacianina (BC) e vitexina 2-O-xyloside (XVX) in cellule tumorali T24 dopo 24, 48 e 72h di incubazione. Tre replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione sono state realizzate. Sono mostrati anche gli effetti di BC e XVX sui cheratinociti umani sani NCTC 2544. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La frazione R1, contenente betaxantine, non mostra alcun effetto antiproliferativo durante il periodo di tempo investigato (dati non mostrati). La frazione R2 contenente beta cianina ha mostrato un effetto antiproliferativo dose-risposta (Figura 32), con un IC_{50} di $99.8 \pm 19.9 \mu\text{g/ml}$ a 72h. XVX mostra un importante effetto dose risposta anti-proliferativo (Figura 32), il quale incrementa da 24 a 72h la IC_{50} di XVX a 72 h era di $5.1 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ ($8.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$). D'altronde, la stessa concentrazione di XVX e BC in grado di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali di cancro alla vescica T24, non ha mostrando nessun effetto citotossico nelle cellule sane della pelle (cheratinociti NCTC 2544) dopo un periodo di 24h di trattamento (Figura 32). Al fine di valutare l'effetto derivato da una possibile interazione fra i 2 composti fitochimici nella proliferazione delle cellule T24, sono stati effettuati esperimenti con combinazioni di XVX+R2. Le concentrazioni individuali di XVX ($2.5 \mu\text{g/ml}$) e R2 ($50 \mu\text{g/ml}$), sono state combinate e testate per la citotossicità a 24-48 e 72h (Tabella 9).

Tabella 9. Mortalità cellulare in cellule T24 indotta da trattamenti fitochimici individuali e combinati. Valutazione della sinergia a 24, 48 e 72 h.

Treatments	Compounds	Measured mortality (%)	Expected Mortality (%)	Measured/Expected ratio
24 h	XVX	16.3 ± 1.6		
		13.9 ± 0.7		
	XVX+R2	58.2 ± 2.8	30.2 ± 2.7	$1.93 \pm 0.16^{**}$
48 h	XVX	25.7 ± 2.1		
	R2	22.2 ± 1.7		
	XVX+R2	65.1 ± 5.6	47.9 ± 3.8	$1.36 \pm 0.17^*$
72 h	XVX	35.7 ± 3.5		
	R2	30.6 ± 2.3		
	XVX+R2	62.5 ± 3.9	66.3 ± 4.8	0.94 ± 0.14

XVX: $2.5 \mu\text{g/ml}$; R2: $50 \mu\text{g/ml}$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, when compared with the additive effect (1.0 ± 0.1).

Inoltre il trattamento con XVX+R2 non mostra nessun effetto nella proliferazione di cellule sane NCTC 2544 dopo 24h di incubazione (dati non mostrati).

La combinazione di XVX e BC induce apoptosi in cellule tumorali T24

Abbiamo investigato l'abilità di XVX e BC, utilizzate individualmente e in combinazione, nell'indurre apoptosi in cellule T24 dopo 24h di trattamento. L'analisi FACS mostra che XVX da sola ($p=0.003$), BC da sola ($p=0.038$) e la combinazione di XVX+BC ($p=0.002$) sono in grado di incrementare i livelli percentuali di apoptosi in cellule T24 comparate con il controllo (Figura 33 A), con valori pari a $13.9\pm 2.2\%$ per la XVX, $3.7\pm 1.1\%$ per BC e $16.9\pm 2.8\%$ per XVX+BC.

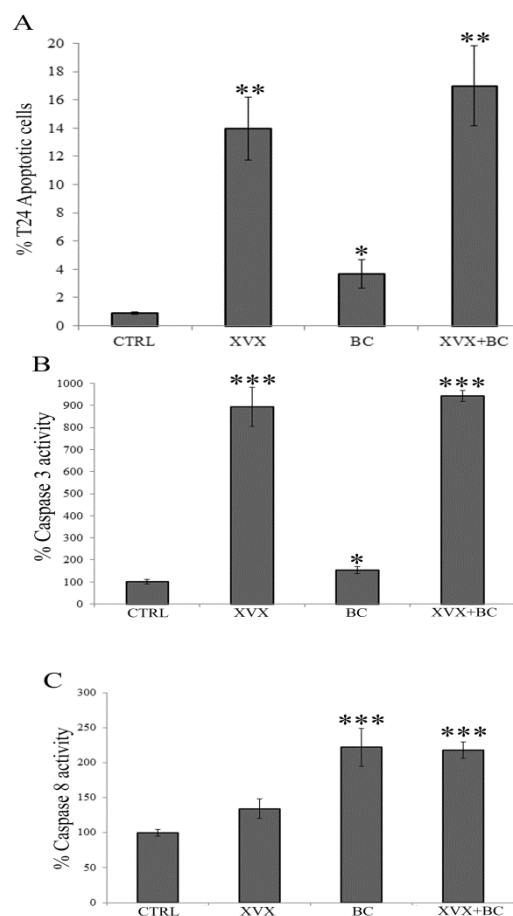


Figura 33. Valutazione dell'induzione dell'apoptosi, livelli di attività di caspase 3 e 8, indotti da vitexin-2-O-xyloside (XVX), betacyanins (BC) e la loro combinazione in cellule T24. (A) cellule non trattate (CTRL) o trattate per 24h con XVX (2.5 $\mu\text{g/ml}$), BC (50 $\mu\text{g/ml}$) o XVX +BC (2.5 $\mu\text{g/ml}$ + 50 $\mu\text{g/ml}$). I dati sono stati espressi come la % di cellule apoptotiche. Due repliche dell'esperimento con due campioni analizzati per ogni replica sono state effettuate. (B,C) le cellule non sono state trattate (CTRL) o sono state trattate per 24h con XVX (2.5 $\mu\text{g/ml}$), BC (50 $\mu\text{g/ml}$) o XVX +BC (2.5 $\mu\text{g/ml}$ + 50 $\mu\text{g/ml}$). I dati sono espressi come la percentuale dei livelli di attività della caspase 3 (B) o livelli di attività della caspase 8 (C). due repliche

dell'esperimento con due campioni analizzati per ogni replica sono stati realizzati. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

È stato già mostrato che XVX inibisce la proliferazione di cellule tumorali del colon, grazie all'incremento dei livelli di caspase 9 e caspase 3 clivata e attiva, con induzione di apoptosi intrinseca [Papi et al 2013]. Per meglio capire l'apoptosi esercitata da XVX e BC in cellule T24. La modulazione della l'attività della caspase 3 è stata valutata per entrambi i composti, usati da soli o in combinazione (Figura 33 B). I trattamenti con XVX inducono un notevole aumento ($p < 0.001$), pari a $893 \pm 89\%$ nei livelli di attività della caspase 3 e il trattamento con R2 induce un significativo ($p = 0.023$) incremento del $153 \pm 7\%$ nell'attività della caspase 3. Anche i trattamenti effettuati con la combinazione XVX+R2 mostrano un notevole aumento ($p < 0.001$), pari a $944 \pm 24\%$ nei livelli di attività della caspase 3. Questi dati erano coerenti a quelli ottenuti con analisi FACS. Dagli istogrammi (Figura 3A) è dimostrato che XVX è il maggior responsabile dell'induzione dell'apoptosi nelle cellule T24, d'altronde il contributo di R2 rimane comunque significativo.

In Figura 33 C è mostrato che i trattamenti con BC sono in grado di indurre un notevole aumento ($p < 0.001$), con un incremento di $222 \pm 27\%$ nell'attività della caspase 8, mentre XVX non è in grado di indurre una significativa risposta ($p = 0.096$). D'altronde, il trattamento con XVX+R2 induce un notevole incremento ($p < 0.001$) di $218 \pm 12\%$ nei livelli della caspase 8, marcando così il ruolo di BC nell'attivazione estrinseca dell'apoptosi in cellule di cancro alla vescica T24.

La combinazione di XVX e BC modulano i livelli di espressione di BAX, BIRC 5, e CTNNB1

Per far luce sui geni coinvolti nella regolazione dell'induzione dell'apoptosi mediata dai trattamenti con XVX e BC, sono stati effettuati esperimenti di PCR semi-quantitativa. I risultati mostrano che non ci sono cambiamenti nei livelli di mRNA del gene BCL2, mentre sono state osservate variazioni dell'espressione dei geni BAX, BIRC 5 (Survivin) e del gene pro-survival CTNNB1 (β -Catenin).

Dopo questo screening preliminare, sono stati condotti esperimenti di RTqPCR per quantificare i cambiamenti nei livelli di espressione di BAX, BIRC5 e CTNNB1, dopo 24 h di trattamenti con XVX, BC o XVX+BC. I risultati sono mostrati in Figura 34.

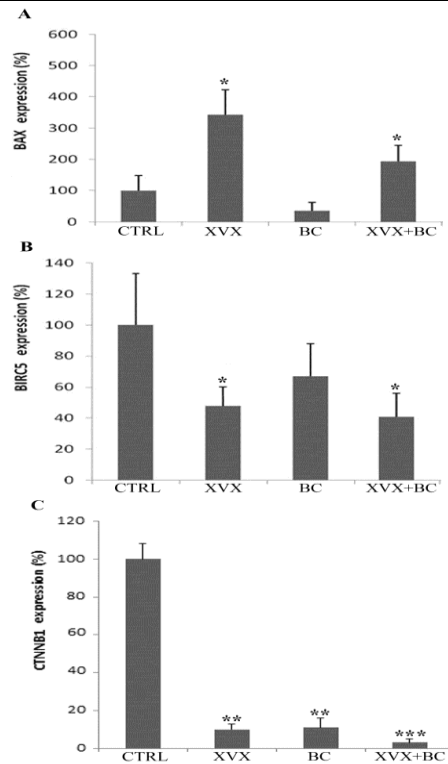


Figura 34. Valutazione dell'effetto di vitexina-2-O-xyloside (XVX) e betacyanina (BC) e della loro combinazione (XVX+BC) in BAX, BIRC 5 e nei livelli di espressione di CTNNB1 in cellule di cancro T24 utilizzando RTqPCR. BAX (A), BIRC5 (B), CTNNB1 (C) i livelli di mRNA sono stati misurate normalizzati con i livelli di mRNA del gene housekeeping β -actina. L'RNA è stato estratto da cellule non trattate (CTRL) e da cellule T24 trattate per 24h con XVX (2.5 μ g/ml), BC (50 μ g/ml), o XVX+BC (2.5 μ g/ml XVX+ 50 μ g/ml BC). Tre esperimenti in replicato ognuno con con tre campioni sono stati analizzati per ogni replicato. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

I trattamenti con XVX e XVX+BC sono in grado di incrementare significativamente i livelli di espressione del gene pro-apoptotico BAX ($p=0.012$; $p=0.042$, rispettivamente), come mostrato in Figura 23 A, senza modificare i livelli di espressione del gene anti-apoptotico BCL-2. È stato già dimostrato che l'aumento del rapporto BAX/BCL2 mRNA è associato con l'induzione del processo apoptotico.

Come mostrato in figura 34 B, BIRC5 (Survivin) mostra livelli di espressione significativamente ridotti dopo trattamenti con XVX ($p=0.045$) e XVX +R2 ($p=0.044$). La survivina è un membro della famiglia di Inibitor of Apoptosis Proteins (IAP), la quale protegge le cellule dall'innescare del processo apoptotico. Il ruolo pro-survival della survivina consiste in una interferenza con il

clivaggio e attivazione della caspase 9, la caspase iniziatrice che regola l'induzione dell'apoptosi intrinseca [Altieri *et al* 2013].

Quindi la sopravvivenza down regolata può esporre le cellule cancerose T24 all'effetto citotossico dei composti fitochimici, così come precedentemente osservato per la curcumina [Guo *et al* 2013].

Inoltre, come mostrato in Figura 23 C, 2.5 µg/ml XVX, 50 µg/ml R2 e la loro combinazione sono in grado di ridurre significativamente i livelli di espressione del gene CTNNB1 ($p=0.002$ per XVX, $p=0.003$ per R2 e $p<0.001$ per XVX+R2). I nostri risultati indicano che i trattamenti con XVX +R2 mostrano un marcato effetto nella down regolazione dei livelli di espressione di CTNNB1. È già stato dimostrato che la riduzione dei livelli di espressione della β -catenina, ottenuta tramite la tecnica dell'RNA interference, può causare un'importante riduzione, pari a circa il 50%, del tasso di proliferazione delle cellule di cancro alla vescica T24 [Yang *et al* 2011]. Quindi, noi ipotizziamo che la riduzione dei livelli di espressione del gene pro-survival CTNNB1, esercitata dalla combinazione di XVX e R2, può giustificare la riduzione del tasso di proliferazione che non può essere attribuito ai meccanismi di apoptosi. Nonostante R2 non sia citotossico come XVX, come mostrato dai suoi valori di IC_{50} in cellule tumorali T24, lo specifico contributo di R2, in combinazione con XVX, è associato con l'attivazione del pathway di apoptosi estrinseca, dovuto a un notevole incremento nei livelli di attività della caspase 8 (Figura 35), che a sua volta induce un incremento di 1.5 volte nei livelli di attività della caspase 3.

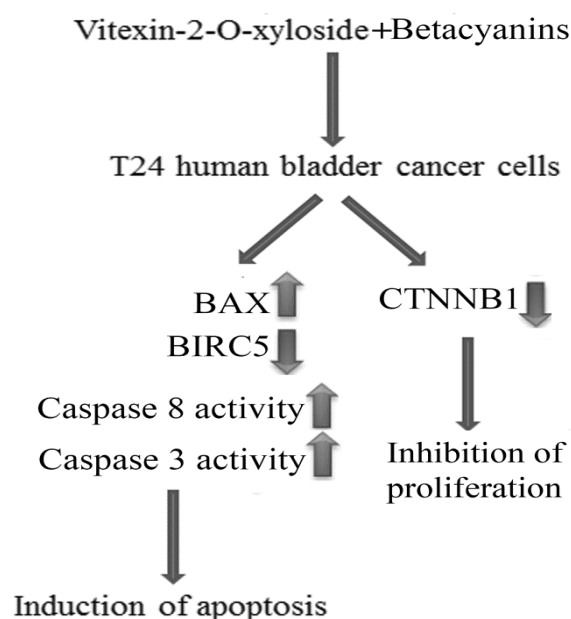


Figura 35. Pathways molecolari di induzione di apoptosine di inibizione di proliferazione mediata dalla combinazione di XVX e R2 nelle cellule T24. La combinazione dei trattamenti è in grado di incrementare i livelli di espressione di BAX, downregolare il gene antiapoptotico BIRC5 e incrementare i livelli di attività delle caspasi 3 e 8, legate all'induzione dell'apoptosi. D'altronde, i trattamenti combinati down regolano i livelli d'espressione del fattore di trascrizione Pro-survival CTNNB1 (β -catenina), portando alla inibizione della proliferazione delle cellule T24.

R2 non è in grado di down regolare BIRC5 o up-regolare i livelli di espressione di BAX, mostrando che non può attivare il pathway di apoptosi intrinseca in cellule tumorali T24 p53 mutate, come mostrato da Nowacki et al [Nowacki *et al* 2015] nelle cellule tumorali HT29 p53 mutate.

XVX induce un rilevante incremento nei livelli di attività della caspase 3, innescato dalla over espressione del gene pro apoptotico BAX e dalla down regolazione del gene apoptotico BIRC5 (survivin). Entrambi gli eventi sono legati all'induzione del pathway intrinseco di apoptosi [Khan *et al* 2007].

Nelle cellule tumorali T24, trattate con la nostra mix XVX+R2, noi abbiamo mostrato che R2 attiva solo il pathway di apoptosi estrinseca, mentre XVX induce l'apoptosi intrinseca, nonostante le mutazioni nel gene TP53, perché è probabilmente un promotore della produzione di ROS, che danneggia direttamente i mitocondri [Papi et al 2013].

La combinazione anti cancro esercitata da XVX e BC in cellule T24 è causata dall'attivazione di entrambi i pathway di apoptosi (intrinseco ed estrinseco), e dalla down regolazione del gene pro-survival CTNNB1, un evento che può portare ad un rilevante effetto antiproliferativo (Figura 34), come già dimostrato in cellule tumorali della vescica T24 [Yang *et al* 2011].

Dal momento che abbiamo dimostrato che le betalaine hanno un effetto antitumorale sulle cellule di tumore al colon CaCo-2 [Farabegoli et al 2017] ed è stato dimostrato che il tumore al colon è in grado di metastatizzare nel fegato [Ferlay *et al* 2007] abbiamo deciso di effettuare saggi di citotossicità anche in due linee cellulari di epatocarcinoma: HepG2 e HUH7.

Cellule HepG-2

Dai dati sperimentali (Figura 36) risulta che XVX è in grado di indurre citotossicità nelle cellule di epatocarcinoma HepG2 con un effetto dose risposta (da 23 a 92 μM) durante tutto il time course: 24,48 e 72h.

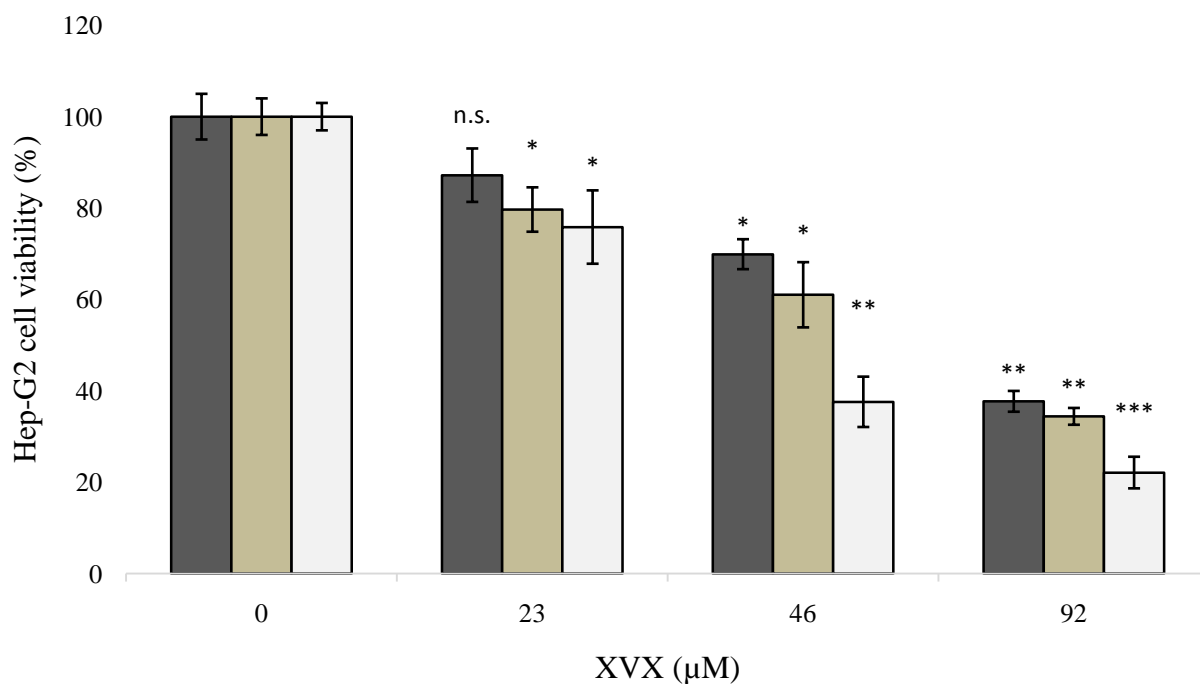


Figura 36. Effetto citotossico di XVX in cellule tumorali Hep-G2 dopo 24, 48 e 72h di incubazione sono stati eseguiti 3 replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Per quanto riguarda le betalaine (Figura 37) queste molecole sono state molto meno efficaci di XVX nell'indurre un'effetto citotossico nelle cellule HepG2. Questo effetto è risultato significativo solamente alle 48 e alle 72 h, alla concentrazione massima testata (25 $\mu\text{g/ml}$) sia per R1 che per R2.

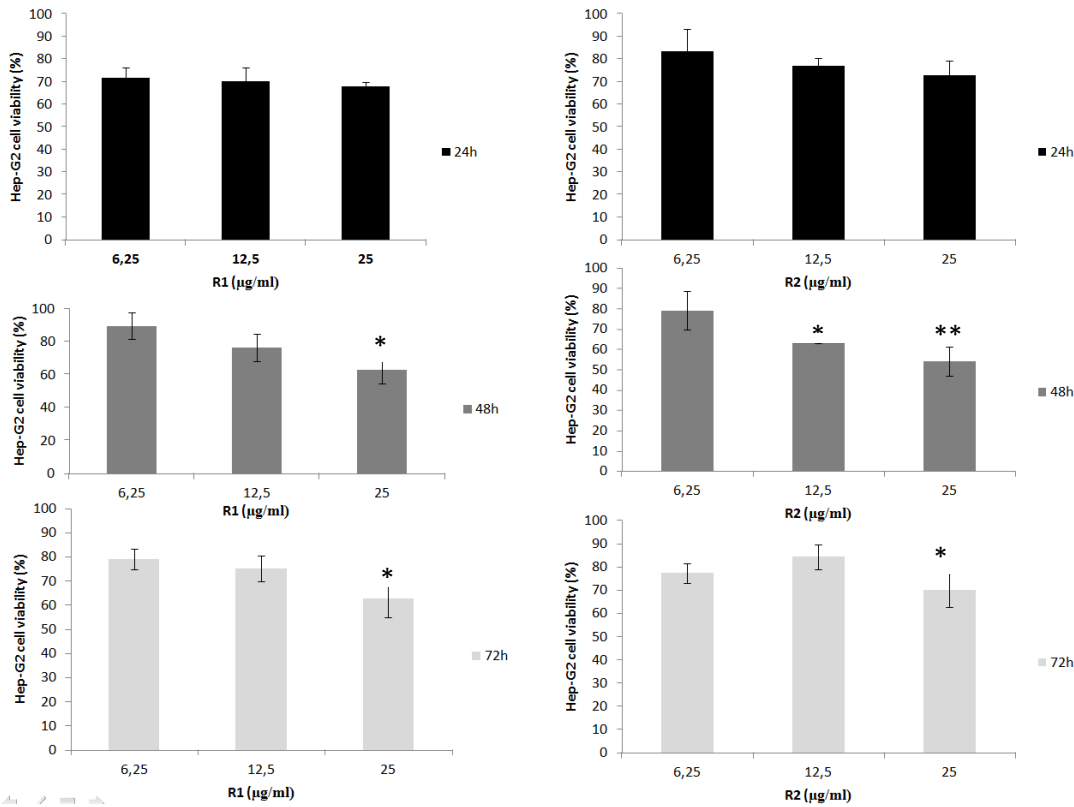
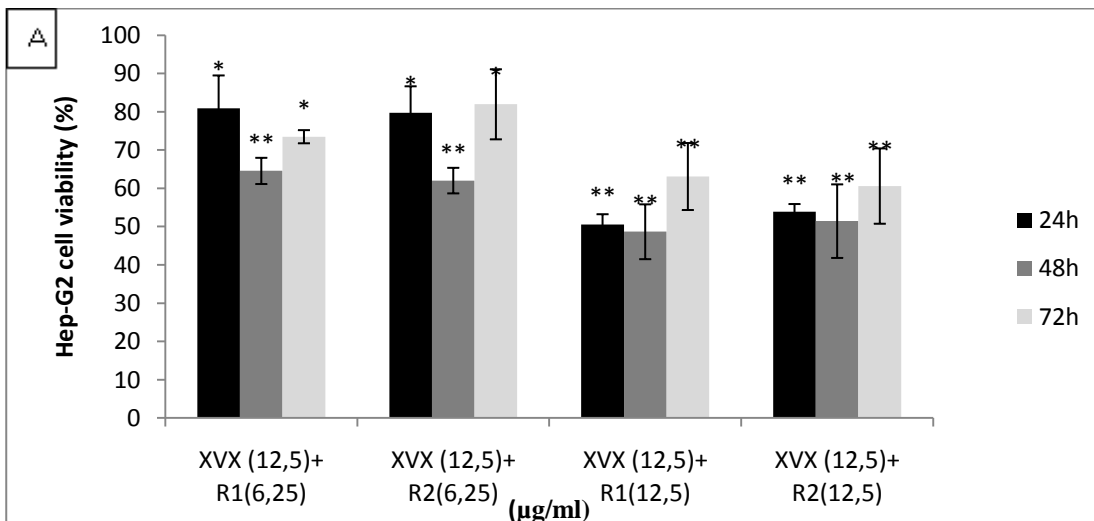


Figura 37. Effetto citotossico di R1 e R2 in cellule tumorali Hep-G2 dopo 24, 48 e 72h di incubazione. Sono stati eseguiti 3 replicati dell'esperimento con 3 prove per ogni campione sono state realizzate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Una volta individuate le singole citotossicità si è poi passati a testare le combinazioni di XVX+ R1 per indagare una risposta citotossica dose-tempo dipendente (Figura 38 A). Dai dati si evidenzia un significativo abbassamento della vitalità a 48 h, per poi rialzarsi a 72 h. La figura 38 B mostra come ci siano significativi effetti citotossici della combinazione XVX+R2 sia a 48 che 72h.



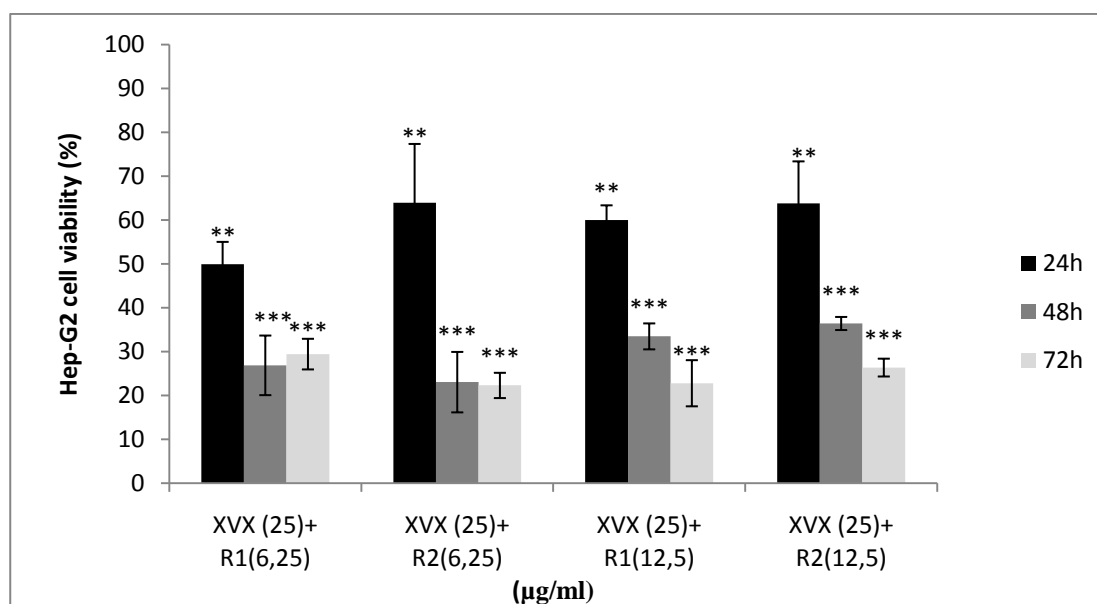


Figura 38. Effetto citotossico della combinazione di XVX+R1 e XVX+R2 in cellule tumorali Hep-G2 dopo 24, 48 e 72h di incubazione. A) XVX 12.5 (µg/ml) +R1 o R2. B) XVX 25 (µg/ml) +R1 o R2. Tre replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione sono state realizzate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Cellule Huh7

Questi studi sono stati eseguiti presso il laboratorio del Prof. Gerald Rimbach, Università degli Studi di Kiel (Germania), dove come dottoranda mi sono recata per un periodo di 3 mesi.

Le cellule Huh7 sono state incubate per 24h con concentrazioni crescenti di R1B (beta xantine), R2B (beta cianine) e R3C (neobetanina e acidi fenolici). La figura 39 mostra come nessuno dei trattamenti ha indotto un effetto citotossico statisticamente significativo. Dal momento che le cellule tumorali si sono adattate a vivere in un ambiente pro-ossidante ed i ROS sono in grado di indurre mutazioni che portano ad un aumento del numero di cellule cancerose, abbiamo deciso di investigare l'abilità delle nostre betalaine nell'aumentare l'attività di Nrf2, il master regulator della risposta antiossidante. I dati della figura 40 mostrano come i trattamenti con 10 µg/ml e 75 µg/ml di R2B e con 10 µg/ml e 100 µg/ml di estratto intero di bietola rossa siano in grado di aumentare significativamente i livelli di attività del fattore trascrizionale Nrf2. In più abbiamo dimostrato (Figura 41) che anche i trattamenti con 10, 50 e 75 µg/ml di R3C e con 10 e 100 µg/ml di R1 B sono in grado di aumentare i livelli di attività nelle cellule Huh7. Con l'obiettivo di individuare i geni bersaglio di Nrf2 (Figura 42). Regolati dalle nostre betalaine, sono stati eseguiti degli

esperimenti di RTqPCR per analizzare i livelli di mRNA dei geni Eme Ossigenasi-1 (HO1), glutathione synthetase (GSS) e Gamma-glutamyl cysteine synthetase (GCS). I nostri dati mostrano che nessuno dei trattamenti con R1, R2 ed R3 è stato in grado di aumentare i livelli di espressione di HO1 (Figura 43), GSS (Figura 44) e (GCS) (Figura 45), nonostante il controllo positivo con sulforafano 5 μ M sia stato in grado di aumentare i livelli di mRNA di HO1 di circa 50 volte (dati non mostrati) e di GSS di circa 2 volte. Questi risultati ci hanno fatto ipotizzare che i markers molecolari regolati dalle betalaine nelle cellule Huh7 possano essere altri, come ad esempio i geni NQO1 oppure G6PD (Figura 42).

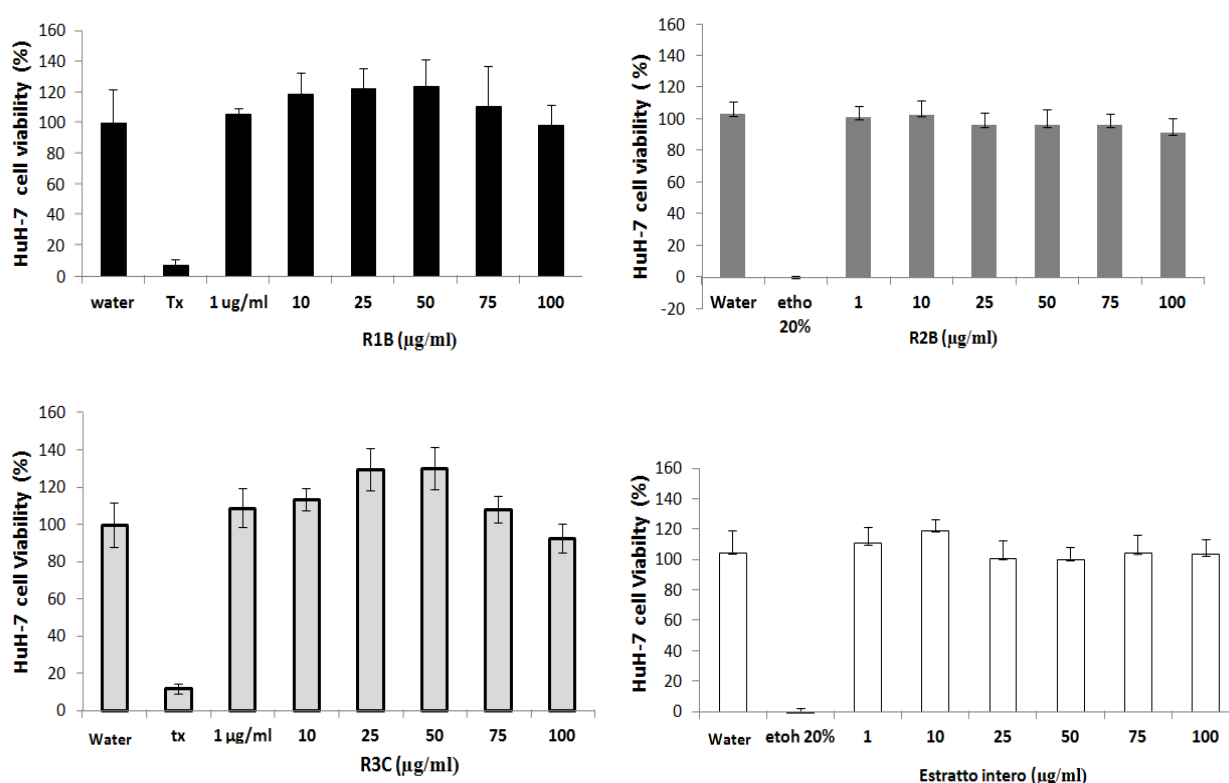


Figura 39. Attività citotossica delle frazioni R1B, R2B, R3C testate a varie concentrazioni su cellule Huh7 per 24 h. Tre replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione sono state realizzate.

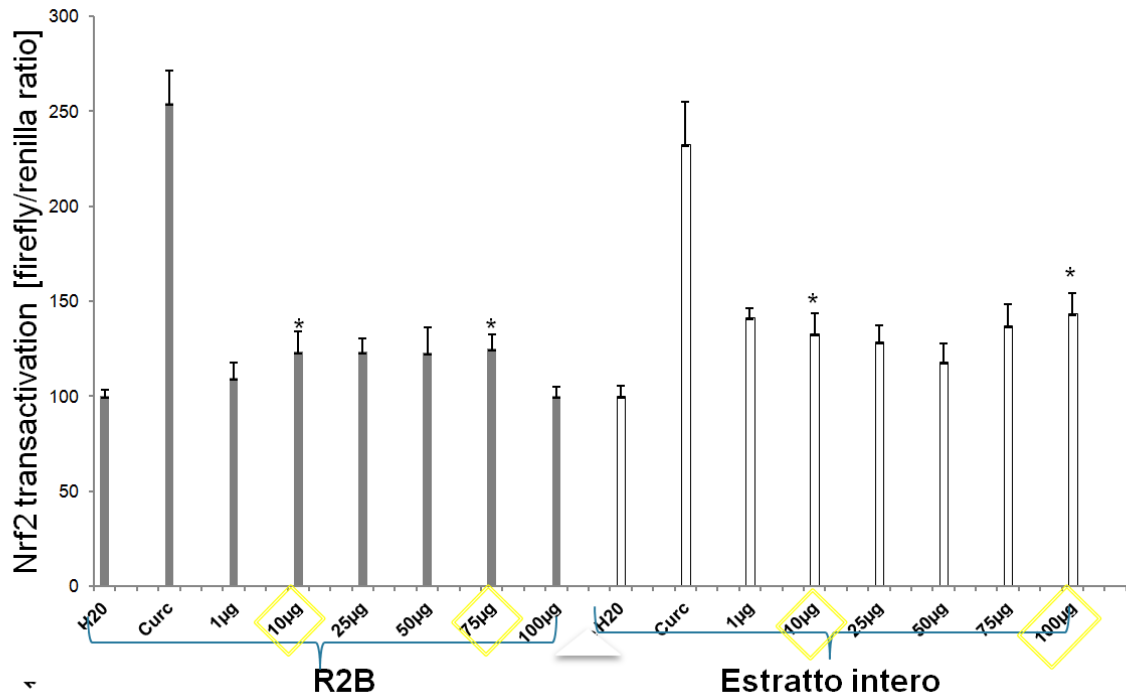


Figura 40. Transfezione transiente di Nrf2 in cellule Huh7 incubate per 24h con R2B e estratto grezzo. * Indica le concentrazioni con effetto significativo che sono state scelte per gli esperimenti di RTqPCR. Tre replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione sono state realizzate.

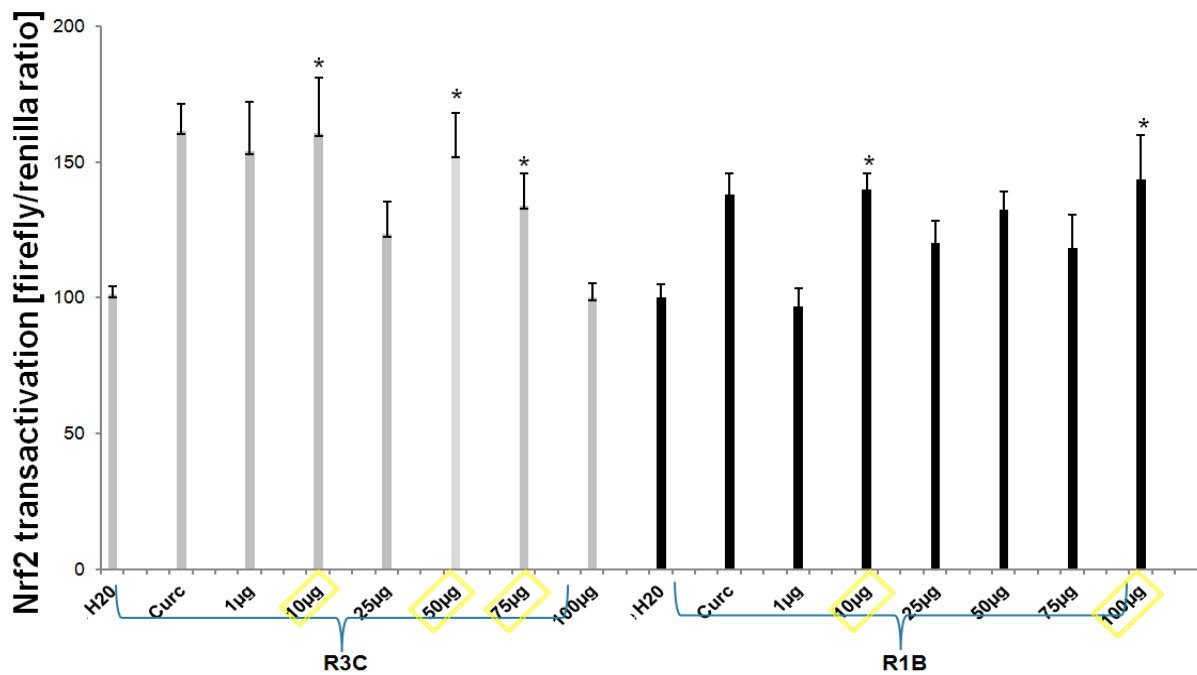
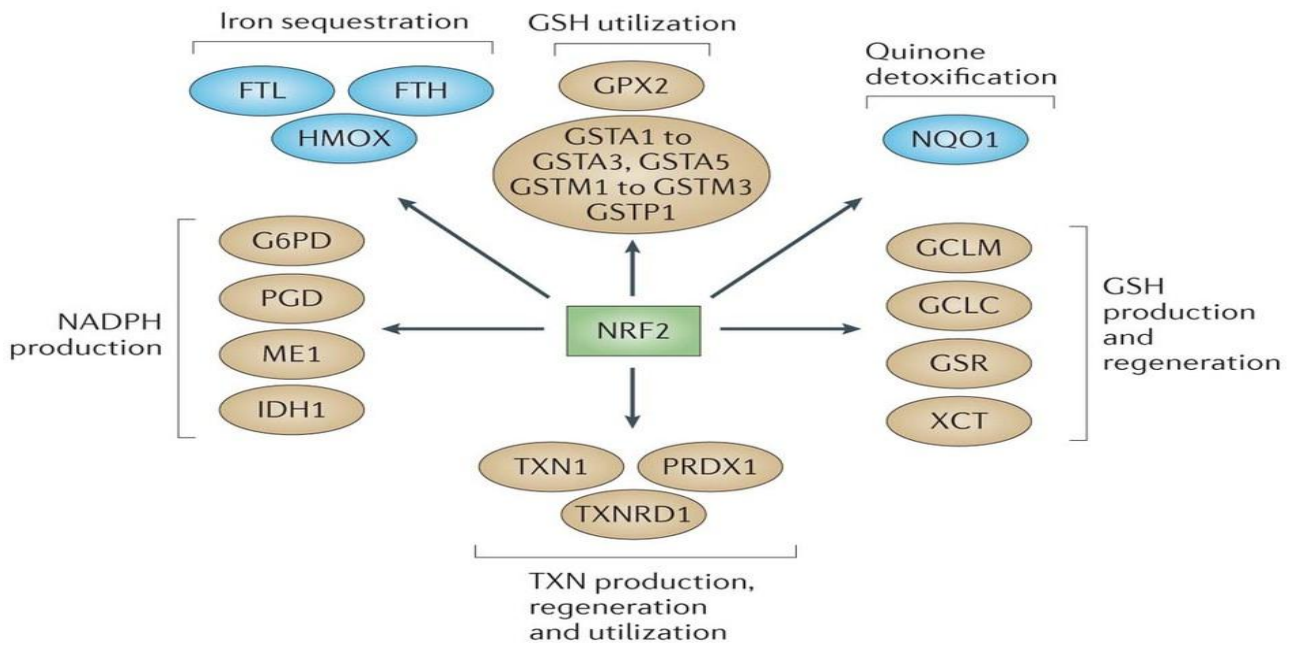


Figura 41. Trasfezione transiente di Nrf2 in cellule HuH-7 incubate per 24h con R3C e R1B. Curc indica la curcumina utilizzata come controllo interno dell'esperimento. * Indica le concentrazioni con effetto significativo che sono state scelte per gli esperimenti di RTqPCR. Tre replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione sono state realizzate.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 42. NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2-RELATED FACTOR 2 (Nrf2) e network di segnali in cui è coinvolto per controllare lo stress ossidativo.

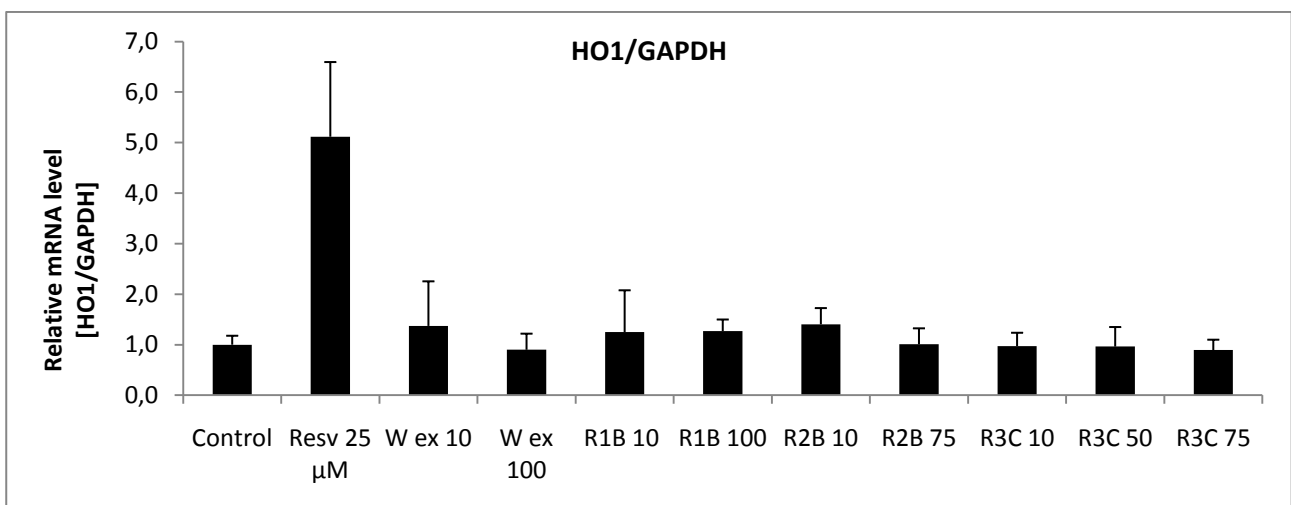


Figura 43. RTqPCR per l'analisi dei livelli di mRNA del gene marker Heme oxygenase 1 (HO1) e del gene housekeeping Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Sono stati eseguiti 3 esperimenti indipendenti in triplicato.

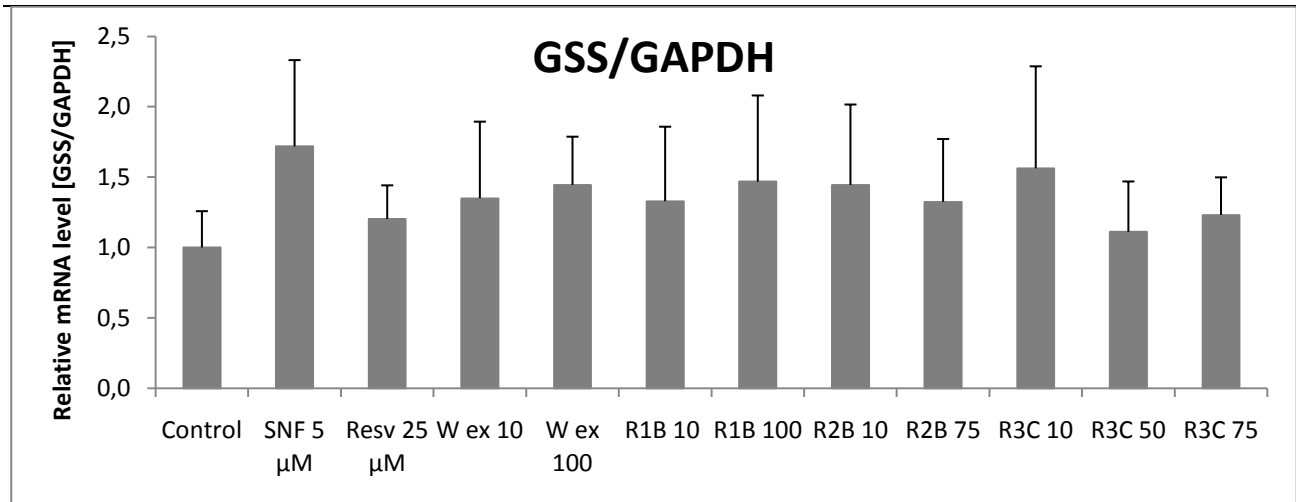


Figura 44. RTqPCR per l'analisi dei livelli di mRNA del gene marker Glutathione sintasi (GSS) e del gene housekeeping Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Sono stati eseguiti 3 esperimenti indipendenti in triplicato.

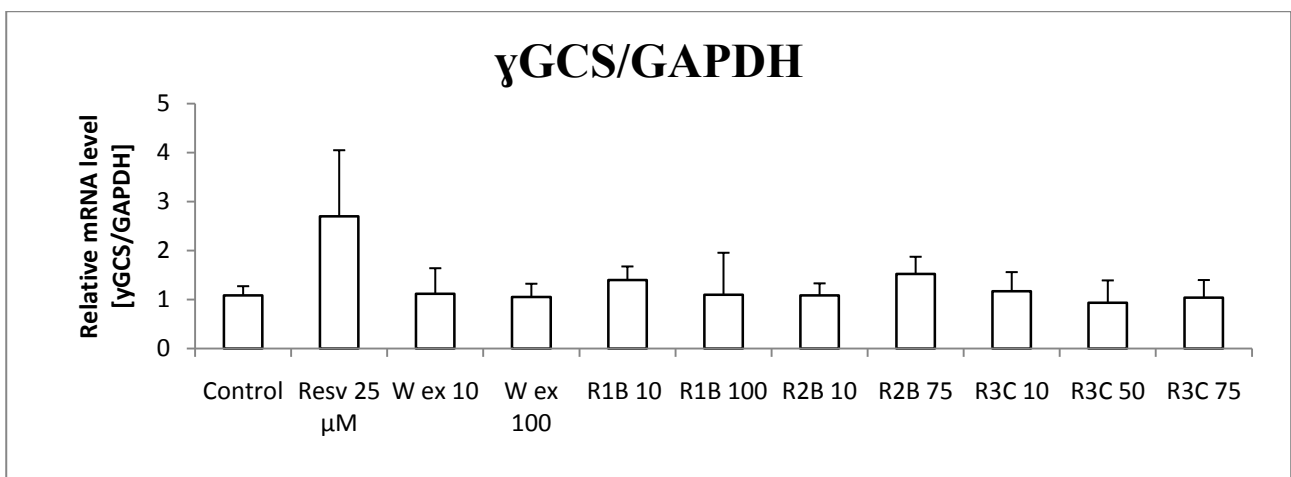


Figura 45. RTqPCR per l'analisi dei livelli di mRNA del gene marker Gamma-glutamylcisteine sintetasi (γ GCS) e del gene housekeeping Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Sono stati eseguiti 3 esperimenti in triplicato.

Cellule di glioblastoma C6

Questi studi sono stati eseguiti presso il laboratorio del Prof Ralph Dringen, Università degli studi di Bremen, dove come dottoranda mi sono recata per un periodo di 3 mesi.

In Brema abbiamo deciso di testare se le nostre betacianine erano in grado di indurre citotossicità anche nella linea cellulare C6 di glioblastoma, che oggi è un problema sempre più preoccupante [Can *et al.* 2016].

Nel laboratorio di Brema, i saggi dell'attività dell'enzima LDH, eseguiti sulle cellule C6 per 24, 48 e 72h non hanno evidenziato nessun effetto citotossico significativo in questa linea cellulare di glioblastoma (Figura 46). Questi risultati sono probabilmente legati alla difficoltà da parte delle nostre molecole naturali di passare la membrana cellulare di queste cellule C6 di glioblastoma.

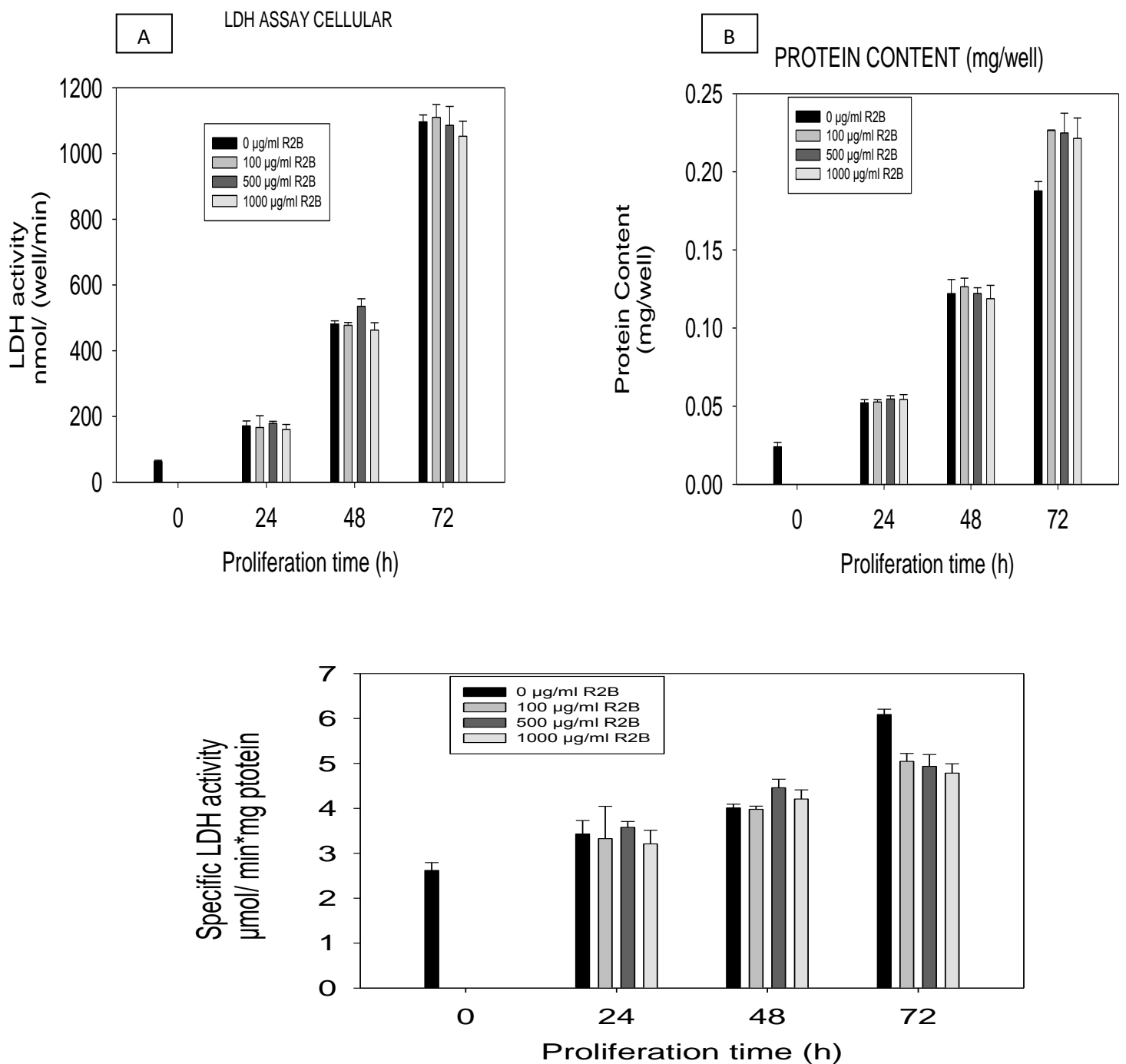


Figura 46. A) Effetto citotossico di R2B in cellule di glioblastoma C6 dopo 24, 48 e 72h di incubazione. La citotossicità è stata valutata tramite saggio della LDH intracellulare. I dati relativi a LDH extracellulare non sono mostrati in quanto nella frazione extracellulare il segnale era pari a zero. B) Contenuto proteico delle cellule di glioblastoma trattate con R2B. C) Attività specifica di cellule di glioblastoma C6 trattate per 24,48 e 72 h con differenti concentrazioni dell'estratto R2B. Tre replicati dell'esperimento con tre prove per ogni campione sono state realizzate.

CONCLUSIONI

Il presente studio è stato intrapreso per dimostrare le proprietà antitumorali delle Betalaine su cellule cancerose intestinali ed epatiche, nonché della vescica urinaria. Lo studio ha richiesto l'isolamento della betalaine dall'estratto di radice di bietola rossa e la successiva separazione in frazioni delle beta cianine (BC) dalle beta xantine (BX). Non era infatti mai stato stabilito chiaramente se le proprietà antitumorali attribuite al succo di bietola fossero ascrivibili alle BC o alle BX o a entrambe. La separazione delle due componenti è stata possibile con una cromatografia a scambio ionico messa a punto dal nostro laboratorio.

La cromatografia è stata realizzata con la fase stazionaria, DEAE FF equilibrata in TP pH 7.5. Abbiamo seguito l'eluizione di betaxantine (BX) e betacianine (BC) con un gradiente salino da 0 a 0.08M NaCl, e poi con un secondo gradiente da 0.08M a 0.25M NaCl.

L'eluizione con il primo gradiente ha staccato nettamente il picco delle betaxantine (BX, R1) e delle betacianine (BC, R2). R1 ed R2 sono stati poi desalificati con cromatografia per gel filtrazione. L'analisi HPLC/MS ci ha rivelato una composizione molecolare omogenea solo per il picco R2, che conteneva esclusivamente betacianine. Per quanto riguarda R1, esso conteneva una netta maggioranza di BX con una contaminazione di BC e gomprenine. R1 ed R2 sono stati applicati nelle prove di citotossicità su vari tipi di cellule, valutandone la concentrazione con spettrofotometria di assorbimento.

Le betacianine R2 si sono dimostrate agenti citotossici più potenti delle betaxantine R1 sulle linee tumorali CaCo2 ed T24, mentre hanno dimostrato scarsa citotossicità sulle cellule HepG2 e Huh7 e nessuna citotossicità su cellule di glioblastoma C6. Il maggiore effetto delle BC è probabilmente dovuto alla componente glicosilata della betanina, che come avviene per altri flavon-glicosidi, entra più agevolmente nelle cellule attraverso il carrier del glucosio o di altri glucosidi fisiologici.

La seconda ragione della maggiore citotossicità delle BC riguarda la loro migliore capacità di interferenza nelle vie di segnale intracellulare. Infatti gli studi eseguiti a livello di biologia cellulare e molecolare hanno mostrato una maggiore capacità delle BC (10 volte in più rispetto alle BX) di indurre un effetto citotossico nelle cellule T24, tramite attivazione dell'apoptosi.

Le proprietà citotossiche delle BC e BX sono state testate usando prima le molecole individualmente e poi in combinazione con XVX, il principale flavonoide citotossico presente nei semi di bietola verde. I nostri risultati hanno mostrato che XVX, BX e BC, usati individualmente hanno un effetto citotossico sulle cellule tumorali CaCo2 e che principalmente XVX e BC mostrano

il loro effetto citotossico sulle cellule T24. Come già accennato, BX era scarsamente citotossico sulle cellule T24.

Per quanto riguarda le cellule CaCo-2, BX e BC hanno mostrato un comportamento ormetico, con citotossicità più alta nell'intervallo 0.25-0.35 ug/ml. Superato questo intervallo di concentrazione, la vitalità cellulare veniva recuperata, probabilmente grazie all'innescò di un meccanismo di salvataggio dovuto alla forte capacità antiossidante delle BC e BX. Più esplicitamente dai nostri studi è emerso che a basse concentrazioni le betalaine sono citotossiche perché intervengono interferendo negativamente nel network di segnali che controllano la proliferazione cellulare, mentre a più alte concentrazioni prevaleva il loro effetto di "radical-scavenging" con recupero della vitalità cellulare. Nelle cellule CaCo2 le combinazioni di XVX+BX, XVX+BC e XVX+BX+BC hanno prodotto un significativo incremento dell'effetto citotossico con una sinergia esplicita a 72h. Le cellule CaCo-2 sono caratterizzate da una mutazione nel gene TP53 e dall'over espressione delle proteine del sistema Multi Drug Resistance (MDR), che rendono queste cellule tumorali molto resistenti all'induzione dell'apoptosi [Piccirillo *et al* 2009]. Tuttavia, le nostre molecole BX, BC e XVX usate individualmente e maggiormente nella tripla combinazione hanno innescato il processo apoptotico, tramite una riduzione dei livelli della proteina anti-apoptotica Bcl2 e un aumento dei livelli della proteina pro-apoptotica Bax. L'aumento del rapporto Bax/Bcl2 viene considerato come un indicatore di attivazione del pathway intrinseco-mitochondriale dell'apoptosi [Khan *et al* 2008]. Le molecole segnale pro-apoptotiche effettrici, rappresentate dalla caspase 3 clivata e da PARP1 clivato, erano aumentate di conseguenza. La caspase 3 ricopre un ruolo centrale nell'esecuzione dell'apoptosi cellulare, in quanto è responsabile del taglio proteolitico e della inattivazione di PARP1, un enzima nucleare coinvolto nel riparo dei danni al DNA. Questi risultati mostrano che esiste un potenziale effetto chemio-preventivo esercitato dalla tripletta BC+BX+XVX nel tumore al colon. La tripletta BC+BX+XVX ha anche un effetto pro-apoptotico addizionale, dimostrato nel nostro lavoro [Farabegoli *et al* 2017], che consiste nell'inibire i livelli di espressione di COX-2 e di IL-8, che sono markers fondamentali del sistema pro-infiammatorio sul quale le cellule tumorali contano per mantenere la loro spinta proliferativa. Venendo meno questi markers pro-infiammatori, la cellula riceve un impulso addizionale pro-apoptotico che è misurabile con la diminuzione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Figura 47).

Nel nostro lavoro abbiamo studiato gli effetti citotossici delle betalaine (BC e BX) e di XVX anche sulle cellule di tumore alla vescica T24, che sono anch'esse resistenti a numerosi farmaci antitumorali (Massari F *et al* 2015), a causa dell'over espressione del sistema MDR [Shimada *et al* 2011] e alle mutazioni nel gene TP53 [Savio AL, 2014].

Su queste cellule, la frazione R1, contenente BX, non ha mostrato effetti antiproliferativi, mentre la frazione R2, contenente BC, ha mostrato un marcato effetto antiproliferativo, con una IC₅₀ pari a 99.8 ± 19.9 µg/ml a 72h.

XVX ha mostrato sulle T24 un effetto anti proliferativo dose/risposta ancora più marcato. L' IC₅₀ di XVX era pari a 5.1 ± 0.5 µg/ml a 72h. Le stesse concentrazioni di XVX e BC, che erano in grado di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali T24, non mostravano nessun effetto citotossico sui cheratinociti umani sani NCTC 2544. La combinazione XVX+BC aveva il più alto effetto sinergico anti proliferativo alle 24h. XVX induceva un notevole aumento nell'attività della caspase 3, mediante l'over espressione del gene pro-apoptotico BAX e la down regolazione del gene anti-apoptotico BIRC5 (Survivina). Entrambi gli eventi sono legati all'induzione del pathway intrinseco di apoptosi, con l'attivazione della caspase 3. Sebbene le BC non siano così citotossiche come XVX sulle T24, lo specifico contributo delle BC, nella combinazione con XVX, è stato fondamentale per l'attivazione del pathway estrinseco di apoptosi, favorendo un notevole aumento dell'attività della caspase 8, la quale ha portato ad un aumento di 1,5 volte dei livelli di attività della caspase 3. Inoltre, i risultati del nostro studio indicano che il trattamento combinato XVX+BC è stato in grado di downregolare notevolmente i livelli di espressione di CTNNB1, il gene che codifica per la β-catenina.

Yang W. et al. hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di espressione di β-catenina causa una notevole diminuzione (circa il 50%) della proliferazione delle cellule tumorali T24 [Yang *et al* 2011]. Quindi, la riduzione dei livelli di espressione del gene pro-survival CTNNB1, ottenuta con la combinazione di XVX con BC, contribuisce alla riduzione del tasso di proliferazione osservato nelle cellule tumorali T24, probabilmente perché questo gene è fondamentale per le interazioni della cellula tumorale con il micro ambiente, un aspetto questo che sta richiamando un notevole interesse dei ricercatori nel campo delle terapie antitumorali.

Volendo sintetizzare i nostri risultati ottenuti sulle T24 possiamo concludere che l'effetto antitumorale della combinazione XVX+BC è causato dall'induzione dell'apoptosi sia estrinseca che intrinseca e dalla downregolazione del gene pro-survival CTNNB1.

Lo schema riportato in Figura 47 riassume gli effetti citotossici e i meccanismi molecolari dei composti da noi studiati, con particolare riferimento alle cellule CaCo-2 e T24.

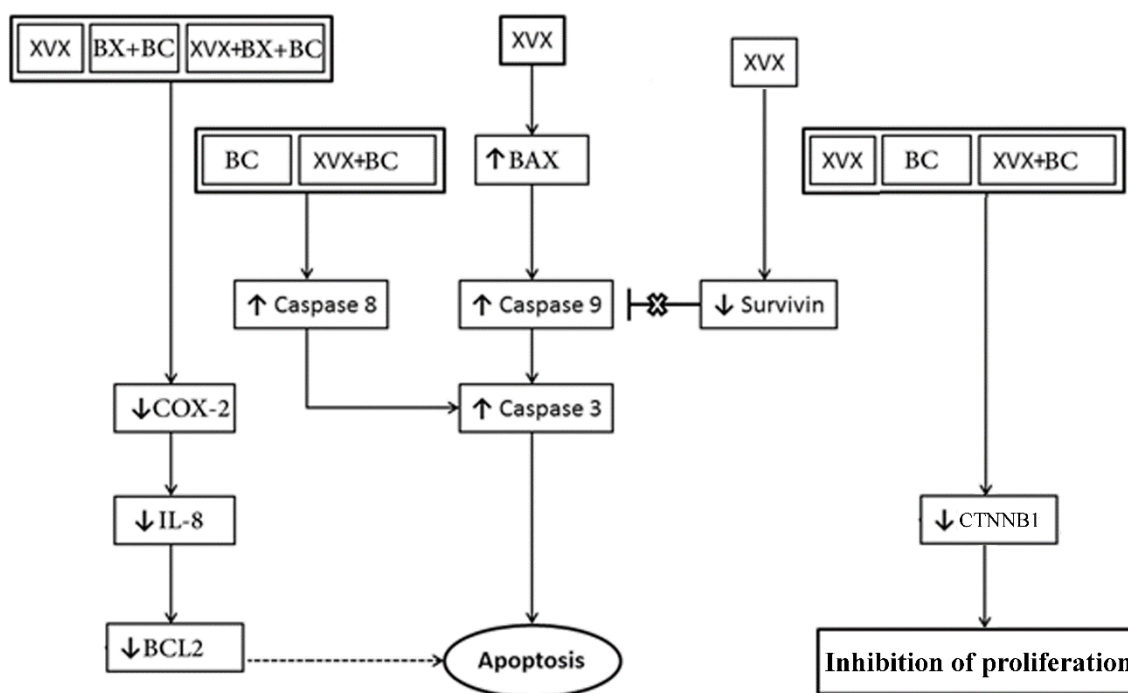


Figura 47. Pathways di biologia molecolare del cancro regolati da XVX, BX e BC individualmente e in combinazione. Quando le sigle delle molecole sono incluse nello stesso riquadro significa che sia in forma singola che in combinazione esplicano l'effetto indicato con le frecce.

In conclusione, XVX, BX e BC rappresentano una combinazione di composti fitochimici biodisponibili [Ninfali *et al* 2013; Tesoriere *et al* 2013], che può essere usata per la chemioprevenzione dei tumori al colon e alla vescica urinaria.

Gli effetti sui pathways apoptotici esercitati dalla combinazione delle betalaine con XVX forniscono un supporto logico alla applicazione di queste molecole naturali nella prevenzione e terapia dei tumori del colon e della vescica. L'effetto citotossico debole delle betalaine sulle cellule epatiche Huh7 e HepG2 non incoraggia particolarmente lo studio ulteriore di applicazioni chemiopreventive delle betalaine per i tumori epatici. Tuttavia diventa interessante, nei casi in cui l'effetto citotossico è scarso o nullo, l'effetto antiossidante e protettivo delle betalaine, che potrebbero ridurre i danni dovuti alla elevata citotossicità delle molecole usate nella chemioterapia convenzionale. Da questo punto di vista è interessante, per l'applicazione antiossidante di Bx e BC, il fatto che la co-somministrazione di BC con doxorubicina, un farmaco convenzionale antitumorale efficace ma tossico ad alte dosi, ne riduce significativamente gli effetti tossici, probabilmente

riducendo la produzione di ROS indotti dalla doxorubicina [Kapadia *et al* 2011; Kapadia *et al* 2013).

I composti fitochimici analizzati in questo studio possono colpire sia la massa delle cellule tumorali che over-proliferano e probabilmente anche la popolazione di cellule cancerose staminali, che è stata peraltro identificata nelle cellule di cancro alla vescica T24 [Wu *et al* 2013]. Le Betalaine e XVX meritano pertanto attenzione per una continuazione della sperimentazione nel campo delle terapie antitumorali mediante esperimenti *in vivo* su animali geneticamente modificati.

BIBLIOGRAFIA:

- Altieri D. C., 2013, *Targeting survivin in cancer*. Cancer Lett., **332**: 225-228.
- Andreu-Sevilla, A. J., Lòpez-Nicolàs, J. M.; Carbonelli-Baracchina, À. A., & Garcia Carcia carmona, F. (2011). *Comparative effect of the addition of α -, β -, or γ -cyclodextrin on main sensory and physic-chemical parameters*. Journal of Food Science , **76**, S347-S353.
- Attoe, E. L., & von Elbe, J. H. (1985). *Oxygen involment in betaine degradation: Effect of antioxidants*. Journal of food Science, **50**: 106-110.
- Azeredo, H. M. C., Santos, A. N., Souza, A. C. R., Mendes, K. C. B., & Andrade, M. I. R. (2007) *Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract*. American Journal of Food Technology, **2**: 307-312.
- Baker R.G., Hayden M.S., Ghosh S. (2001); *NF- κ B, inflammation, and Metabolic Disease*. Cell Metab. **13**: 11–22.
- Bamidele, O., Akinnuga, A. M., Olorunfemi, J. O., Odetola, O. A., Opraji, C. K., & Ezeigboi, N. (2010). *Effects of aqueous extract of Basella alba leale on hematological and biochemical parameters in albino rats*. African journal of biotechnology, **9**: 6952-6955.
- Barbosa, M. I. M. J., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). *Light stability of spray-drier bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations*. Food research international, **38**: 989-994.
- Bell P.G., Walshe I.H., Davison G.W., Stevenson E., Howatson G. (2014); *Montmorency cherries reduce the oxidative stress and inflammatory responses to repeated days high-intensity stochastic cycling*. Nutrients. **6**: 829–843.
- Bond V., Jr., Curry B.H., Adams R.G., Asadi M.S., Millis R.M., (2013). *Haddad G.E. Effects of dietary nitrates on systemic and cerebrovascular hemodynamics*. Cardiol. Res. Pract. 435–629.
- Bondonno C.P., Downey L.A., Croft K.D., Scholey A., Stough C., Yang X., Considine M.J., Ward N.C., Puddey I.B., Swinny E., et al. (2014); *The acute effect of flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach on cognitive performance and mood in healthy men and women*. Food Funct. **5**: 849–858.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A. M., Livrea, M. A. (2002). *Antioxidant activities of sicilian prickly pear (Opuntia ficus-indica) fruit extracts and reducing proprieties of its betalains: Betanin and indicaXanthin*. Journal

-
- of Agricultural and indicaxantin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 6895-6901.
- Cai Y.Z., Sun M., Corke H. (2005). *Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae*. *Trends in Food Science & Technology*; **16**: 370–376.
 - Cai, Y., Corke, H. (2000). *Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments*. *Journal of Food Science*, **65**: 1248-1252.
 - Calixto J.B., Campos M.M., Otuki M.F., Santos A.R. (2004); *Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules*. *Planta Med.* **70**: 93–103.
 - Castellanos-Santiago E., Yahia E.M. (2008). *Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **56**: 5758–5764.
 - Castro-Munoz, R., Barragan-Huerta, B. E., & Yanez-Fernandez. J. (2014). *Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (Opuntia stricta)*. *LWT- Food Science and technology*.
 - Cejudo-Bastante M.J., Chaalal M., Louaileche H., Parrado J., Heredia F.J. (2014). *Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **62**(33): 8491-8499.
 - Celermajer D.S. (1997); Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J. Am. Coll. Cardiol.* **30**: 325–333.
 - Cerezal M.P., Nuñez L.D. (1996). *Characterización del colourante de remolacharaja (Beta vulgaris L.) empolvo*. *Alimentaria*; **1**: 91–94.
 - Cermak N.M., Gibala M.J., van Loon L.J.C. (2012). *Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists*. *Int. J. Sports Nutr. Exerc.* **22**: 64–71.
 - Chethana S., Nayak C.A., Raghavarao K. (2007). *Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains*. *Journal of Food Engineering*; **81**(4): 679–687.
 - Chik, C. T., Abdullah, A., Abdullah, N., & Mustapha, W. A. W. (2011). *The effect of maltodextrin and additive added towards pitaya juice powder total pheolic content and antioxidant activity* (**9**: 224-228). Presented at the International Conference on Food Engineering and Biotechnology (IPCBEE).
 - Clifford T, Howatson G, West DJ, Stevenson EJ. (2015). *The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease*. *Nutrients*. **14**;7(4): 2801-22.

-
- Cohen-Inbar O., Zaaroor M., (2016). *Immunological Aspects of Malignant Gliomas*. Can J Neurol Sci. 43(4):494-502.
 - Das S., Williams D.S., Das A., Kukreja R.C. (2013) *Beet root juice promotes apoptosis in oncogenic MDA-MB-231 cells while protecting cardiomyocytes under doxorubicin treatment*. J. Exp. Second. Sci. **2**: 1–6.
 - Davignon J., Ganz P. (2004); Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. **109**: 27–32.
 - De la Torre J.C., Stefano G.B. (2000); *Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: The role of constitutive nitric oxide*. Brain Res. Rev. **34**:119–136.
 - Delgado-Vargas F., Jimenez A.R., Paredes-Lopez O. (2000). *Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition; **40**: 173–289.
 - Delgado-Vargas F., Paredes-López O. (2002). *Anthocyanins and Betalains*. In: Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press. Boca Raton; 167–220.
 - Delgado-Vargas, F., Jiménez. A. R., & Paredes-López, O. (2000). *Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability*. Critical reviews in food Science and nutrition, **40**: 173-289.
 - Desobry, S. A., Netto, F. M., & Labuza, T. P. (1997). *Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation*. Journal of Food Science, **62**: 1158-1162.
 - Diaz, F., Santos, E., Kerstupp, S., Villagómez, R., & Scheivar, L. (2006). *Colorant extract from red prickly pear (*Opuntia lasiacantha*) for food application*. Electronic journal of environmental, Agricultural and Food Chemistry, **2**:1330-1337.
 - Downham, A., & Collins, P. (2000). *Colouring our foods in the last and next millennium*. International Journal of Food Science and Technology. **35**: 5-22.
 - Drunkler, D. A., Fett, R., & Bordignon Luiz, M. T. (2006). *The evaluation of stability of betalains in beetroot (*Beta Vulgaris L.*) extract add to of α -, β - and γ -cyclodextrins*, Boletim do Centro de Pasquisa e Processamento de Alimentos. **24**: 259-276.
 - Eberhardt, M.V., Lee C.V., Liu, R.H., (2000). *Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples*. Nature, 405, 903-904.
 - Eid S.Y., M.Z. El-Readi, E.E. Eldin, Fatani S.H., Wink M., (2013). *Influence of combinations of digitonin with selected phenolics, terpenoids, and alkaloids on the*

-
- expression and activity of P-glycoprotein in leukaemia and colon cancer cells. Phytomedicine, 21: 47–61*
- El Gamal A.A., AlSaid M.S., Raish M., al-Sohaibani M., al-Massarani S.M., Ahmad A., Hefnawy M., al-Yahya M., Basoudan O.A., (2014); *Rafatullah S. Beetroot (Beta vulgaris L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. Mediat. Inflamm. 14: 983–952.*
 - El-Mostafa, K., El Kharrassiu, Y., Andreoletti, P., Vamecq, J., & El Kebbaj, M.S. (2014). *Nopal cactus (Opuntia ficus-indica) as a source of bioactive compounds for nutrition. Health and disease. Molecules, 19: 14879-14901.*
 - El-Tantawy E.M., Eisa G.S.A. (2009). *Growth, yield, anatomical traits and betanine pigment content of table beet plants as affected by nitrogen sources and spraying of some nutrients. Journal of Applied Sciences research; 5: 1173–1184.*
 - Esatbeyoglu T., Wagner A.E., Motafakkerazad R., Nakajima Y., Matsugo S., Rimbach G. (2014); *Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. Food. Chem. Toxicol. 73:119–126.*
 - Esatbeyoglu T., Wagner A.E., Schini-Kerth V.B., Rimbach G. (2015). *Betanin-a food colorant with biological activity. Molecular Nutrition & Food Research; 9(1): 36-47.*
 - Esatbeyoglu T., Wagner A.E., Schini-Kerth V.B., Rimbach G. (2015). *Betanin--a food colorant with biological activity. Mol Nutr Food Res. 59(1): 36-47*
 - Estevez. M., Mèndez, M.C., Vargas, S., Garcia, F., & Rodriguez, R. (n.d.). *Stabilization of a natural colorant (betalain) using particles ceramics for use in food. Retrived from < [www.mrs-mexico.org.mx/imrc/10/phps/ downloadfile.php?nombre](http://www.mrs-mexico.org.mx/imrc/10/phps/downloadfile.php?nombre)>.*
 - Farabegoli F, Scarpa ES, Frati A, Serafini G, Papi A, Spisni E, Antonini E, Benedetti S, Ninfali P. (2017) *Betalains increase vitexin-2-O-xyloside cytotoxicity in CaCo-2 cancer cells. Food Chem 218:356-364.*
 - Fang, Z., Bhandari, B. (2010). *Encapsulation of polyphenols-A review. Trends in Food Science & Technology, 21: 510-523.*
 - Ferreira, D. S., Faria, A. F., Grosso, C. R. F., & Mercandante, A. Z. (2009). *Encapsulation of blackberry anthocyanins by thermal gelation of curdian. Journal of the Brazilian Chemical Society, 20: 1908-1915.*

-
- Frank T., Stintzing F.C., Carle R., Bitsch I., Quaas D., Strass G., Netzel M. (2005). *Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans*. *Pharmacol. Res.* **52**: 290–297.
 - Frank T., Stintzing FC, Carle R, Bitsch I, Quaas D, Strass G, Bitsch R, Netzel M. (2005). *Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans*. *Pharmacol Res.* **52(4)**: 290-297.
 - Gaertner V., Goldman I.L. (2005). *Pigment distribution and total dissolved solids of selected cycles of table beet from a recurrent selection program for increased pigment*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*; **130**: 424–433.
 - Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F. (2005). *Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: The tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair*. *Planta*; **222**: 307–318.
 - Gandia-Herrero, F., Jiménez-Atiènzar, M., Cabanes, L., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2010). *Stabilization of the bioactive pigment of Opuntia fruits through maltodextrin encapsulation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 10646-10652.
 - García-Lafuente A., Guillamón E., Villares A., Rostagno M.A., Martínez J.A. (2009); *Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease*. *Inflamm. Res.* **58**: 537–552.
 - Gasztonyi M.N., Daood H., Hajos M.T., Biacs P. (2001). *Comparison of red beet (Beta vulgaris var. conditiva) varieties on the basis of their pigment components*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **81**: 932–933.
 - Georgiev V.G., Weber J., Kneschke E.M., Denev P.N., Bley T., Pavlov A.I. (2010). *Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot Beta vulgaris cv. Detroit dark red*. *Plant Food for Human Nutrition*; **65**: 105–111.
 - Georgiev V.G., Weber J., Kneschke E.M., Denev P.N., Bley T., Pavlov A.I. (2010). *Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot Beta vulgaris cv. Detroit dark red*. *Plant Foods Hum. Nutr.* **65**:105–111.
 - Gilchrist M., Winyard P.G., Aizawa K., Anning C., Shore A., Benjamin N. (2013); *Effect of dietary nitrate on blood pressure, endothelial function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes*. *Free Radic. Biol. Med.* **60**: 89–97.

-
- Gilchrist M., Winyard P.G., Fulford J., Anning C., Shore A.C., Benjamin N. (2014). *Dietary nitrate supplementation improves reaction time in type 2 diabetes: Development and application of a novel nitrate-depleted beetroot juice placebo*. Nitric Oxide. **40**: 67–74.
 - Gladwin M.T., Schechter A.N., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Hogg N., Shiva S., Lundberg J.O. (2005); *The emerging biology of the nitrite anion*. Nat Chem Biol. **1**: 308–314.
 - Gonçalves L.C.P., de Souza Trassi M.A., Lopes N.B., Dorr F.A., dos Santos M., Baader W.J., Oliveira Jr. V.X., Bastos E.L. (2012). *A comparative study of the purification of betanin*. Food Chemistry; **131**: 231–238.
 - Grajek W.H., Walkowiak-Tomczak D. (1997). *Factors influencing the denitrification rate of red beet juice by the bacteria Paracoccusdenitrificans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **45**: 1963– 1966.
 - Griffiths, J. C. (2005). *Coloring foods and beverages*. Food Technology. **59**: 38-44.
 - Guo L. D., Chen X. J., Hu Y. H., Yu Z. J., Wang D. and Liu J. Z., *Phytother. Res.*, 2013, **27**: 422-430.
 - Halliwell B. (1994) *Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence?* Lancet. **344**: 721–724.
 - Hamburg, A., & Hamburg, A. (1991). *The stability properties of red beet pigments: influence of pH, temperature and some stabilizers*. Medicine Faculty of Landbouw University Genetics, **56**: 1693-1695.
 - Hamprecht B., Loffler F., (1985). *Primary glial cultures as a model for studying hormone action*. Methods Enzymol. **109**: 341–345.
 - Han X.H., Gao Z.J., Xiao X.G. (2009). *Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants*. African Journal of Biotechnology; **8**: 6735–6744.
 - Hang, A. S., & Von Elbe, J. H. (1986). *Stability comparison of two betacyanine pigments- Amaranthine and betanine*. Journal of Food Science, **51** (3): 670-674.
 - Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzng, F. C., & Carle, R. (2006). *Structural and chromatic stability of purple pitaya (Hylocereus polyrhizus [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives*. Food research international, **39**: 667-667.
 - Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). *Betalain stability and degradation- structural and chromatic aspects*, Journal of food science, **71**: R41-R50.
 - Hilpert, H., & Dreiding, A. S. (2007). *Betalains-the colors of succulents. Historical review of chemical works in Zurich*. In 75 th Anniversary of the zurich succulent plant collection. Zurich. Retrived from <https://www.uzh.ch/oci/ssl-dir/efiles/betalain.pdf>.

-
- Hobbs D.A., Goulding M.G., Nguyen A., Malaver T., Walker C.F., George T.W., Lovegrove J.A. (2013). *Acute ingestion of beetroot bread increases endothelium-independent vasodilation and lowers diastolic blood pressure in healthy men: A randomized controlled trial*. *J. Nutr.* 143:1399–1405.
 - Hobbs D.A., Kaffa N., George T.W., Methven L., Lovegrove J.A. (2012). *Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects*. *Brit. J. Nutr.* **108**: 2066–2074.
 - Hohnholt M.C., Geppert M., Dringen R. (2011). *Treatment with iron oxide nanoparticles induces ferritin synthesis but not oxidative stress in oligodendroglial cells*. *Acta Biomater* **7**: 3946–3954.
 - Howatson G., McHugh M.P., Hill J.A., Brouner J., Jewell A.P., van Someren K.A., Shave R., Howatson S.A. (2010); *Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running*. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* **20**: 843–852.
 - Jackman R.L., Smith J.L. (1996). *Anthocyanins and betalains*. In: *Natural food colourants*. Blackie Academic & professional; 244–309.
 - Joris P.J., Mensink R.P. (2013); *Beetroot juice improves in overweight and slightly obese men postprandial endothelial function after consumption of a mixed meal*. *Atherosclerosis*. **231**: 78–83.
 - Kaimainen, M., Laaksonen, O., Jarvenpaa, E., Sandell, M., & Huopalahti, R. (2015). *Consumer acceptance and stability of spray dried betanin in model juices*. *Food Chemistry*, **187**: 398-406.
 - Kannan K., Jain S.K. (2000); *Oxidative stress and apoptosis*. *Pathophysiology*. **7**: 153–163.
 - Kanner J., Harel S., Granit R. (2001). *Betalains—a new class of dietary cationized antioxidants*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **49**: 5178–5185.
 - Kanner J., Harel S., Granit R. (2001); *Betalains A New Class of Dietary Cationized Antioxidants*. *J. Agric. Food. Chem.* **49**: 5178–5185.
 - Kanner J, Harel S, Granit R. (2001). *Betalains--a new class of dietary cationized antioxidants*. *J Agric Food Chem.* **49(11)**: 5178-85.
 - Kapadia G.J., Azuine M.A., Rao G.S., Arai T., Iida A., Tokuda H. (2011). *Cytotoxic effect of the red beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract compared to doxorubicin (Adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines*. *Anti -Cancer Agent Med. Chem.* **11**: 280–284.

-
- Kapadia G.J., Azuine M.A., Sridhar R., Okuda Y., Tsuruta A., Ichiishi E., Mukainakec T., Takasakid M., Konoshimad T., Nishinoc H., et al. (2003); *Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot*. Pharmacol. Res. **47**:141–148.
 - Kapadia G.J., Rao G.S., Ramachandran C., Iida A., Suzuki N., Tokuda H. (2013); *Synergistic cytotoxicity of red beetroot (Beta vulgaris L.) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines*. J. Complement. Med. **10**: 113–122.
 - Khan N., Afaq F. and Mukhtar H., (2007), *Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth*. *Carcinogenesis*, **28**, 233-239.
 - Kearsley, M. W., & Katsaboxakis, K. Z. (1980). *Stability and use of natural colours in foods Red beet powder, cooper chlorophyll powder and cochineal*. International journal of food Science & technology, **15**: 501-514.
 - Kelly J., Fulford J., Vanhatalo A., Blackwell J.R., French O., Bailey S.J., Gichrist M., Winyard P.G., Jones A.M. (2013). *Effects of short-term dietary nitrate supplementation on blood pressure, O₂ uptake kinetics, and muscle and cognitive function in older adults*. Am. J. Physiol. -Reg. I. **304**:73–83.
 - Kenjale A.A., Ham K.L., Stabler T., Robbins J.L., Johnson J.L., Vanbruggen M., Privette G., Yim E., Kraus W.E., Allen J.D. (2011); *Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease*. J. Appl. Physiol. **110**: 1582–1591.
 - Kenjale AA, Ham KL, Stabler T, Robbins JL, Johnson JL, Vanbruggen M, Privette G, Yim E, Kraus WE, Allen JD. (2011). *Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease*. J Appl Physiol;**110**(6):1582-1591.
 - Khan N., Adhami V.M., Mukhtar H. (2008). *Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer*. Biochemical Pharmacology. **76**: 1333–1339
 - Khan N., Afaq F. and Mukhtar H., (2007), *Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth*. *Carcinogenesis*, **28**: 233-239.
 - Khan, M. I., & Giridhar, P. (2014). *Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in Rivina humilis L. berry Juice*. LWT-Food Science and technology, **58**: 649-657.
 - Khan, M. I. & Giridhar, P. (2015). *Plant betalains: Chemistry and biochemistry*. Phytochemistry. **117**: 267-295.

-
- Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. (2014); *Mechanisms of nitrite bioactivation*. Nitric Oxide. **38**: 58–68.
 - Kobayashi N., Schmidt J., Wray V., Schliemann W. (2001). *Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins*. Phytochemistry; **56**: 429–436.
 - Kohen R., Nyska A. (2002); *Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol. Pathol. **30**: 620–650.
 - Koopman G., Reutelingsperger C. P. M., Kuijten G. A. M., Keehnen R. M. J., Pals S. T. and vanOers M. H. J., (1994), Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, **84**: 1415-1420
 - Krajka-Kuźniak V., Paluszczak J., Szaefer H., Baer-Dubowska W. (2013); *Betainin a beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying/antioxidant enzymes in human liver cell lines*. Br. J. Nutr. **110**: 2138–2149.
 - Krajka-Kuźniak V., Szaefer H., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. (2012); *Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats*. Food. Chem. Toxicol. **50**: 2027–2033.
 - Krishnaiah, D., Nithyanandam, R., & Sarbatly, R. (2014). *A critical review on the spray drying of fruit extract: Effect of additives on physicochemical properties*. Critical Reviews in Food Science and nutrition, **54**: 449-473.
 - Kujala T.S., Vienola M.S., Klika K.D., Loponen J.N., Pihlaja K. (2002). *Betalain and phenolic compositions of four beetroot (Beta vulgaris) cultivars*. European Food Research and Technology; **214**: 505–511.
 - Kujawska M., Ignatowicz E., Murias M., Ewertowska M., Mikołajczyk K., Jodynis-Liebert J. (2009); *Protective effect of red beetroot against carbon tetrachloride- and N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress in rats*. J. Agric. Food Chem. **57**: 2570–2575.
 - Kundu J.K., Surh Y.J. (2012); *Emerging avenues linking inflammation and cancer*. Free Radic. Biol. Med. **52**: 2013–2037.
 - Kuusi, T., Pyysalo, H., & Pippuri, A. (1977). *The effect of iron, tin alluminium, and chromium on fading, discoloration, and precipitation in berry and red beet juices*. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung. **163**: 196-202.

-
- Lansley K.E., Winyard P.G., Bailey S.J., Vanhatalo A., Wilkerson D.P., Blackwell J.R., Gilchrist M., Benjamin N., Jones A.M. (2011); *Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance*. Med. Sci. Sports Exerc. **43**:1125–1131.
 - Lechner J.F., Wang L.S., Rocha C.M., Larue B., Henry C., McIntyre C.M., Riedl K.M., Schwartz S.J., Stoner G.D. (2010); *Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats*. J. Med. Food. **13**: 733–739.
 - Lee M.J., Park J.S., Choi D.S., Jung M.Y. (2013). *Characterization and Quantitation of Anthocyanins in Purple-Fleshed Sweet Potatoes Cultivated in Korea by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS/MS*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **61**(12): 3148–3158.
 - Lee Y.S., Choi I., Ning Y., Kim N.Y., Khatchadourian V., Yang D., Chung H.K., (2012). *Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis*. British Journal of Cancer, **106**: 1833–1841
 - Lejeune, B., Pouget, M.-P., & Pourrant, A. (1983). *Le rouge de betterave. Essais de stabilisation et utilisation dans la formulations des gels*. Problematic Techniques, **31**: 638-643.
 - Lewellen R., Panella R., Harveson R. (2009). *Introduction — botany of the beet plant*. Compendium of the beet diseases and insects; 2–3.
 - Lidder S., Webb A.J. (2013). *Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway*. Br. J. Clin. Pharmacol. **75**: 677–696.
 - Lima, E.m, Bosch, P., Loera, S., Ibarra, I. A., Laguna, H., & Lara, V. (2009). *Non toxic hybrid pigments: Sequestering betanindinchromophores on inorganic matrices*. Applied Clay Science, **42**(3): 478-482.
 - Liu R.H. (2003); *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*. Am. J. Clin. Nutr. **78**: 517–520.
 - Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010); *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacol. Rev. **4**: 118–126.
 - Loksuvan, J. (2007). *Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin*. Food Hydrocolloids, **21**: 928-935.
 - Lu G., Edwards C.G., Fellman J.K., Mattinson D.S., Navazio J. (2003). *Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **51**: 1026–1029.

-
- Lundberg J.O., Carlström M., Larsen F.J., (2011); Weitzberg E. *Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease*. Cardiovas Res. **89**: 525–532.
 - Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. (2008). *The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics*. Nat. Rev. **7**: 156–167.
 - Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. (2008). *The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics*. Nature Reviews Drug Discovery; **7**: 156–67.
 - Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. (2005); *Oxidative stress and vascular disease*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **25**: 29–38.
 - Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. (2005); *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am. J. Clin. Nutr. **81**: 230–242.
 - Manchali, S., Murthy, K. N. C., Nagaraju, s., & neelwarne, B. (2013). *Stability of betalain pigments of red beet*In B. Neelwarne (Ed.) Boston, MA; Springer, US. Red beet biotechnology (55-74).
 - Maud R. G., & Robert, R. (1931). *A survey of anthocyanins. I*. Biochemical journal, **25 (5)**: 1687-1705.
 - Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). *The mechanism of co-pigmentation of autocyanins in aqueous solution*. Phytochemistry, **29**: 1097-1102.
 - Mazzaricchio, P., Pifferi, P., Kindt, M., Munyaneza, A., & Barbioli, G. (2004). *Interactions between anthocyanins and organic food molecule in model systems*. International Journal of Food Science & technology, **39**: 53-59.
 - Mee S.P.H., Lee V., Baldwin J.E., Cowley A. (2004). *Total synthesis of 5,5',6,6'-tetrahydroxy-3,3'-biindolyl, the proposed structure of a potent antioxidant found in beetroot (Beta vulgaris)*. Tetrahedron; **60**: 3695–3712.
 - Merin, U., Gagel, S., Popel, G., Bernstein, S., & Rosenthal, I. (1987). *Thermal degradation kinetics of prickly-pear-fruit red pigment*. Journal of Food Science, **52 (2)**: 485-486.
 - Molina, G. A., Coulson, A. R., Cortez-Valadez, M., Garcia-Hernandez, F., & Estevez, M. (2014). *Effects of tetraethyl orthosilicate (TEOS) on the light and temperature stability of a pigment from Beta vulgaris and its potential food industry applications*. Molecules, **19**: 17985-18002.
 - Monteiro R., Azevedo I. (2010). *Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome*. Mediat. Inflamm.

-
- Moshhammer. M. R., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). *Development of a process for the production of a betalain-based colouring food stuff from cactus pear*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **6** (2): 221-231.
 - Mosshammer M.R., Stintzing, F.C., Carle R. (2005). *Colour studies on fruit juice blends from Opuntia and Hylocereus cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom*. *Food Research International*; **38**: 975–981.
 - Nayak, C. A., & Rastogi, N. K. (2010). *Effect of selected additives on microencapsulation of anthocyanin by spray drying*. *Drying Technology*, **28**: 1396-1404.
 - Netzel M., Stintzing F.C., Quaas D., Strass G., Carle R., Bitsch R., Frank T. (2005); *Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans*. *Food. Res. Int.* **38**: 1051–1058.
 - Nguyen T., Nioi P., Pickett C.B. (2009); *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. *J. Biol. Chem.* **284**:13291–13295.
 - Nilsson T. (1970). *Studies into the pigments in beetroot (Beta Vulgaris L. ssp. Vulgarisvar. rubra L.)*. *Lantbrukshogskolans Annaler*; **36**: 179-219.
 - Ninfali P., Angelino D. (2013). *Nutritional and functional potential of Beta vulgaris cicla and rubra*. *Fitoterapia*; **89**: 188–199.
 - Ninfali P., Bacchiocca M. (2003). *Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **51**: 2222–2226.
 - Ninfali P., Chiarabini A., Angelino D. (2014). *The ORAC/kcal ratio qualifies nutritional and functional properties of fruit juices, nectars, and fruit drinks*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **65**: 708–712
 - Ninfali P., Mea G., Giorgini S., Rocchi M., Bacchiocca M. (2005). *Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition*. *British Journal of Nutrition*; **93**(2): 257-266.
 - Norasiha, H., Mimi saKinah, A. H., & Rohaida, C. M, (2009). *Characterization of β -cyclodextrin complexes with natural dye*. In M. M. Noor, M. M. Rahman, & K Kadirga (Eds.), Presented at the National Conference on Postgraduate Research (NCON-PGR) (pp. 98-106), UMP Conference Hall, Malaysia.
 - Nowacki, L., Vigneron P., Rotellini L., Cazzola H., Merlier F., Prost E., Ralanairina R., Gadonna J. P., Rossi C. and Vayssade M., *Phytotherapy Research*, (2015), *Betanin-Enriched Red Beetroot (Beta vulgaris L.) Extract Induces Apoptosis and Autophagic Cell Death in MCF-7 Cells*. **29**: 1964-1973.

-
- O'Byrne K.J., Dalglish A.G. (2001); *Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy*. Br. J. Cancer. **85**: 473–483.
 - Obón J.M., Castellar M.R., Alacid M., Fernández-López J.A. (2009). *Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems*. Journal of Food Engineering; **90**: 471–479.
 - Obon, J. M., Castellar, M. R., Alacid., & Fernandez-Lopez, J. A. (2009). *Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model system*. Journal of Food Engineering, **90(4)**: 471-479.
 - Otalora, M.C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., & Osorio, C. (2015). *Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents*. Food Chemistry, **187**: 174-181.
 - Ozela, E. F. (2004). *Caracterizacao de flavonoides e estabilidade de pigmentos de frutos de Bertalha (*Basella rubra* L.)*. tese Doutorado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Vicosa Vicosa, MG, Brasil.
 - Page J., Henry D. (2000); *Consumption of NSAIDs and the development of congestive heart failure in elderly patients: An under recognized public health problem*. Arch. Intern. Med. **160**: 777–784.
 - Papi A., Farabegoli F., Iori R., Orlandi M., De Nicola G.R., Bagatta M., Angelino D., *et al.* (2013). *Vitexin-2-O-xyloside, raphasatin and (-)-epigallocatechin-3-gallate synergistically affect cell growth and apoptosis of colon cancer cells*. Food Chemistry, **138**: 1521–1530
 - Pavokovic D., Krsnik-Rasol M. (2011). *Biotechnological Production of Betalains*. Food Technology and Biotechnology; **49(2)**: 145–155.
 - Piccirillo S, Filomeni G, Brüne B, Rotilio G, Ciriolo MRJ Biol Chem. (2009) *Redox mechanisms involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance versus p53-dependent apoptosis in adenocarcinoma cells*. J Biol Chem. 284(40): 27721-33
 - Pietrzowski Z., Nemzer B., Spórna A., Stalica P., Tresher W., Keller R., Jiminez R., Michalowski T., Wybraniec S. (2010). *Influence of betalin-rich extracts on reduction of discomfort associated with osteoarthritis*. New. Med. **1**:12–17.
 - Pietrzowski, Z., & Thresher, W. C. (2010). *Solid betalains composition and methods*. US 2010/0076050A1.

-
- Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E. J., & Beristain, C. I. (2010). *Antioxidative activity of microencapsules with beetroot using gum Arabic as wall material*. Food and Bioproducts Processin, **88**: 253-258.
 - Poels M.M.F., Ikram M.A., Vernooij M.W., Krestin G.P., Hofman A., Niessen W.J., van der Lugt A., Breteler M.M.B. (2008); *Total cerebral blood flow in relation to cognitive function: The Rotterdam Scan Study*. J. Cereb. Blood Flow Metab. **28**:1652–1655.
 - Powers S.K., Jackson M.J. (2008); *Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production*. Physiol. Rev. **88**:1243–1276.
 - Presley T.D., Morgan A.R., Bechtold E., Clodfelter W., Dove R.W., Jennings J.M., Kraft R.A., King R.A., Laurienti P.J., Rejeskib J., et al. (2011). *Acute effect of a high nitrate diet on brain perfusion in older adults*. Nitric Oxide. **24**: 34–42.
 - Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M. M. T., Gabr, A. M. M., Ahmed, A.R., Knorr, D., & Smetanska, I. (2014). *Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract*. Journal of Food Science and technology, **51**: 2216-2221.
 - Reddy M.K., Alexander-Lindo R.L., Nair M.G. (2005). *Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors*. J. Agric. Food Chem. **53**: 9268–9273.
 - Reddy M.K., Exander-Lindo R.L., Nair M.G. (2005). *Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **53**: 9268–9273.
 - Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. 2010. *Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?* Free Radic. Biol. Med. **49**: 1603–1616.
 - Ricciotti E., FitzGerald G.A. (2011); *Prostaglandins and inflammation*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. **31**: 986–1000.
 - Ryan L., Prescott S.L. (2010); *Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion*. Int. J. Food Sci. Technol. **45**:1191–1197.
 - Saenz, C., Tapia, S., Chàvez, J., & Robert, P. (2009). *Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear Opuntia ficus-indica*. Food Chemistry, **114**: 616-622.
 - Sarma, A. D., Sreelakshmi, Y., & Sharma, R. (1997). *Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation*. Phytochemistry, **45**: 671-674.
 - Satoh T., McKercher S.R., Lipton S.A. (2014); *Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs*. Free Radic. Biol. Med. **66**: 45–57.

-
- Schinella G.R., Tournier H.A., Prieto J.M., Mordujovich de Buschiazzo P., Ríos J.L. (2002). *Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts*. Life Sci. **70**: 1023–1033.
 - Scotter M.J., (2011). *Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. **28(5)**: 527-96.
 - Sheng H., Shao J., Morrow J.D., Beauchamp R.D., Dubois R.N. (1998). *Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells*. Cancer Research, **58**: 362–366
 - Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*. Methods Enzymol; **299**: 152-178.
 - Skopinska, A., Szot. D., & Wybraniec, S. (2015). *The effect of citric acid and matrix of B. Vulgaris L. juice on thermal stability of betalains*. PhD interdisciplinary Journal, **1**: 193-200.
 - Spilt A., Weverling-Rijnsburger A.W.E., Middelkoop H.A.M., van Der Flier W.M., Gussekloo J., de Craen A.J.M., Westendorp R.G.J. (2005); *Late-onset dementia: Structural brain damage and total cerebral blood flow*. Radiology. **236**: 990–995.
 - Sporna-Kucab, A., Wybraniec, S., Mitka, K., Kowalski, T. (2011). *Influence of metal cations on betalain stability in different solvent system used for a modern chromatographic separation technique*. Presented at the Vi Krakowska Konferencja Mlodych Uczonych, Kraków.
 - Sreekanth D., Arunasree M.K., Roy K.R., Chandramohan R.T., Reddy G.V., Reddanna P. (2007). *Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of Opuntia ficus-indica induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562*. Phytomedicine; **14**: 739–746.
 - Stella, V. J. & He. Q. (2008). *Cyclodextrins*. Toxicologic Pathology. **36**: 30-42.
 - Stintzing F.C., Carle R. (2007). *Betalains – Emerging prospects for food scientists*. Trends in Food Science & Technology; **18**: 514–525.
 - Stintzing F.C., Conrad J., Klaiber I., Beifuss U., Carle R. (2004). *Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy*. Phytochemistry; **65**: 415–422.
 - Stintzing F.C., Herbach K.M., Mosshammer M.R. (2005). *Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (Opuntia spp.) clones*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **53**: 442–451.

-
- Stintzing F.C., Kugler F., Carle R., Conrad J. (2006). *First ¹³CNMR assignments of betaxanthins*. Helvetica Chimica Acta; **89**: 1008–1016.
 - Stintzing F.C., Schieber A., Carle R. (2001). *Phytochemical and nutritional significance of cactus pear*. European Food Research and Technology; **212**: 396–407.
 - Stintzing F.C., Schieber A., Carle R. (2002a). *Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, Hylocereus polyrhizus (Weber) Britton & Rose*. Food Chemistry; **77**: 101–106.
 - Stintzing F.C., Schieber A., Carle R. (2002b). *Identification of betalains from yellow beet (Beta vulgaris L.) and cactus pear [Opuntia ficus-indica (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry; **50**: 2302–2307.
 - Strack D., Vogt T., Schliemann W. (2003). *Recent advances in betalain research*. Phytochemistry; **62**: 247–269.
 - Suh Y., Afaq F., Johnson J.J., Mukhtar H. (2009). *A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways*. Carcinogenesis, **30**: 300–307
 - Szaefer H., Krajka-Kuźniak V., Ignatowicz E., Adamska T., Baer-Dubowska W. (2014); *Evaluation of the effect of beetroot juice on DMBA-induced damage in liver and mammary gland of female Sprague-Dawley rats*. Phytother. Res. **28**: 55–61.
 - Tan D., Wang Y., Bai B., Yang X., Han J. (2015); *Betanin attenuates oxidative stress and inflammatory reaction in kidney of paraquat-treated rat*. Food Chem Toxicol. **78**: 141–146.
 - Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA. (2004). *Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans*. Am J Clin Nutr. **80(4)**:941-5.
 - Tesoriere L, Fazzari M, Angileri F, Gentile C, Livrea MA. (2008). *In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta*. J Agric Food Chem. **56(22)**:10487-92.
 - Tesoriere L., Fazzari M., Angileri F., Gentile C., Livrea M.A. (2008). *In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta*. J. Agric. Food. Chem. **56**: 10487–10492.
 - Tesoriere L., Gentile C., Angileri F., Attanzio A., Tutone M., Allegra M., Livrea M. A. (2013). *Trans-epithelial transport of the betalain pigments indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix*. European Journal of Nutrition, **52**: 1077–1087.

-
- Tesoriere L., Gentile C., Angileri F., Attanzio A., Tutone M., Allegra M., Livrea M.A. (2013).
 - Tesoriere L., Gentile C., Angileri F., Attanzio A., Tutone M., Allegra M. and Livrea M. A., (2013), *Trans-epithelial transport of the betalain pigments indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix*. Eur. J. Nutr., **52**: 1077- 1087.
 - *Trans-epithelial transport of the betalain pigments indicaxanthin and betanin across Caco-2 cell monolayers and influence of food matrix*. European Journal of Nutrition, **52**: 1077–1087
 - Tsai, P.-J., & Hsiao, S.M. (2010). *Method to stabilize liquid betalains*. US 2010/0330239 A1.
 - USDA SR23. (2010). Nutritional Info: Vinespinach, (Basella), raw. <http://skipthepie.org/vegetables-and-vegetable-products/vinespinach-basellsa-raw/> Accessed 05.01.13.
 - Vaillant F., Perez A., Davila I., Dornier M., Reynes, M. (2005). *Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (Hylocereus sp.)*. Fruits; **60**: 1–10.
 - Vanhatalo A, Fulford J, Bailey SJ, Blackwell JR, Winyard PG, Jones AM. (2011) . *Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia*. J Physiol. **589(22)**: 5517-5528.
 - Vidal P.J., López-Nicolás J.M., Gandía-Herrero F., García-Carmona F. (2014). *Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues*. Food. Chem. **154**: 246–254.
 - Vulic J.J., Cebovic T.N., Canadanovic V.M., Cetkovic G.S., Djilas S.M., Canadanovic-Brunet J.M. (2013). *Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace*. Food & Function.; **4**: 713–21.
 - Vulić J.J., Čebović T.N., Čanadanović-Brunet J.M., Četković G.S., Čanadanović V.M., Djilas S.M., Tumbas Šaponjac V.T. (2014) *In vivo and in vitro antioxidant effects of beetroot pomace extracts*. J. Funct. Foods. **6**: 168–175.
 - Webb A.J., Patel N., Loukogeorgakis S., Okorie M., Aboud Z., Misra S., Rashid R., Miall P., Deanfield J., Benjamin N., et al. (2008). *Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite*. Hypertension. **51**: 784–790.

-
- Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G., Pluta R.M., Hewett S.J., Colton C., Vitek M., Feelisch M., Grisham M.B. (2001). *Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide*. *Antioxid. Redox Signal.* **3**: 203–213.
 - Wink D.A., Hines H.B., Cheng R.Y. S., Switzer C.H., Flores-Santana W., Vitek M.P., Ridnour L.A., Colton C.A. (2011); *Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response*. *J. Leukoc. Biol.* **89**: 873–891.
 - Winkler C., Wirleitner B., Schroecksnadel K. (2005); *In vitro effects of beet root juice on stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear Cells*. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **1**: 180.
 - Wootton-Beard P.C., Moran A., Ryan L. (2011); *Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods*. *Food. Res. Int.* **44**: 217–224.
 - Wootton-Beard P.C., Ryan L. A (2011); *Beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants*. *J. Funct. Foods.* **3**: 329–334. a
 - Yang W., Chung Y. Kim G., Y., Kim T. K., Keay S. K., Zhang C. O., Hwang M. Ji, D., Kim K. P., Steen H., Freeman M. R. and Kim J., (2011), *Quantitative proteomics identifies a beta-catenin network as an element of the signaling response to Frizzled-8 protein-related antiproliferative factor*. *Mol. Cell. Proteomics*, 10, M110.007492.
 - Yoon J.H., Baek S.J. (2005). *Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties*. *Yonsei. Med. J.* **46**: 585–596.
 - Zielińska-Przyjemska M., Olejnik A., Dobrowolska-Zachwieja A., Grajek W. (2009). *In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals*. *Phytophthora Res.* **23**: 49–55

SITOGRAFIA:

<http://www.bda-ieo.it/>

<http://www.codexalimentarius.net/>

<http://www.demeter.it>

<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/689>

<http://www.salute.gov.it/>