



Università Politecnica delle Marche
Dipartimento Scienze della Vita e Dell'ambiente
AA 2019/2020

The potential role of polyphenols in the modulation of skin cell viability by
Aspalathus linearis and *Cyclopia spp.*
herbal tea extracts *in vitro*

Il potenziale ruolo dei polifenoli nella modulazione della vitalità
cellulare della pelle *in vitro* con estratti di tisane di
Aspalathus linearis e *Cyclopia spp.*

Tesi di Laurea di:
De Buono Erika

Relatore:
Dott.sa Damiani Elisabetta

"The Journal of Pharmacy and Pharmacology
of the Royal Pharmaceutical Society, 2016"

INTRODUZIONE

- I polifenoli, presenti in fonti alimentari comuni come frutta, verdura e tè, possiedono potenti proprietà antiossidanti associate alla prevenzione di varie malattie croniche e cancro
- Una delle piante più comunemente usate nei prodotti cosmeceutici e anche ampiamente studiata come agente chemiopreventivo nella pelle è il tè verde (*Camellia sinensis*)
- Rooibos (*Aspalathus linearis*) e honeybush (*Cyclopia spp.*) sono tisane sudafricane che hanno riscosso interesse per l'uso nel trattamento delle malattie della pelle



OBIETTIVI

- Lo scopo di questo studio era di indagare l'effetto di diversi estratti di rooibos e di honeybush e di selezionati componenti polifenolici sulla vitalità *in vitro* di cellule della pelle normali e cancerose, premaligne e maligne, in relazione alla loro diversa composizione polifenolica e proprietà antiossidanti
- L'attuale indagine fornisce la prima prova dei possibili meccanismi sottostanti coinvolti nell'interruzione della vitalità cellulare delle cellule di cancro della pelle umana da parte dei costituenti polifenolici di queste tisane



MATERIALI E METODI



Sono stati preparati estratti acquosi e metanolici di tè verde, rooibos e honeybush e sono poi stati effettuati:

- Analisi dei polifenoli per determinarne il contenuto totale e la quantità dei singoli polifenoli
- Saggi diversi per determinarne le proprietà antiossidanti:
 - Capacità di scavenging dei cationi dei radicali ABTS
 - FRAP o potenziale antiossidante di riduzione del ferro ferrico
 - ORAC o capacità antiossidante contro i ROS
 - Inibizione della perossidazione lipidica microsomiale indotta dal ferro (LPO)
- Studi in colture cellulari, con cellule della pelle normali (fibroblasti), premaligne (cheratinociti HaCaT) e maligne (carcinoma basocellulare)

RISULTATI: analisi dei polifenoli

Table 1 Comparative total polyphenolic and FLAVA content of green tea, rooibos and honeybush herbal tea extracts

Parameter	Extract type*	Tea and herbal teas					
		<i>Camellia sinensis</i>	<i>Aspalathus linearis</i>	<i>Cyclopia genistoides</i>	<i>Cyclopia longifolia</i>	<i>Cyclopia intermedia</i>	<i>Cyclopia subternata</i>
Total polyphenols (mg GAE/100 mg extract)	MeOH	25.65 ± 3.27 ^b _A	35.07 ± 3.44 ^a _A	21.60 ± 2.43 ^c _A	26.10 ± 2.40 ^b _A	17.21 ± 1.82 ^d _A	22.05 ± 1.51 ^c _A
	Aq	16.10 ± 2.16 ^c _B	25.05 ± 2.84 ^a _B	19.39 ± 1.39 ^b _B	23.95 ± 2.46 ^a _B	16.45 ± 2.06 ^c _A	17.50 ± 2.25 ^b _C
FLAVA (mg CE/100 mg extract)	MeOH	+ 13.23 ± 0.37 ^a _A	+ 2.71 ± 0.16 ^b _A	1.22 ± 0.16 ^d _B	1.20 ± 0.16 ^d _B	1.13 ± 0.10 ^d _B	1.40 ± 0.15 ^c _B
	Aq	7.76 ± 0.31 ^a _B	1.80 ± 0.15 ^c _B	+ 1.62 ± 0.21 ^d _A	+ 1.45 ± 0.16 ^d _A	+ 1.79 ± 0.14 ^c _A	+ 2.25 ± 0.20 ^b _A

Values represent means ± standard deviations of three replications of at least two experiments. Means in a row followed by the same letter (lower case in superscript) or in a column in upper case (for extract type) do not differ significantly; if letters differ, then $P < 0.05$. GAE, gallic acid equivalents; CE, catechin equivalents; FLAVA, flavanols/proanthocyanidins. *MeOH, methanol; Aq, aqueous.

Table 4 Concentration of individual polyphenols ($\mu\text{g}/\text{mg}$ extract) prepared from different honeybush species as determined by HPLC

<i>Cyclopia</i> spp. (Xanthone-rich)	Polyphenols	<i>Cyclopia genistoides</i>				<i>Cyclopia longifolia</i>			
		Methanol	Xan/Fla Ratio	Aqueous	Xan/Fla Ratio	Methanol	Xan/Fla Ratio	Aqueous	Xan/Fla Ratio
Xanthone	Mangiferin	156.07 \pm 4.31 _A	6:1	77.48 \pm 0.25 _B	17:1	180.04 \pm 6.18 _A	8:1	126.99 \pm 3.36 _B	19:1
	Isomangiferin	39.99 \pm 0.93 _A		30.11 \pm 0.84 _B		48.99 \pm 1.94 _A		33.09 \pm 0.78 _B	
	Total	196.06 \pm 4.66 _A		107.59 \pm 0.65 _B		229.04 \pm 5.61 _A		160.08 \pm 4.11 _B	
Flavanone	Eriocitrin	1.61 \pm 0.00 _A		1.11 \pm 0.03 _B		2.83 \pm 0.09 _A		1.82 \pm 0.08 _B	
	Hesperidin	32.94 \pm 1.03 _A		4.12 \pm 0.10 _B		24.60 \pm 0.65 _A		6.73 \pm 0.38 _B	
	Eriodictyol glucoside	1.13 \pm 0.02 _A		1.15 \pm 0.02 _A		–		–	
	Total	35.67 \pm 1.02 _A		6.38 \pm 0.10 _B		27.43 \pm 0.73 _A		8.54 \pm 0.46 _B	
Flavone	Luteolin	0.84 \pm 0.02 _A		0.16 \pm 0.01 _B		0.77 \pm 0.02 _A		0.17 \pm 0.01 _B	
	Scolymoside	–nd		–		4.30 \pm 0.10 _A		3.30 \pm 0.11 _B	
	Total	0.84 \pm 0.02 _A		0.16 \pm 0.01 _B		5.07 \pm 0.11 _A		3.47 \pm 0.12 _B	
DHC	Phloretin-3',5'-di-C-glucoside	2.54 \pm 0.08 _A		2.30 \pm 0.02 _B		1.31 \pm 0.25 _A		0.83 \pm 0.08 _B	
Benzophenone	Iriflophenone-3-C-glucoside	20.76 \pm 0.35 _A		16.95 \pm 0.25 _B		12.55 \pm 0.98 _A		8.81 \pm 0.61 _B	
<i>Cyclopia</i> spp. (Flavanone-rich)	Polyphenols	<i>Cyclopia intermedia</i>				<i>Cyclopia subternata</i>			
Xanthone	Mangiferin	67.70 \pm 2.16 _A	1:1	39.77 \pm 0.41 _B	6:1	62.57 \pm 1.46 _A	1:1	22.02 \pm 2.99 _B	2:1
	Isomangiferin	20.02 \pm 0.71 _A		14.26 \pm 0.40 _B		15.95 \pm 0.26 _A		8.70 \pm 1.46 _B	
	Total	87.77 \pm 2.87 _A		54.04 \pm 0.75 _B		78.52 \pm 1.26 _A		30.72 \pm 4.45 _B	
Flavanone	Eriocitrin	2.93 \pm 0.20 _A		1.25 \pm 0.06 _B		5.25 \pm 0.25 _A		3.27 \pm 0.25 _B	
	Hesperidin	88.77 \pm 11.55 _A		7.32 \pm 0.56 _B		63.15 \pm 8.62 _A		7.98 \pm 0.21 _B	
	Eriodictyol glucoside	0.39 \pm 0.00 _A		–		3.14 \pm 0.21 _B		3.87 \pm 0.20 _A	
	Total	92.10 \pm 11.74 _A		8.57 \pm 0.62 _B		71.54 \pm 9.07 _A		15.12 \pm 0.23 _B	
Flavone	Luteolin	3.62 \pm 0.27 _A		0.23 \pm 0.01 _B		1.10 \pm 0.06 _A		0.13 \pm 0.05 _B	
	Scolymoside	0.96 \pm 0.14		–		9.16 \pm 0.31 _A		4.03 \pm 0.13 _B	
	Total	4.58 \pm 0.26 _A		0.23 \pm 0.01 _B		10.26 \pm 0.37 _A		4.16 \pm 0.09 _B	
Dihydrochalcone	Phloretin-3',5'-di-C-glucoside	0.65 \pm 0.03 _A		0.68 \pm 0.01 _A		14.13 \pm 0.88 _A		12.53 \pm 1.42 _B	
Benzophenone	Iriflophenone-3-C-glucoside	3.91 \pm 0.27 _A		3.63 \pm 0.11 _A		13.69 \pm 0.35 _A		9.32 \pm 0.16 _B	

Values represent means \pm standard deviations of triplicate determinations. Comparison between aqueous and methanol extracts was analysed by Student's *t*-test and significant differences are indicated if $P < 0.05$. Means for each tea or herbal tea (in a row) followed by the same upper case letters in subscript do not differ significantly; if letters differ, then $P < 0.05$. DHC, dihydrochalcones; Xan/Fla ratio, xanthone-to-flavanone ratio. nd, not detected.

RISULTATI: proprietà antiossidanti

Table 5 Comparative antioxidant capacity of green tea, rooibos and honeybush herbal tea extracts utilising different antioxidant assays

Antioxidant assay	Extract type*	Tea and herbal teas					
		<i>Camellia sinensis</i>	<i>Aspalathus linearis</i>	Xanthone-rich <i>Cyclopia genistoides</i> <i>Cyclopia longifolia</i>		Flavanone-rich <i>Cyclopia intermedia</i> <i>Cyclopia subternata</i>	
ABTS (mmol TE/g extract)	MeOH	+10.90 ± 0.75 ^b _A	+11.49 ± 0.81 ^a _A	8.08 ± 0.21 ^d _B	8.41 ± 0.42 ^{cd} _B	6.68 ± 0.29 ^e _B	8.70 ± 0.31 ^c _B
	Aq	6.77 ± 0.65 ^d _B	9.08 ± 0.45 ^b _B	+8.87 ± 0.54 ^b _A	+9.37 ± 0.33 ^b _A	+8.12 ± 0.20 ^c _A	+10.09 ± 0.39 ^a _A
FRAP (mmol TE/g extract)	MeOH	3.08 ± 0.34 ^a _A	3.04 ± 0.19 ^a _A	1.77 ± 0.16 ^c _A	2.01 ± 0.14 ^b _A	1.30 ± 0.07 ^e _B	1.56 ± 0.08 ^d _B
	Aq	1.81 ± 0.14 ^{bc} _B	2.24 ± 0.18 ^a _B	1.68 ± 0.16 ^{cd} _A	1.88 ± 0.23 ^b _A	1.61 ± 0.11 ^d _A	1.67 ± 0.11 ^{cd} _A
ORAC (mmol TE/g extract)	MeOH	7.77 ± 0.09 ^e _A	14.02 ± 1.01 ^a _A	10.46 ± 0.75 ^c _A	11.91 ± 0.38 ^b _A	8.92 ± 0.22 ^d _A	10.53 ± 0.57 ^c _A
	Aq	4.37 ± 0.10 ^e _B	9.12 ± 0.53 ^a _B	7.22 ± 0.32 ^c _B	8.55 ± 0.09 ^b _B	6.57 ± 0.29 ^d _B	7.27 ± 0.23 ^c _B
rooibos > <i>C. longifolia</i> > <i>C. subternata</i> > <i>C. genistoides</i> > <i>C. intermedia</i> > tè verde							
LPO (IC ₅₀ – mg/ml)	MeOH	→ 0.23 ± 0.01 ^c _B	0.24 ± 0.01 ^c _B	0.79 ± 0.01 ^a _A	0.75 ± 0.01 ^{ab} _B	0.82 ± 0.01 ^a _B	0.66 ± 0.005 ^b _B
	Aq	0.34 ± 0.01 ^c _A	0.33 ± 0.00 ^c _A	0.89 ± 0.02 ^b _A	0.98 ± 0.01 ^{ab} _A	1.14 ± 0.01 ^a _A	0.81 ± 0.011 ^b _A

Values represent means ± standard deviations of three to five replications of at least two experiments. Means in a row (tea and herbal teas) followed by the same letter (lower case in superscript) or in upper case in a column (extract type per assay) do not differ significantly; if letters differ, then $P < 0.05$. TE, Trolox equivalents; FRAP, ferric reducing antioxidant potential; ABTS, 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); LPO, lipid peroxidation; ORAC, oxygen radical scavenging capacity. *MeOH, methanol; Aq, aqueous.

RISULTATI: modulazione della vitalità cellulare (contenuto di ATP cellulare)

Table 6 Comparative IC₅₀ concentrations of different extracts of green tea, rooibos and honeybush herbal teas on the cell viability of the different skin cells

IC ₅₀ (Cell Viability) (mg/ml)	Extract type*	Tea and herbal teas					
		<i>Camellia sinensis</i>	<i>Aspalathus linearis</i>	<i>Cyclopia genistoides</i>	<i>Cyclopia longifolia</i>	<i>Cyclopia intermedia</i>	<i>Cyclopia subternata</i>
Premalignant cells**	MeOH	+ 0.08 ± 0.01 ^c _B	+ 0.13 ± 0.02 ^c _A	0.72 ± 0.10^a_A	<u>0.72 ± 0.10^a_A</u>	<u>0.53 ± 0.07^b_A</u>	0.47 ± 0.06^b_A
	Aq	0.17 ± 0.03 ^d _A	0.15 ± 0.02 ^d _A	0.68 ± 0.11^a_A	0.51 ± 0.08 ^b _B	0.48 ± 0.08 ^{bc} _A	0.41 ± 0.09 ^c _A
Normal cells**	MeOH	+ 0.23 ± 0.06 ^d _B	0.26 ± 0.05 ^d _B	1.85 ± 0.17 ^a _A	1.14 ± 0.13 ^c _A	1.37 ± 0.17 ^b _A	1.08 ± 0.20 ^c _A
	Aq	0.34 ± 0.06 ^c _A	0.29 ± 0.05 ^c _A	→ 0.88 ± 0.19 ^a _B	0.53 ± 0.04 ^b _B	0.50 ± 0.13 ^b _B	<u>0.37 ± 0.07^c_B</u>
Malignant cells**	MeOH	+ 0.21 ± 0.06 ^d _B	0.31 ± 0.05 ^d _A	2.29 ± 0.61 ^a _A	<u>0.80 ± 0.16^c_A</u>	1.29 ± 0.23 ^b _A	1.14 ± 0.15 ^b _A
	Aq	0.41 ± 0.07 ^c _A	+ 0.26 ± 0.03 ^d _B	→ 0.94 ± 0.24 ^a _B	0.52 ± 0.09 ^b _B	<u>0.44 ± 0.10^{bc}_B</u>	0.43 ± 0.14 ^{bc} _B

Values represent means ± standard deviations of five replications of at least two experiments. Means in a row (tea and herbal teas) followed by the same letter (lower case in superscript) or in a column in upper case (extract type within each cell type) do not differ significantly; if letters differ, then $P < 0.05$. IC₅₀, IC₅₀ values in bold of MeOH extracts and aqueous extract of *C. genistoides* differ significantly ($P < 0.05$) from other cell types; Underlined IC₅₀ value differs significantly ($P < 0.05$) from the normal cell counterpart tea/herbal tea concentration yielding 50% inhibition of cell viability; ATP, adenosine triphosphate. *MeOH, methanol; Aq, aqueous. **Premalignant cells, HaCaT keratinocytes; normal cells, CRL 7761; cancer cells, CRL 7762.

DISCUSSIONE:

TE' VERDE

- Il contenuto più elevato di TP e FLAVA dell'estratto di metanolo rispetto all'estratto acquoso ha coinciso con una maggiore capacità antiossidante nei test ABTS, FRAP, ORAC e LPO, nonché una significativa riduzione nella vitalità cellulare

ROOIBOS

- Gli estratti con il più alto contenuto di polifenoli totali e capacità antiossidanti, sono stati i più attivi nel ridurre la vitalità delle cellule della pelle, mirando selettivamente alla crescita delle cellule tumorali precancerose
- La riduzione della vitalità delle cellule della pelle può coinvolgere un meccanismo simile a quello determinato da EGCG nel tè verde
- È probabile che un altro possibile meccanismo coinvolga le interazioni polifenolo-ferro

HONEYBUSH

- Gli estratti acquosi che mostrano livelli più elevati di FLAVA e una forte capacità di scavenging dei radicali (ABTS), erano più attivi contro la vitalità delle cellule della pelle
- I principali composti monomerici potrebbero agire sinergicamente con altri costituenti polifenolici minori nel proteggere le cellule prevenendo il danneggiamento delle membrane lipidiche

CONCLUSIONE



- La riduzione della vitalità cellulare della pelle è causata da:
 - › composti polifenolici monomerici in estratti di rooibos, prendendo di mira principalmente le cellule precancerose
 - › composti polifenolici polimerici simili ai flavanoli in honeybush
- È probabile che i composti polifenolici monomerici di honeybush (xantoni e flavanoni) in un rapporto specifico, mostrino effetti antiossidanti citoprotettivi
- La riduzione della vitalità cellulare, che comporta una diminuzione del contenuto di ATP, è associata a disfunzione mitocondriale derivante da difetti nel complesso della catena respiratoria presumibilmente tramite interazioni polifenolo-ferro.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!



*"Il tè è un atto completo nella sua semplicità.
Quando bevo il tè, ci siamo solo io e il tè.
Il resto del mondo si dissolve.
Non mi preoccupo per il futuro.
Non mi soffermo sugli errori del passato.
Il tè è semplice: tè sfuso, acqua calda e pura e una tazza.
Inspiro il profumo, piccoli pezzi delicati del tè
galleggiano sopra la tazza.
Bevo il tè, l'essenza delle foglie diventa parte di me."*

(Thich Nhat Hanh, monaco zen)