

Articolo di Ricerca

Identificazione e quantificazione dei methylglyoxal come componente dominante in funzione antibatterica dei mieli di Manuka (*Scoparium Leptospermum*) della Nuova Zelanda

Elvira Mavric¹, Silvia Wittmann¹, Gerold Barth² e Thomas Henle¹¹Istituto di chimica degli alimenti, Technische Universitat, Dresda, Germania²Istituto di Microbiologia, Technische Universitat T, Dresda, Germania

I composti 1,2-dicarbonilici deoxyglucosulose 3-(3-DG), gliossale (GO), e methylglyoxal (MGO) sono stati misurati con il corrispondente quinoxalino dopo derivatizzazione con orthophenylendiamine mediante RP-HPLC e rilevazioni UV in campioni di miele in commercio.

Considerando che, per i valori dei campioni per la maggior parte 3-DG, MGO, e GO erano paragonabili ai dati precedentemente pubblicati, su sei campioni di Manuka della Nuova Zelanda (*Leptospermum scoparium*) sono stati trovati elevate quantità di MGO, che vanno da 38 a 761 mg / kg, che è fino a 100 volte maggiore rispetto ai tradizionali mieli. MGO è stato inequivocabilmente identificato come corrispondente quinoxalino via fotodiode così come per mezzo della spettroscopia di massa. L'attività antibatterica del miele miele in soluzioni di 1,2-dicarbonilici verso l'*Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) è stata analizzata usando agar ben distribuito. Minime concentrazioni necessarie per l'inibizione della crescita dei batteri (minima concentrazione inibente, MIC) di MGO sono stati di 1,1 mM per entrambi i tipi di batteri.

MIC per GO è stato di 6,9 mM (*E. coli*) o 4,3 mM (*S. aureus*), rispettivamente. 3-DG non ha mostrato alcuna inibizione in concentrazioni fino a 60 mM. Considerando che la maggior parte dei campioni di miele indagati non ha mostrato alcuna inibizione in diluizioni del 80% (v/v con acqua) o al di sotto, i campioni di miele-Manuka hanno mostrato una attività antibatterica quando diluiti al 15-30%, che corrisponde a concentrazioni di MGO di 1,1-1,8 mM. Questo dimostra chiaramente che l'attività antibatterica del Miele di Manuka della Nuova Zelanda proviene direttamente da MGO.

Parole chiave: composti 1,2-dicarbonilici / 3-Deoxyglucosulose / Batteri / Glyoxal / Methylglyoxal

Ricevuto: 22 luglio 2007; revisione: 13 settembre 2007; accettato: Settembre 19, 2007

1 Introduzione

L'uso del miele come rimedio tradizionale per le infezioni batteriche è conosciuto fin dai tempi antichi. Secondo [1], una ricerca scientifica in questo campo finalizzata alla individuazione di composti antibatterici iniziata con le relazioni pionieristiche di Van Ketel nel 1892. Dold et al. [2], stabilisce il termine "Inhibine" per la luce e la temperatura sensibile nelle sostanze antibatteriche del miele senza ulteriore caratterizzazione chimica. Da allora, numerose indagini sono state intraprese al fine di spiegare l'attività antibatterica dei campioni di miele sotto effetto osmotico, o il basso valore di pH causato da vari acidi organici [3-6]. Il più noto inhibine è il perossido di idrogeno [7, 8], che è formato nel miele da glucosio ossidasi. Diversi studi, tuttavia, hanno dimostrato che alcuni campioni di miele mostrano una persistenza di una attività

antibatterica anche dopo la rimozione del perossido di idrogeno sotto catalasi [8]. È stato osservato che il miele di Manuka, derivato dalla pianta di Manuka (*Leptospermum scoparium*) in Nuova Zelanda, ha un livello molto elevato di attività antibatterica "non-perossido" [9-10]. La notevole attività antibatterica del miele di Manuka è una importante proprietà commerciale, che si riferisce a propositi commerciali come il cosiddetto "Unique Manuka Factor" (UMF), che mira ad una classificazione di prodotti di alta qualità basati su analisi microbiologiche [11]. Sebbene numerosi studi sono stati svolti per caratterizzare i componenti responsabili dell'attività antibatterica "non-perossido" del miele di Manuka [12], la chimica alla base di questo fenomeno rimane ancora poco chiara. In un recente rapporto, Weigel et al. [13] ha dimostrato che il miele contiene quantità variabili di composti 1,2-dicarbonilici tale come glyoxal (GO), methylglyoxal

(MGO), e 3-deoxyglucosulose (3-DG) oltre a 5-idrossimetilfurfurale, un noto indicatore di trattamento termico. Composti 1,2-dicarbonilici si formano nel corso della reazione di Maillard o reazioni di caramellizzazione come prodotti di degradazione dalla riduzione di carboidrati [14]. Motivato da una relazione di Suortti e Malkki [15], che ha scoperto che le soluzioni di riscaldamento di glucosio o fruttosio, rispettivamente, mostrano una marcata attività antibatterica contro *Escherichia coli* (*E. coli*), abbiamo indagato l'ipotesi se i composti 1,2-dicarbonilici presenti nel miele di Manuka possano essere collegati alla attività "non-peroxide" di questi prodotti alimentari. Composti 1,2-dicarbonilici sono stati quantificati dopo derivatizzazione con ortofenilendiammina come il corrispondente chinoxalines usando RP-HPLC e rilevazione UV. Le proprietà antibatteriche di 1,2-dicarbonilici nonché di campioni di miele sono stati valutati utilizzando un agar.

2 Materiali e metodi

2.1 Chemicals

GO e MGO, ogni 40% in acqua e MGO, predi da Sigma (Taufkirchen, Germania). MGO è stato purificato secondo [16] con addizionale ridistillazione [17]. 3-DG è stato sintetizzato secondo [18] con alcune modifiche [19]. L'acido acetico P.A. è stato ottenuto da BioChemica (Darmstadt, Germania). Acido fosforico (85%, p.a.) da Merck (Darmstadt, Germania). Orthophenylendiammine (OPD) è stata ottenuta da Fluka (Monaco, Germania). Metanolo per HPLC è stato preso da Riedel de Haen (Seelze, Germania). L'acqua utilizzata per la preparazione di tamponi e le soluzioni sono state ottenute con un sistema di depurazione Purelab (USFilter, Ransbach-Baumbach, Germania). Agar agar, estratto di lievito, peptone, triptone, e sodiumchloride da AppliChem (Darmstadt, Germania).

2.2 Campioni di Miele

Un totale di 50 campioni di miele di diversa origine sono stati presi da negozi locali o ricevuti in dono dall'associazione apicoltori di Dresda (Imkerverein Dresda, e.V.). I sei campioni di miele di Manuka sono stati ordinati via Internet da dei fornitori di miele della Nuova Zelanda.

2.3 analitica RP-HPLC

Sono stati analizzati composti 1,2-dicarbonilici con il corrispondente chinoxalines dopo derivatizzazione con OPD secondo [13], con alcune lievi modifiche. 1,0 mL del 15% w/v soluzioni di miele in 0,5 M di fosfato di sodio, pH 6,5, o soluzioni standard dei composti 1,2-dicarbonilici sono stati mescolati con 0,6 ml di un 1,0% w/v di OPD in 0,5 M in tampone con sodio fosfato, pH 6.5. Il prodotto è stato tenuto al buio per 12 ore a temperatura ambiente. Dopo filtrazione a membrana (0,45 μ m),

20 LL di questa campioni sono stati sottoposti ad analisi cromatografia. Questo è stato eseguito utilizzando un AKTA BASIC SYSTEM con una pompa P-900, monitor UV UV-900 e un campionatore automatico A-900 (tutti da Pharmacia, Freiburg, Germania). È stata usata una colonna in acciaio inox, Mm64.6 250 mm, riempita con 100 Eurospher RP18-material con dimensione delle particelle di 5 μ m (Knauer, Berlino, Germania). La portata è stata dello 0,8 mL / min. La temperatura della colonna è stata fissata a 30°C. Le fasi mobili sono state 0,15% acido acetico (un solvente) e l'80% di metanolo contenente il 20% di solvente A (solvente B).

Il gradiente è iniziato con 20% di solvente B per un periodo di 2 minuti, poi è stato cambiato fino al 40% di solvente B per un periodo di 20 minuti e al 100% di solvente B per 15 minuti, seguita da una eluizione con 100% di solvente B per un periodo di 5 minuti e poi è stato cambiato al 20% di solvente B per 7 minuti con conseguente equilibrizzazione al 20% di solvente B per 5 minuti. I picchi sono stati individuati mediante la misurazione di assorbanza-UV a 312 nm. La taratura esterna è stata effettuata usando i composti di riferimento nella gamma da 10 a 500 mg/L per 3-DG, da 0.1 a 20 mg/L per il GO e 0,1-300 mg/L per MGO.

Tutte le curve di calibrazione hanno mostrato linearità all'interno di questi campi di concentrazione. Limiti di rilevabilità sono stati 0,3 mg / kg per il 3-DG e 0,2 mg / kg per il GO o MGO,rispettivamente.

2.4 LC / spettroscopia di massa

La misura LC-MS è stata eseguita con un sistema LC Serie 1100 (Agilent Technologies, PaloAlto, USA) e uno spettrometro di massa Mariner ESI-TOF (PerSeptive Biosistemi, Framingham, USA). Le condizioni cromatografiche sono state come sopra. la ionizzazione Electrospray è stata eseguita in modalità di ionizzazione positiva. L'azoto è stata utilizzato come cortina di gas (1,5 L / min) e nebulizzatore di gas (0,8 L / min).

Le condizioni di funzionamento dello spettrometro sono stati i seguenti: spray punta potenziale 5.190 V, SCIEX riscaldatore 290°C, ugello 90 V, uno skimmer 11,50 V, quadrupolo DC potenziale di 7,50 V, tensione di deflessione -1,00 V, obiettivo Einzel potenziale di -34 V, quadrupolo RF tensione 1000 V, quadrupolo 140°C temperatura, temperatura ugello 140°C, impulso potenziale di spinta 545 V, impulso potenziale 210 V, potenziale di accelerazione 4000 V, riflettore potenziale di 1.550 V, e la tensione del rivelatore 2.250 V. Una scansione completa degli spettri di massa sono stati misurati nel range di massa 100-3000 m/z nel tic-mode.

Lo strumento è stato calibrato utilizzando una miscela proteica contenente la bradichinina, angiotensina e neurotensin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germania). Dati, acquisizione e gestione è sono stati eseguiti con il software Data Explorer versione 4.0.0.1 (Biosistemi Applicati Foster City, USA).

Tabella 1. Composti 1,2-dicarbonilici e HMF in campioni di miele e una preparazione farmaceutica (dati espressi in mg/kg in valore medio, minimo e massimo; per i campioni di miele di Manuka significano SD risultati alle analisi in triplice copia; le abbreviazioni sono le seguenti: 3-DG, 3-deoxyglucosulose, GO, gliosale; MGO, methylglyoxal; HMF, 5-idrossimetilfurfurale; non rilevabile nd, di sotto di 0.2 mg/kg; n.d., non analizzate)

Sample	3-DG	GO	MGO	HMF
Miele commerciale samples (<i>n</i> = 50)	342 (119–1451)	1.7 (n.d. -4.6)	3.1 (n.d. -5.7)	3.9 (1.0–75)
Manuka 1 “active 5”	1060 ± 54	0.7 ± 0.2	38.4 ± 5.0	3.0 ± 0.2
Manuka 2 “active”	668 ± 30	3.0 ± 1.0	347 ± 20	22.6 ± 0.5
Manuka 3 “active”	563 ± 26	3.9 ± 1.0	411 ± 24	17.6 ± 0.6
Manuka 4 “UMF 10”	747 ± 40	1.2 ± 0.5	416 ± 35	21.3 ± 1.1
Manuka 5 “UMF 20”	807 ± 39	4.2 ± 1.1	743 ± 40	43.9 ± 2.0
Manuka 6 “UMF 25”	697 ± 44	7.0 ± 1.0	761 ± 25	n.a.
Gel antibatterico per ferite	n.a.	n.a.	312 ± 20	n.a.

2.5 Valutazione dell'attività antibatterica

L'attività antibatterica del miele e le soluzioni di 1,2-dicarbonilici sono state analizzate utilizzando un test di agar a diffusione e seguendo Patton et al. (2005) [20]. *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sono stati precoltivati a 37°C in fiale da 50 ml contenenti 10 ml di liquido nutriente secondo [21]. Successivamente 0,1 mL delle culture sono state distribuite su piastre contenenti nutriente solidificato. Pozze da 10 mm di diametro (0,2 ml) sono state scavate nella superficie del terreno agarizzato. 0,15 ml di soluzioni di Composti 1,2-dicarbonilici GO, MGO, e 3-DG in 0,5 M tampone di sodio fosfato, pH 6,5, e nello stesso tampone sono stati collocati nei pozzetti il miele diluito a concentrazioni che vanno dal 15 al 80%. Le piastre sono state incubate a 37°C per 20 h. Sono state misurate le zone di inibizione. Sono stati determinati i valori di MIC (minima concentrazione inibente), il MIC corrisponde alla concentrazione più bassa, per i quali la zona di inibizione era percepibile a vista.

3 Risultati

La cattura di composti 1,2-dicarbonilici con ortofenilendiammina e successiva analisi cromatografica del corrispondente chinoxaline usando RP-HPLC con rilevazione UV a 312 nm è un metodo generalmente accettato per la quantificazione della degradazione di composti formati da carboidrati durante le reazioni di Maillard o caramellizzazione. Recentemente siamo stati in grado di quantificare 1,2-dicarbonilici nel miele [13] per la prima volta. Nel presente studio, un gran numero di campioni disponibili in commercio sono stati studiati e potrebbe essere dimostrato, che per la maggior parte dei mieli convenzionali, la quantità di GO e MGO è basso se comparato al 3-DG (Tabella 1). GO e MGO non hanno superato i livelli massimi di 5 mg/kg e non sono state alterate le condizioni di conservazione, considerando che sono stati misurati fino a 1.451 mg/kg di 3-DG. L'osservazione da parte di Weigel et al. [13] è che non esiste nessuna correlazione tra la quantità di HMF e 3-DG, questi ultimi rappresentano, il precursore diretto per HMF.

Tabella 2. MIC (Concentrazione Inibitoria Minima) di soluzioni di 1,2-dicarbonilici o campioni di miele diluito e concentrazioni di miele MGO diluito corrispondente al MIC.

Sample	MIC for <i>E. coli</i>	MIC for <i>S. aureus</i>
3-DG	Nessuna inibizione osservata fino a 60 mM	
GO	6.9 mM	4.3 mM
MGO	1.1 mM	
Honey samples	>80%	
Manuka honeys 2–6	15–30%	
MGO at MIC dilution	1.1–1.8 mM	

Analizzando ulteriormente i campioni di miele, abbiamo notato che per i campioni di miele di Manuka disponibili in commercio dalla Nuova Zelanda (Fig. 1A) mostrano vette sorprendentemente alte di chinoxaline, eluendo con il tempo di ritenzione identico al chinoxaline formato da MGO e ortofenilendiammina (Fig. 1B). Utilizzando un rivelatore fotodiode, si potrebbe dimostrare che gli spettri UV dei picchi rilevati nei campioni di miele sono stati identici a quelli del campione di riferimento di MGO. Per l'identificazione univoca del chinoxaline derivato da MGO, LC-TOF-MS. Gli spettri identici di massa con un segnale dominante in un *m/z* di 145,1 misurato come [MH]⁺ sono stati trovati per il picco di eluizione a 39 min nei cromatogrammi dei campioni di miele di Manuka, così come il campione di riferimento di MGO (Fig. 2). Questo chiaramente dimostra l'identificazione univoca del chinoxaline formato da MGO e orthophenylendiammine. In sei campioni di miele di Manuka dalla Nuova Zelanda, le concentrazioni per MGO variavano 38-761 mg/kg (Tabella 1), che è fino a 1000 volte superiore rispetto ai dati corrispondenti per i campioni di miele convenzionale. È interessante notare che vi è stata una indicazione per cui il “UMF-valore”, che è un parametro commerciale utilizzato per valutare l'attività antibatterica del miele di Manuka, è direttamente correlato al contenuto di MGO (Tabella 1). Sulla base di tale sorprendente risultato, abbiamo ipotizzato che l'attività antibatterica del miele di Manuka può almeno in parte essere dovuta a MGO. Per dimostrare questa ipotesi, le proprietà anti-

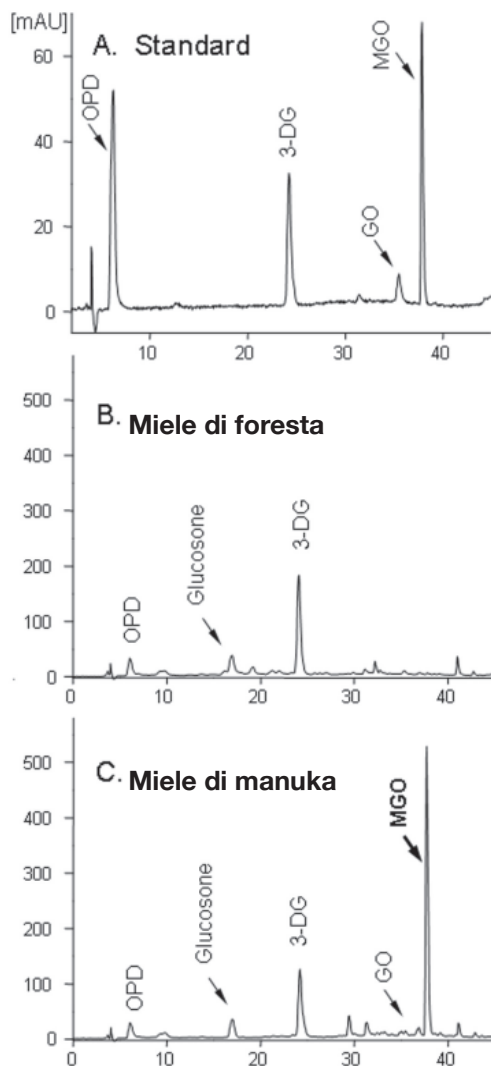


Figura 1. RP-HPLC con rilevamento-UV a 312 nm. (A) miscela standard consistente in 3-DG (155mg/L), GO (12mg/L) e MGO (45mg/L); (B) Miele di foresta; (C) Miele di Manuka

batteriche dei composti 1,2-dicarbonilici sono state valutate usando un agar a diffusione. Come si può vedere dalla tabella 2, tutti i composti studiati hanno mostrato un effetto inibitorio nei confronti di *E. coli* e *S. aureus*. Il notevole effetto antibatterico è stato trovato per la MGO, che è espresso da un valore di MIC di 1,1 mm nei batteri d'origine. I valori di MIC rappresentano la concentrazione minima di un composto per il quale un effetto inibitorio è stato rilevabile. GO, sono stati misurati un MIC di 6,9 mm per *E. coli* e 4,3 mm per *S. aureus*, e 3-DG, che non ha mostrato alcuna inibizione a concentrazioni fino a 60 mm, sono stati significativamente inibitori e meno efficaci per la crescita batterica rispetto a MGO (Tabella 2). Successivamente, è stato valutato se i campioni di miele presentassero un effetto antibatterico sotto le condizioni utilizzate nei nostri test. Una attività antibatterica si è trovata solo per i campioni indicati come "miele di Manuka attivo". Per questo i campioni, sono stati misurati i valo-

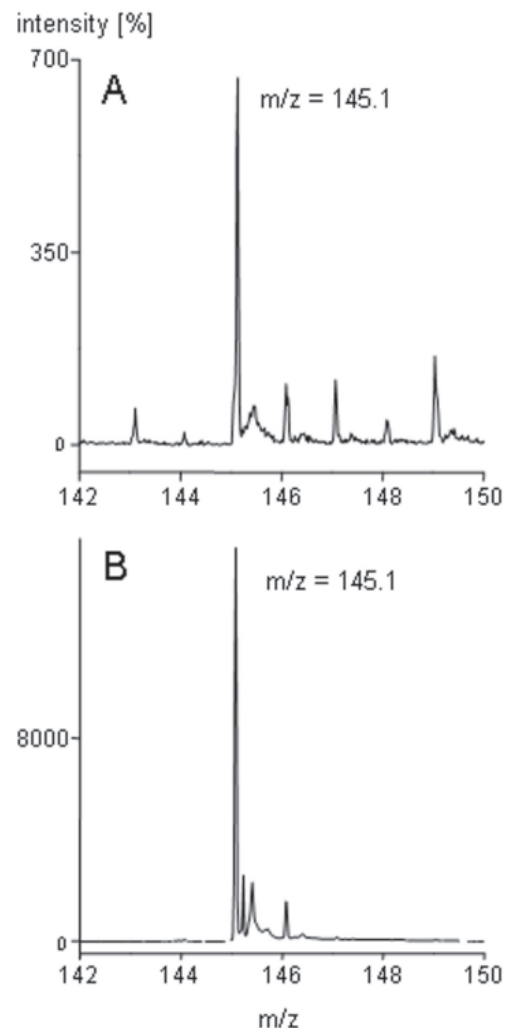


Figura 2. Spettro ESI-TOF-MS per il picco di eluizione con un tempo di ritenzione di 39 min. nei cromatogrammi mostrati in fig.1. (A) campione miele di manuka; (B) campione di riferimento di MGO.

ri di MIC, espressi in concentrazione dopo diluizione in 0.5 M con tampone di fosfato, che vanno dal 15 al 30%. Tutte gli altri mieli non hanno mostrato alcun effetto antibatterico in diluizioni sotto del 80%. Sulla base dei dati quantitativi misurati per MGO tramite RP-HPLC, si può calcolare che l'importo di MGO "attivo" nei mieli di Manuka diluito al corrispondente MIC, erano simili ai valori determinati MIC delle soluzioni standard del composto 1,2-dicarbonilici. In altre parole, la diluizione dei mieli di Manuka a concentrazioni tra il 15 e il 30% ha determinato concentrazioni MGO di 1,1-1,8 mm, che sono sufficientemente elevati da avere effetti antibatterici. Questa ipotesi è stata infine verificata con l'aggiunta di quantità di puro MGO, che è presente in una soluzione al 20% del miele di Manuka attivo, ad una diluizione del 20% di un "inattivo" miele di bosco. Questo miele "inattivo" non ha mostrato una attività antibatterica ad una concentrazione del 20% (Fig. 3, campione 4), mentre per

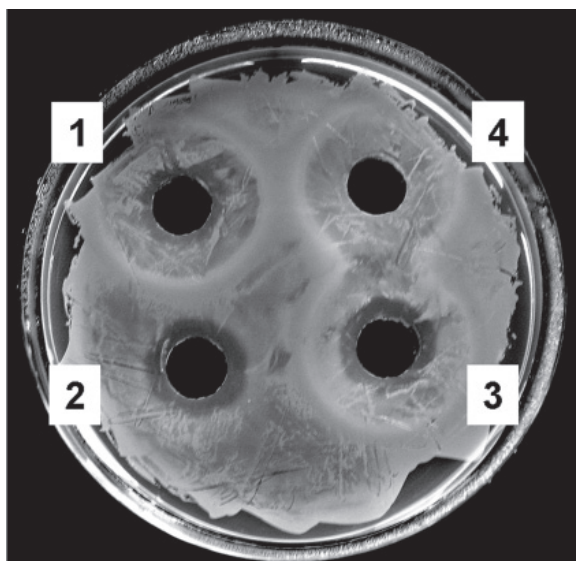


Figura 3. Dimostrazione del Pozzo di diffusione Agar (*S. aureus*). Campione 1, miele di manuka attivo (diluizione 20%); Campione 2, MGO (1,9mM); Campione 3 Miele di foresta inattivo (diluizione 20%) con aggiunta di 1.9 mM MGO; Campione 4, miele di foresta inattivo (diluizione 20%)

il campione di miele di Manuka, la zona di inibizione era ben visibile (Fig. 3, campione 1). Questo diluizione del miele di Manuka contenuta 1,9 mM MGO. Dopo aver aggiunto 1,9 mM MGO alla soluzione il 20% del miele di bosco, una zona di inibizione paragonabile a quella del miele di Manuka “attivo” era visibile (Fig. 3, campione 3). Sulla base di questa osservazione, si può concludere che MGO nel miele di Manuka è direttamente responsabile dell’attività antibatterica del miele di Manuka.

4 Discussione

Il fatto che il miele proveniente dalla albero Manuka (*scoparium* L.) ha un livello significativamente più alto di attività antibatterica rispetto ad altri mieli è stato segnalato da diversi autori [9-11]. Questa attività antibatterica non poteva essere spiegata solo dall’enzima glucosio ossidasi, che è presente nel miele provenienti dalle api, che induce la formazione di perossido di idrogeno quando il miele è diluito [7, 12]. Tale contributo aggiuntivo in una attività antibatterica fa riferimento ad una “attività “non-peroxide” o “UMF”, e diversi tentativi sono stati effettuati al fine di individuare i composti responsabili di questo effetto. Preliminari studi di fenomenologica hanno dimostrato che i composti sono il calore e la luce stabile, e non sono interessati quando il pH è spostato a valori superiori a 11 nel corso delle procedure di frazionamento [5, 22]. Sono stati identificati diversi acidi fenolici, come antibatterico caffeico e l’acido ferulico ed acido siringico e methylsiringic e flavonoidi come la quercetina, isorhamnetin e luteolina[23-25]. Le concentrazioni di questi composti nel miele, tuttavia, erano di

gran lunga troppo basse per causare un effetto antibatterico. Nonostante questo, un brevetto pubblicato di recente descrive i metodi per la preparazione di UMF fortificato e metodi per la preparazione di UMF contenenti frazioni di miele senza conoscerne nei dettagli chimici[26]. Con i nostri risultati, abbiamo dimostrato in modo inequivocabile per la prima volta che MGO è direttamente responsabile della attività antibatterica del miele di Manuka. È da notare che tale quantità di MGO come il miele di Manuka presenti in (Tabella 1) non sono ancora stati trovati per qualsiasi elemento di altro cibo. Basse quantità di enzimaticamente formate da GO e MGO sono state segnalate per alimenti fermentati come i prodotti lattiero-caseari come pure birra e vino, con concentrazioni che vanno da 3 a 11 mg/kg [27, 28]. Inoltre, MGO è noto formarsi durante la torrefazione del caffè in quantità di 23-47 mg / mg [29]. I dati quantitativi per 3-DG negli alimenti non sono disponibili. Attualmente, solo speculazioni possono essere fatte circa l’origine di MGO nel miele di Manuka. Una formazione non enzimatica via retro-aldolizzazione nel corso di reazioni al calore o allocazione indotta di Maillard o caramellizzazione [14] può essere esclusa, in quanto sono state misurate somme relativamente basse di HMF. HMF è un indicatore sensibile per il trattamento termico. MGO è conosciuto come un sottoprodotto della glicolisi maggiore nei batteri [30], quindi una origine microbiologica dei composti 1,2-dicarboynl devono essere prese in considerazione. Inoltre, una recente relazione [31] per la prima volta ha dimostrato la stima del livello di MGO nel range di 30-75 LM in varie specie vegetali ed il suo incremento in risposta alla salinità, siccità e condizioni di stress da freddo. Resta da chiarire se questo può essere importante per la la Manuka da un punto di vista botanico. Ulteriori studi dovranno anche chiarire se l’esperienza promettente nella cura delle ferite segnalate per Medihoney, che è un preparato farmaceutico *Leptospermum* dei mieli provenienti da Australia certificato per la cura delle ferite, può essere direttamente causa di MGO [32] (www.medihoney.com). E’ disponibile in commercio un campione di una ferita contenente 312 mg/kg MGO (Tabella 1). Questa concentrazione di MGO dovrebbe essere sufficiente a causare effetti antibatterici quando applicato alla ferita. Infine, dal punto di vista nutrizionale, il fisiologico significato derivante dalla diffusione di MGO e altri Composti 1,2-dicarboynlici debba essere un tema di ulteriori indagini. MGO e composti di glicazione derivanti dalla reazione di MGO con catene di aminoacidi laterali di lisina o arginina, sono stati identificati in vivo e dono associati con le complicazioni del diabete e di alcunr malattie neurodegenerative, anche se il ruolo di questi composti nella patogenesi di diverse malattie non sono stato ancora pienamente comprese [33-35]. Informazioni riguardanti una tossicità potenziale di MGO sono rari e ambivalenti, come l’assunzione di MGO abbia un effetto antitumorale[35-37]. Le implicazioni derivanti da una fisiologica diffusione

di prodotti di degradazione dei carboidrati bioattivi e un'analisi dei rischi e dei benefici che ne deriva deve essere argomento di ulteriori accertamenti. In conclusione, con la presente inchiesta si è chiarito il verificarsi di elevate quantità di MGO nel miele di Manuka della Nuova Zelanda (*Scoparium L.*) MGO è stato identificato come un composto bioattivo che è responsabile della attività antibatterica di questi campioni di miele. Sono in corso nei nostri laboratori studi per chiarire i percorsi per la formazione biochimica di MGO nelle piante del miele di Manuka.

Ringraziamo il Dr. Uwe Schwarzenbolz per il suo aiuto prezioso nelle misurazioni LC-MS. Ringraziamo Manuka Health della Nuova Zelanda per la fornitura di campioni di MGOTM di miele di Manuka. I dati originali di questa relazione sono stati generati nella tesi di dottorato di Elvira Mavric (E. Mavric: Argininderivatisierung 1,2-und Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln; Technische Universität T Dresden, 2006). Alcune parti di questo studio sono state presentate oralmente al Workshop COST-iMARS "La reazione di Maillard nel cibo e nelle medicine", Napoli, 24-27 maggio, 2006.

Gli autori non hanno dichiarato alcun conflitto di interessi.

5 Referenze

- [1] Dustmann, J. H., Antibacterial effect of honey. *Apiacta* 1979, 14, 7–11.
- [2] Dold, D., Du, D. H., Dziao, S. T., Nachweis antibakterieller, hitze- und lichtempfindlicher Hemmstoffe (Inhibine) im Naturhonig. *Z. Hyg. Infekt.* 1937, 120, 155–167.
- [3] Dustmann, J. H., über den Einfluss des Lichtes auf den Peroxidwert (Inhibin) des Honigs. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1972, 148, 263–268.
- [4] Bogdanov, S., Characterization of antibacterial substances in honey. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1984, 17, 74–76.
- [5] Bogdanov, S., Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1997, 30, 748–753.
- [6] Molan, P. C., The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *BeeWorld* 1992, 73, 5–28.
- [7] White, J.W., Subers, M. H., Schepartz, A., The identification of inhibine. *Am. Bee J.* 1962, 102, 430–431.
- [8] Adcock, D., The effect of catalase on the on the inhibine and peroxide values of various honeys. *J. Apic. Res.* 1962, 1, 38–40.
- [9] Allen, K. L., Molan, P. C., Reid, G. M., A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991, 43, 817–822.
- [10] Russell, K. M., Molan, P. C., Wilkins, A. L., Holland, P. T., Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 10–13.
- [11] Molan, P. C., Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World* 2001, 82, 22–40.
- [12] Weston, R. J., The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. *Food Chem.* 2000, 71, 235–239.
- [13] Weigel, K., Opitz, T., Henle, T., Studies on occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 218, 147–151.
- [14] Mavric, E., Kumpf, Y., Schuster, K., Kappenstein, O. et al., A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide-bound arginine and oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *Eur. Food Res.* 2004, 218, 213–218.
- [15] Suortti, T., Mäkilä, Y., Antimicrobial activities of heated glucose and fructose solutions and their elucidation by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 1984, 15, 165–173.
- [16] Kellum, M.W., Oray, B., Norton, S. J., A convenient quantitative synthesis of methylglyoxal for glyoxalase I assays. *Anal. Biochem.* 1978, 85, 586–590.
- [17] McLellan, A. C., Phillips, S. A., Thornalley, P. J., The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal. Biochem.* 1992, 206, 17–23.
- [18] Madson, M. A., Feather, M., An improved preparation of 3-deoxy-erythro-hexos-2-ulose via the bis(benzylhydrazone) and some related constitutional studies. *Carbohydr. Res.* 1981, 94, 183–191.
- [19] Henle, T., Bachmann, A., Synthesis of pyrrole reference material. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1996, 202, 72–75.
- [20] Patton, T., Barrett, J., Brennan, J., Moran, N., Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity of manuka honey. *J. Microbiol. Meth.* 2006, 64, 84–95.
- [21] Zimbro, M. J., Power, D. A. (Eds.), *Difco and BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*. Becton, Dickinson and Co. Sparks, MD 2003.
- [22] Molan, P. C., Russell, K. M., Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J. Apic. Res.* 1988, 27, 62–67.
- [23] Tan, S. T., Wilkins, A. L., Molan, P. C., Holland, P. T., Reid, M., A chemical approach to the determination of floral sources of New Zealand honeys. *J. Apic. Res.* 1989, 28, 212–222.
- [24] Weston, R. J., Brocklebank, L. K., Lu, Y., Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand Manuka honeys. *Food Chem.* 2000, 70, 427–435.
- [25] Russell, K. M., Molan, P. C., Wilkins, A. L., Holland, P. T., Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 10–13.
- [26] Snow, M.J., Manlye-Harris, M., Farr, J.M., Unique manuka factor fortified honey. *PCT Internat. Patent Appl.* 2005, Patent Number WO2005120250-A1.
- [27] Bednarski, W., Jedrychowski, L., Hammond, E. G., Nikolov, Z. L., A method for the determination of alpha-dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 2474–2477.
- [28] De Revel, G., Bertrand, A., A method for the detection of carbonyl compounds in wine: Glyoxal and methylglyoxal. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 61, 267–272.
- [29] Hayashi, T., Shibamoto, T., Analysis of methylglyoxal in foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 1090–1093.
- [30] Ferguson, G. P., Thiemeyer, S., MacLean, M. J., Booth, I. R., Methylglyoxal production in bacteria: Suicide or survival? *Arch. Microbiol.* 1998, 170, 209–218.
- [31] Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K.,

- Sopory, S. K., Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 337, 61–67.
- [32] Simon, A., Sofka, K., Wiszniewsky, G., Blaser, G. et al., Wound care with antibacterial honey (Medihoney) in pediatric hematology-oncology. *Support. Care Cancer* 2006, 14, 91–97.
- [33] Henle, T., Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids* 2005, 29, 313–322.
- [34] Henle, T., Miyata, T., Advanced glycation end products in uremia. *Adv. Ren. Replace. Ther.* 2003, 10, 321–331.
- [35] Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., Turk, Z., Methylglyoxal in food and living organism. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50, 1105–1117.
- [36] Kalapos, M. P., Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 1999, 110, 145–175.
- [37] Ghosh, M., Talukdar, D., Ghosh, S., Bhattacharyya, N., et al., In vivo assessment of toxicity and pharmacokinetics of methylglyoxal. Augmentation of the curative effect of methylglyoxal on cancer-bearing mice by ascorbic acid and creatine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, 212, 45–58.