

Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/ H_2O_2 -induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation

Katrina Brudzynski , Kamal Abubaker, Danielle Miotto

1. Introduction

Diversi componenti bioattivi sono stati identificati nel miele che risultano contribuire alla sua azione antibatterica . Viene comunemente accettata a produrre effetti: l'osmolarità (Bose, 1982; Green, 1988; White, Subers, & Schepartz, 1963; Wahdan, 1998), perossido di idrogeno (Brudzynski, 2006; Mundo, Padilla-Zakour, & Worobo, 2004; Taormina et al., 2001; White et al. 1963), il rapporto tra catalasi e perossido di idrogeno (Weston, 2000), polifenoli (Aljadi & Yusoff, 2003), antiossidanti (Brudzynski & Miotto, 2011) peptidi antibiotici (Kwakman et al., 2011), metilglyoxal (Adams et al., 2008; Mavric, Wittmann, Barth, & Henle, 2008), e recentemente i prodotti della reazione di Maillard (Brudzynski & Miotto, 2011). Tuttavia la questione su come questi componenti portino ad inibizione della crescita dei batteri o a loro morte in termini biochimici rimane ancora senza risposte. Diversità strutturali e funzionali di questi componenti biotivi implicano che essi possano esercitare l'azione di danneggiamento alle cellule dei batteri attraverso differenti meccanismi. Una visione generalmente accettata è che l'effetto osmotico degli zuccheri del miele e l'azione biocida del perossido di idrogeno prodotto nel miele sono i principali meccanismi responsabili dell'attività antibatterica del miele .Una sfida a questo concetto deriva dal fatto che la concentrazione di H_2O_2 nel miele è circa 400–4000 volte più bassa di quanto richiesto per esercitare azione di batteriolisi . La concentrazione di H_2O_2 in vari disinfettanti usati per sterilizzare equipaggiamento medico va dal 3% al 30% (0.8–8 M), rispetto ad una presenza nel miele in media di 0.002 M (Finnegan et al., 2010). Ciò suggerisce che il contenuto di H_2O_2 del miele è troppo basso per produrre effetto di batteriolisi. Abbiamo scoperto che il miele può avere l'abilità di degradare DNA sia di origine batterica che plasmidica . Questa attività di degradazione del DNA è collegata alla presenza nel miele di H_2O_2 ,ma richiede anche altri componenti dato che la quantità esogena di H_2O_2 da sola non causa degradazione del DNA. Il ruolo dei fitochimici sul potenziale inibitorio del miele è stato oggetto di diversi studi (Allen et al., 1991; Baltrusaityte et al., 2007; Lusby, Coombes, & Wilkinson, 2005; Wilkinson & Cavanagh, 2005). I risultati presentano un possibile collegamento tra attività batteriostatica del miele e sua composizione chimica (Brudzynski & Kim, 2011).

3. Results and discussion

Il profilo di inibizione della crescita batterica di un miele artificiale di osmolarità uguale a quella del miele naturale mostra un valore di MIC_{90} del 25% (v/v) nei confronti di *E. coli* e *B. subtilis* (Fig. 1). Una significativa percentuale di mieli (39%, $n = 133$) mostra attività batteriostatica fino a 4 volte superiore a quella del miele artificiale (Fig. 2A). L'attività è di presenza associata alla presenza di fitochimici (Fig. 2B). Questo indica che i fitochimici esercitano un più specifico effetto di inibizione della crescita dell'effetto osmotico degli zuccheri.

L'interazione chimica dei fenoli del miele con H_2O_2 suggerisce che il prodotto di quest'accoppiamento chimico possa avere un ruolo nella degradazione del DNA batterico. Abbiamo recentemente dimostrato che il miele degrada il DNA batterico e che il perossido di idrogeno è necessario, ma non direttamente responsabile di questa attività (Brudzynski et al., 2011).

3.5. Effect of honey polyphenols on DNA degradation

Ci sono diverse evidenze del fatto che i polifenoli che mostrano capacità antiossidante hanno il potenziale per divenire anche potenti pro-ossidanti in presenza di fonti di ossigeno come O_2 o H_2O_2 e ioni metallo come Fe(II) e Cu(II) (Cao, Sofic, & Prior, 1997; Fukumoto & Mazza, 2000; Sakihama, Cohen, Grace, & Yamasaki, 2002). L'auto ossidazione dei Polifenoli genera H_2O_2 e radicale fenossilico. In presenza di ioni metallici di transizione, attraverso la reazione di Fenton, H_2O_2 è convertita in radicale idrossile. Entrambi i tipi di radicale sono noti per indurre danni al DNA (Li & Trush, 1993, 1994; Sakihama et al., 2002). L'interazione tra polifenoli e perossido di idrogeno è responsabile della degradazione del DNA.

Per determinare il contributo dei polifenoli del miele e della loro capacità pro-oxidant sulla degradazione del DNA, si sono estratti questi componenti dal miele incubandoli poi con DNA in presenza di 200 μM di H_2O_2 e 50 μM Cu(II) (la cui concentrazione media nel miele è 88 μM , (Bogdanov, Haldiman, Luginbuehler, & Galimann, 2007). I polifenoli del miele hanno efficacemente degradato il DNA. Tuttavia la rottura del DNA non avviene se manca H_2O_2 oppure Cu nella miscela in reazione (data not shown).

La quantità di degradazione di DNA risulta inversamente relazionata alla concentrazione di polifenoli; bassa concentrazione di polifenoli risulta degradare il DNA (Fig. 8). Inversamente, mieli con più alto contenuto di fenoli redox-attivi sono meno efficienti nella degradazione del DNA (Fig. 4 and Table 3). La concentrazione di polifenoli risulta influenzare il bilancio tra la loro capacità antiossidante e la loro capacità pro-ossidante. All'aumentare della concentrazione l'attività antiossidante dei polifenoli diviene prevalente, mentre a bassa concentrazione essi funzionano da pro-ossidanti anche in assenza di ioni metallici (Cao et al., 1997; Fukumoto & Mazza, 2000; Sakihama et al., 2002).

Si è con ciò dimostrato che l'auto ossidazione dei polifenoli presenti nel miele, e la produzione di radicali ossigeno che da questo deriva è la chiave del danneggiamento del DNA batterico osservato. Il perossido di idrogeno è un componente necessario a queste reazioni: la sua idrolisi produce ossigeno che accelera l'auto ossidazione dei polifenoli e semiquinoni/quinoni radicali da una parte, mentre dall'altra la sua degradazione catalizzata dai metalli produce radicali idrossili con effetto biocida.

Commento- quello che sembra è che il miele, presentando quasi sempre una discreta capacità batteriostatica, possa a volte presentare, in ragione di sua particolare composizione, capacità battericide, ovvero "uccisione" dei batteri attraverso lisi del DNA. Questa capacità potrebbe esercitarsi anche nei confronti di spore di *noosema* e virus, ma purtroppo ancora non è stata studiata.

Dato che questa capacità biocida dipende dalla presenza di ioni metallici, di perossido di idrogeno e dalla sua particolare concentrazione di polifenoli e che questi ultimi mostrano una ambivalenza (pro ossidanti quando presenti in piccole quantità e antiossidanti quando presenti in grandi quantità) sembra che il miele, pur mantenendo una discreta capacità batteriostatica, non possa contemporaneamente essere ottimamente funzionale ad esercitare effetto biocida e effetto antiossidante quando ingerito dall'ape. O l'uno o l'altro.

Quello che sembra è che in ogni cella di miele vi sia un prodotto più funzionale a svolgere azione antiossidante oppure un prodotto più funzionale a svolgere azione biocida con la polifloralità di bottinamento che consente di mantenere questi due aspetti in relativo

equilibrio in ragione della quantità di fenoli variabilmente contenuti e della produzione di GOX possibile . E' un mistero totale l'effetto di mieli a capacità biocida una volta ingeriti dall'ape . Transitando lungo tutto il canale alimentare e gli organi digestivi potrebbero essere in grado di svolgere un'azione di disinfezione da questi con discreto effetto di contenimento delle infezioni ??

Si può ipotizzare che in condizioni ideali l'alveare trovi un equilibrio di produzione e consumo fra dette " categorie " di mieli che può venire a mancare in condizioni di precarietà di pascolo . Le possibili presenze di polifenoli,metalli di transizione e gox sembrano molto aleatorie .

La presenza di perossido di idrogeno è fondamentale per la reazione che porta il miele ad essere in grado di alterare il DNA in esso presente ovvero uccidere i patogeni che ospita . Dato che il perossido di idrogeno presente nel miele deriva dall'espressione di GOX e GOX deriva dalla disponibilità di polline si avrà che mieli prodotti in condizioni di scarsità di polline sono tendenzialmente meno dotati della capacità di uccidere i patogeni e questo indebolimento del sistema sociale di disinfezione espone col tempo l' alveare ad un maggior carico di patogeni da gestire col sistema immunitario dei singoli individui i quali di conseguenza hanno meno energie per lavorare con ulteriore indebolimento delle difese immunitarie . Ma tutto questo , a chi propugna blocchi di tutti i tipi , proprio non interessa. Meglio l'uovo oggi che la gallina domani