



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

“Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής και περιβάλλοντος”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΟΥ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΟΛΥΜΠΟΥ



ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΣΟΥΛΙΤΣΙΩΤΗΣ

ΦΥΣΙΚΟΣ Α.Π.Θ.

Λάρισα 2014

STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HONEY
SAMPLES FROM THE REGION OF OLYMPUS

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΟΥ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΟΛΥΜΠΟΥ

© 2014 ΣΟΥΛΙΤΣΙΩΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής εργασίας, από το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κουρέτας : Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κων/νος Πετρωτός: Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας.

Στην Οικογένειά μου.

Περιεχόμενα	σελίδες
Περίληψη	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1.1 Ελεύθερες ρίζες	9
1.1.2 Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών	9
1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	12
1.3 Οξειδωτικό στρες	15
1.4 Μέλι	18
1.4.1 Σχηματισμός Μελιού	18
1.4.2 Φυσικές και Χημικές ιδιότητες του μελιού	19
1.4.3 Διατροφική αξία μελιού	22
1.4.4 Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο	23
1.4.5 Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας	23
1.4.6 Μέλι και Αντιοξειδωτική δράση	24
1.5 ΣΚΟΠΟΣ	25
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Δείγματα Μελιού	26
2.2 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	27
2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH	28
2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS•+	30
2.5 Λυοφιλίωση για την παραγωγή σκόνης από μέλι	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•	38
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+	46
3.3 Εκτίμηση του πολυφαινολικού δυναμικού των δειγμάτων με την μέθοδο Folin Ciocalteu	54

3.4	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των σκονών των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+	56
3.5	Εκτίμηση του πολυφαινολικού δυναμικού των σκονών των δειγμάτων με την μέθοδο Folin Ciocalteu	60
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εποχή μας, γίνεται ιδιαίτερος λόγος για την βελτίωση της υγείας των ανθρώπων και της προώθησης ενός υγιεινού τρόπου ζωής. Το ενδιαφέρον των ερευνητών εστιάζεται μεταξύ άλλων και στη δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών. Υπάρχουν αρκετές τροφές κυρίως φυτικής προέλευσης με πλούσια αντιοξειδωτική δράση η οποία οφείλεται κυρίως σε βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις, τις φυτικές πολυφαινόλες. Επίσης, τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον οι βιολογικές ιδιότητες του μελιού, ενός προϊόντος που προκύπτει από την επεξεργασία του νέκταρ των φυτών από τις μέλισσες. Έτσι, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να μελετηθούν *in vitro* η αντιοξειδωτική δράση δειγμάτων μελιού της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου καθώς και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενό τους. Για τη μελέτη λοιπόν χρησιμοποιήθηκαν 13 δείγματα μελιών της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου, ενώ εξετάστηκε και ένα μέλι ως δείγμα αναφοράς προερχόμενο από τη Νέα Ζηλανδία, το Manuka, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως φαρμακευτικό σκεύασμα. Η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τις μεθόδους DPPH και ABTS ενώ το πολυφαινολικό περιεχόμενο με την μέθοδο Folin ciocalteau. Επίσης, τα δείγματα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή σκόνης με τη μέθοδο freeze drying, και στη συνέχεια τα δείγματα εξετάστηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση και για το ολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι αρκετά μέλια της περιοχής του Ολύμπου είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση και μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με το μέλι Manuka. Τα IC₅₀ του DPPH των δειγμάτων κυμάνθηκε από 7,5 mg/ml έως 109 mg/ml, ενώ για το ABTS από 4,5 έως 81mg/ml. Τα επίπεδα των πολυφαινολών διακυμάνθηκαν από 0,557 έως 0,922 gallic acid mg/mg μελιού.

Τα 5 δείγματα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση επεξεργάστηκαν με σκοπό την παραγωγή σκόνης. Τα δείγματα αυτά ήταν τα 1,3,4,7 και 8. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με την μέθοδο ABTS. Οι τιμές IC₅₀ των δειγμάτων κυμαινόταν από 5,5 έως 80 mg/ml. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές IC₅₀ των σκονών των δειγμάτων ήταν αυξημένες σε σχέση με το αρχικό δείγμα του ίδιου μελιού. Αυτό υποδηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής σκόνης χάθηκε ένα μέρος της αντιοξειδωτικής δράσης των μελιών όπως ήταν αναμενόμενο. Επίσης παρατηρήθηκαν και μικρότερες τιμές πολυφαινολών. Οι τιμές του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου ήταν από 0,16 έως 0,29 μg gallic acid /ml μελιού. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά την επεξεργασία των μελιών για την παραγωγή σκόνης έγινε ανάμιξη με άλλες ουσίες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι μέλια της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και θα μπορούσαν να πιστοποιηθούν και να αποκτήσουν σημαντική προστιθέμενη αξία. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η μεθοδολογία του freeze-drying που χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή των μελιών σε σκόνη ήταν επιτυχής λόγω του ότι δεν ελαττώθηκε σημαντικά η αντιοξειδωτική τους δράση ή το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Άρα, θα μπορούσε να εφαρμοστεί αυτή η μεθοδολογία για τη μετατροπή των μελιών σε σκόνες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων, καλλυντικών ή φαρμακευτικών σκευασμάτων που θα διαθέτουν τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες του μελιού μεταξύ των οποίων και η αντιοξειδωτική του δράση. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει την αντιοξειδωτική δράση μελιού από την περιοχή του Ολύμπου.

ABSTRACT

Nowadays, there is much talk about the improvement of human health and the promotion of a healthy lifestyle. Among others, the researchers are focused on the action of antioxidants. There are several antioxidant-rich, foods, mainly of plant origin, that their antioxidant action is mainly due to bioactive plant associations, called plant polyphenols. Moreover in recent years biological properties of honey, a product resulting from the processing of nectar plants by bees, exhibit a special interest. For the aforementioned reasons this study attempts to examine in vitro the antioxidant capacity of honey originated from the region of Olympus and its total polyphenol content. For the study we used 13 honey samples originated from the broader region of Mount Olympus and one honey sample as a benchmark originated from New Zealand, called Manuka and used widely as pharmaceuticals. The samples' antioxidant activity was measured with DPPH and ABTS methods while the polyphenol content with the Folin ciocalteau method. The samples with the strongest antioxidant activity converted into a honey powder through the freeze drying process and then the samples tested for their antioxidant activity and their total polyphenol content.

The results showed that several honey samples from the region of Olympus had stronger antioxidant activity and higher polyphenolic content compared with Manuka honey. The IC₅₀ values of DPPH assay were ranged between 7.5 mg/ml to 109 mg/ml, while the range in ABTS assay was from 4.5 to 81 mg/ml. The total polyphenolic content was ranged from 0.55 to 0.92 gallic acid $\mu\text{g}/\text{mg}$ of honey.

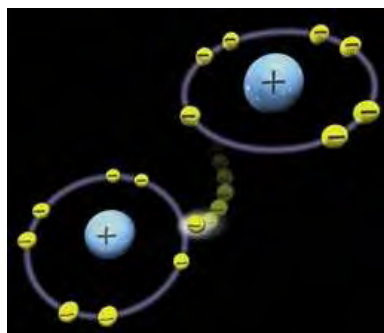
The five samples with the strongest antioxidant activity were converted to powder. Afterwards, it was estimated their antioxidant activity using the ABTS assay. The IC₅₀ values were ranged from 5.5 to 80 mg/ml. It was observed that their IC₅₀ values were higher compared to the honey samples. This indicates that during the preparation of the samples for the conversion to powder a part of the antioxidant activity was reduced as it was expected. Moreover, the total polyphenolic content of the powders were lower compared to honey samples. In particular, the total polyphenolic content was from 0.16 to 0.29 μg gallic acid /mg of honey. This is due to the mixture of honey with other substances during the conversion of honey to powder.

In conclusion, the results from the present study showed that the honey from the region of Olympus have important antioxidant activity and so they could be certified and acquire a significant added value. Furthermore, this study showed that the methodology of freeze-drying used for the conversion of the honey to powder was successful because it did not decrease significantly the antioxidant activity or the polyphenolic content. Thus, this methodology could be applied to convert honey to powder that could be used to make biofunctional foods, cosmetics or pharmaceuticals that would possess the important biological properties of honey including the antioxidant activity. This study is the first that investigated the antioxidant activity of honey from the region of Olympus.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Στα μόρια και τα άτομα, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο, που φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστικότητα (Εικόνα 2). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 1990; Cammac 1987). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al,1993; Wilson, 1978).

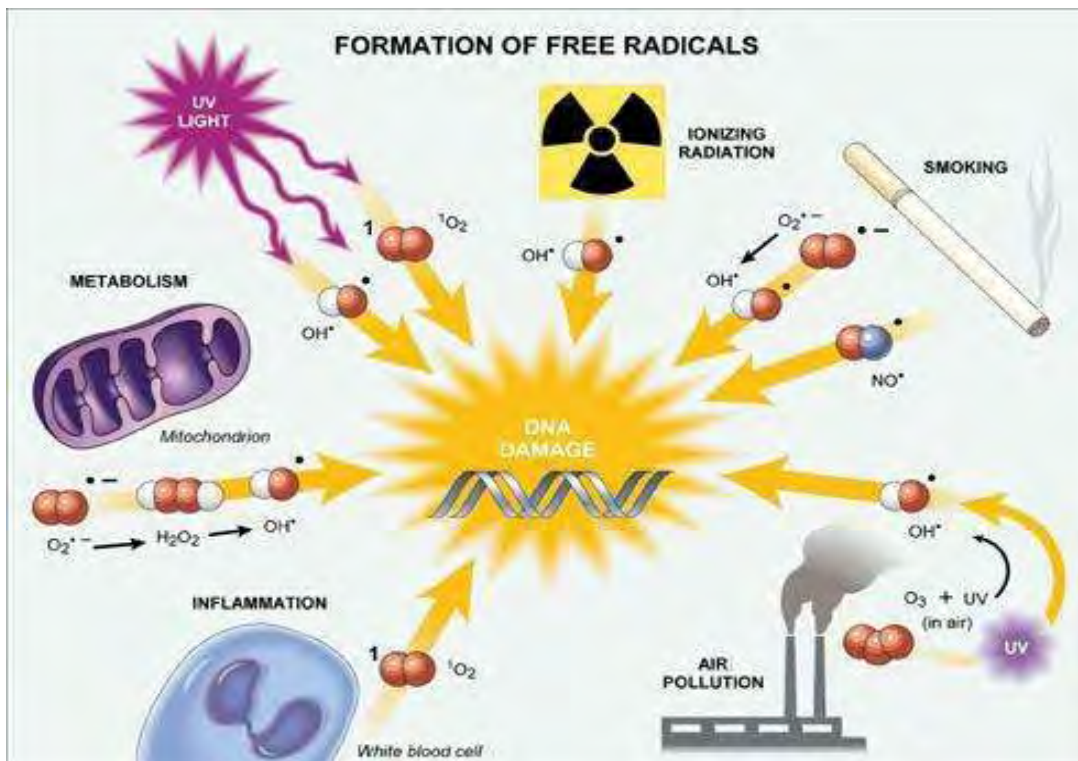


Εικόνα 2 Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

1.1.1 Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε αρκετά χημικά και βιολογικά συστήματα, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, παλαίωσης των χρωμάτων, καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό (Halliwell B, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά

την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξείδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από την μολυσμένη ατμόσφαιρα. (Εικόνα 3). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά για να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.



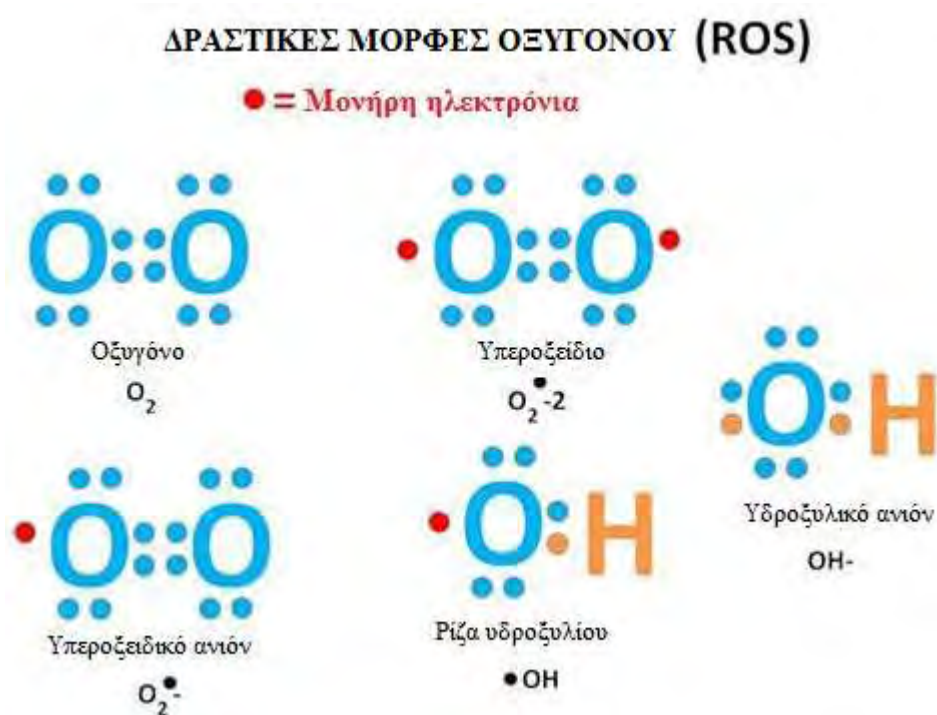
Εικόνα 3: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH•), του σουπεροξειδίου (O2•-), του μονοξειδίου του αζώτου (NO•), του αλκοξυλίου (RO•), του υδροπεροξυλίου (HO2•), του τριχλωρομεθυλίου (CCl3•) και οι θειούχες ρίζες (RS•). Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών εκείνες, που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις (εικόνα 4), που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από

ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al,1993; Gutteridge, 1995). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) (Halliwell 2001).

Όνομα	Τύπος
Ρίζα του σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot -}$
Υδροξυλική ρίζα	HO^{\cdot}
Υδροξυπεροξυλική ρίζα	H_2O^{\cdot}
Υπεροξειδική ρίζα	ROO^{\cdot}
Αλκοξειδική ρίζα	RO^{\cdot}
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H_2O_2

Εικόνα:



Εικόνα 4: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου(ROS).

1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B, 2001). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. et al, 2005). Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα (Halliwell B, 2001) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT).

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C και E, οι πολυφαινόλες

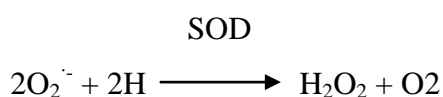
που υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q₁₀.

A) Ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

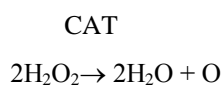
Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του O₂⁻ σε H₂O₂, όπως φαίνεται παρακάτω:



Το O₂⁻ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

Καταλάση (CAT)

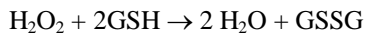
Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H₂O₂ (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂.



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂ χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

GPX



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

B) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998).

B-καροτίνη

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και ο σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

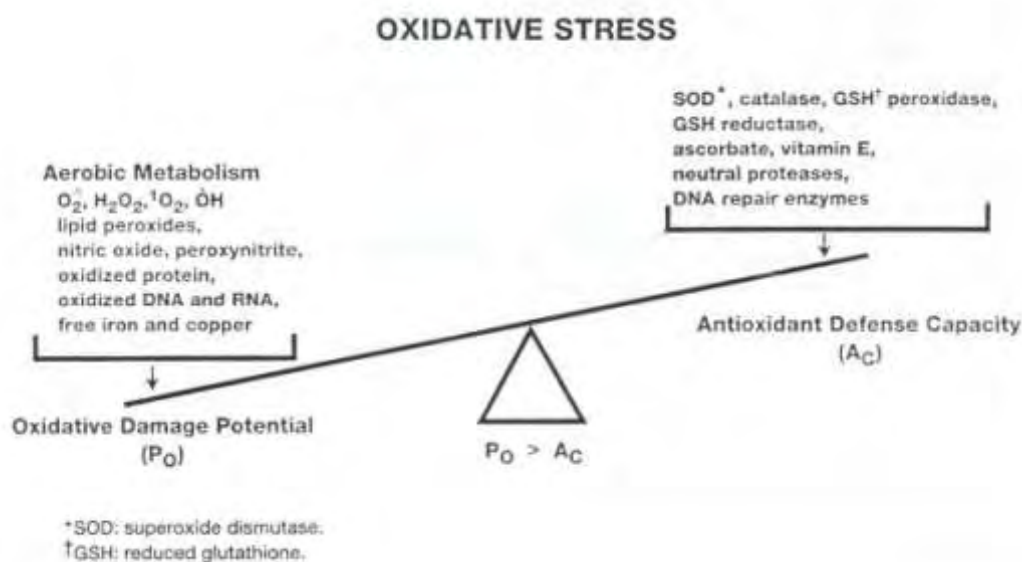
Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.3 Οξειδωτικό στρες

Στο υγιές ανθρώπινο σώμα, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας. Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 6) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις

των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).



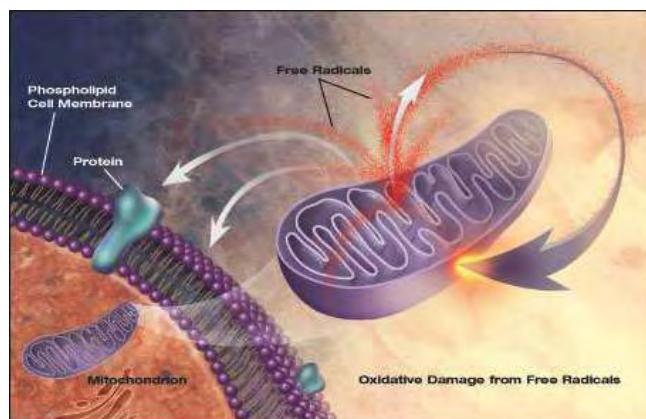
Εικόνα 6 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Παρουσία τοξικών ουσιών, που μεταβολίζονται και παράγουν ROS
- Υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS
- Σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων

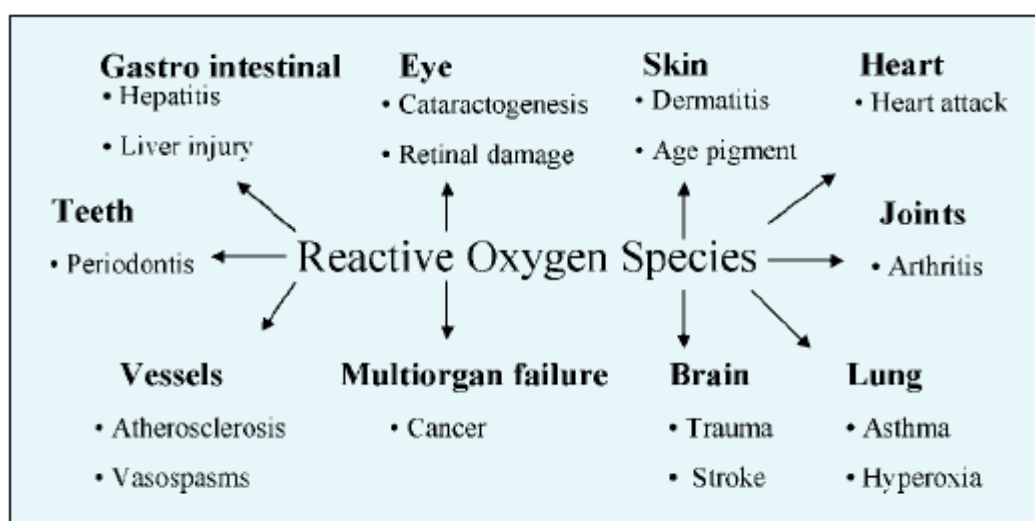
Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια, που είναι βασικά συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις με συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος. (Εικόνα 7). Έτσι οι πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται πιο εύκολα και μετουσιώνονται (Lyra et al, 1977). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πουρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D-ριβόζη

του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση και σχετίζονται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994).



Εικόνα 7 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελευθέρων ριζών

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) , για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς (εικόνα 8) και περιλαμβάνει τον καρκίνο (Toyokuni1998), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) και κ.ά.).



Εικόνα 8 : Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS (Lee et al., 2003).

1.4 Μέλι

1.4.1 Σχηματισμός Μελιού

Οι μέλισσες μετατρέπουν τα διάφορα σάκχαρα σε μέλι με τη μέθοδο της παλινδρόμησης, μια διαδικασία που επαναλαμβάνεται συνεχώς, έως ότου χωνεύεται μερικώς. Οι μέλισσες κάνουν την παλινδρόμηση και την πέψη ταυτόχρονα. Μετά την τελευταία παλινδρόμηση, το υδατικό διάλυμα έχει ακόμα υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, έτσι ώστε η διαδικασία να συνεχίζεται με εξάτμιση του μεγαλύτερου μέρους του ύδατος και με ενζυματική επεξεργασία. Στη συνέχεια τα φυσικά σάκχαρα του μελιού αφυδατώνονται με προσθήκη ενζύμων που τροποποιούν και επηρεάζουν τη χημική σύνθεση και το pH του, γεγονός που εμποδίζει τη ζύμωσή τους. Ινβερτάσες και πεπτικά οξέα υδρολύουν σακχαρόζη για να παραχθούν γλυκόζη και φρουκτόζη που είναι μονοσακχαρίτες. Η ινβερτάση είναι ένα ένζυμο που συντίθεται από το σώμα του εντόμου.

Το μέλι που παράγεται από τις μέλισσες αποτελεί την τροφή τους. Σε κρύο καιρό ή όταν δεν υπάρχουν φρέσκες πηγές τροφής, οι μέλισσες χρησιμοποιούν το αποθηκευμένο μέλι τους ως πηγή ενέργειας (Honey and bees, 2010). Με την επινόηση του ανθρώπου να χρησιμοποιεί τεχνητές κυψέλες ώστε να φωλιάζουν σμήνη, οι άνθρωποι ήταν σε θέση να εκμεταλλευτούν τα έντομα, με αποτέλεσμα την μεγάλη παραγωγή μελιού. Στην κυψέλη (ή σε μία άγρια φωλιά), υπάρχουν τρία είδη μελισσών:

- α) Η βασίλισσα των μελισσών.
- β) Ένας εποχικά μεταβλητός αριθμός αρσενικών μελισσών (κηφήνες) για να γονιμοποιήσουν τις νέες βασίλισσες, οι οποίοι είναι περίπου 20.000 έως 40.000 ανά κυψέλη (Whitmyre, 2007).
- γ) Τις μέλισσες εργάτριες που έχουν σκοπό να αυξήσουν τις προνύμφες και να συλλέγουν το νέκταρ που θα γίνει μέλι στην κυψέλη. Οι εργάτριες φεύγουν από την ομάδα, συλλέγουν σάκχαρα από πλούσια σε νέκταρ άνθη και μετά επιστρέφουν στη κυψέλη.

Μέσα στον πρόλοβο της μέλισσας αρχίζει η διαδικασία της μετατροπής του νέκταρ σε μέλι, με την προσθήκη ενζύμων από τους σιελογόνους και υποφαρυγγικούς

αδένες. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο πάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας και είναι δυο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές διακλαδώσεις. Είναι πολύ ανεπτυγμένοι στη νεαρή εργάτρια και παράγουν το βασιλικό πολτό. Στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες συρρικνώνονται και παράγουν το ένζυμο ινβερτάση, που είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Η κυρίαρχη χημική μετατροπή (μεταβολισμός) του φυτικού χυμού όταν αυτός γίνεται μέλι είναι η αποδόμηση του διζαχαρίτη σουκρόζη (της κοινής ζάχαρης) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τριζαχαριτών είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές (διάφορα τερπένια) και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δεν μεταβολίζονται. Το μέλι απλά εμπλουτίζεται και με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Επίσης το μέλι εμπλουτίζεται με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας, τα οποία μεταβολίζουν τα σάκχαρα. Τέλος, τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ακριβώς τα ίδια με αυτά τα οποία περιέχονται και στον πρωτογενή φυτικό χυμό (Zanber & Maurizio 1984, White 1993).

1.4.2 Φυσικές και Χημικές ιδιότητες του μελιού

Οι φυσικές ιδιότητες του μελιού ποικίλλουν, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε νερό, τον τύπο της χλωρίδας που χρησιμοποιείται για την (βοσκή), τη θερμοκρασία, και την αναλογία των σακχάρων που περιέχει. Το φρέσκο μέλι είναι ένα υπερκορεσμένο υγρό, που περιέχει περισσότερα σάκχαρα από νερό και μπορεί τυπικά να διαλυθεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Σε θερμοκρασία δωματίου, το μέλι είναι ένα υπερψυγμένο υγρό, στο οποίο η γλυκόζη θα καθιζάνει σε στερεά κοκκία. Αυτό σχηματίζει ένα ημιστερεό διάλυμα με καταβυθισθέντες κρυστάλλους γλυκόζης σε ένα διάλυμα φρουκτόζης και άλλα συστατικά.

Το σημείο τήξεως του κρυσταλλικού μελιού είναι μεταξύ 40 και 50 ° C (104 και 122 ° F), ανάλογα με τη σύστασή του. Κάτω από αυτή τη θερμοκρασία, το μέλι μπορεί να είναι είτε σε μία μετασταθή κατάσταση, πράγμα που σημαίνει ότι δεν θα κρυσταλλωθεί μέχρι να προστεθεί ένας κρύσταλλος γλυκόζης, ή, πιο συχνά, είναι σε μια "ευκίνητη" κατάσταση, ένα κορεσμένο διάλυμα με αρκετά σάκχαρα να μπορούν να κρυσταλλωθούν αυθόρμητα. Το ποσοστό της κρυσταλλοποίησης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, αλλά ο πρωταρχικός παράγοντας είναι η αναλογία των κύριων

σακχάρων: φρουκτόζη σε γλυκόζη. Τα μέλια που είναι υπερκορεσμένα με ένα πολύ υψηλό ποσοστό της γλυκόζης, όπως το Brassica μέλι, θα κρυσταλλωθεί σχεδόν αμέσως μετά τη συγκομιδή, ενώ μέλι με χαμηλό ποσοστό γλυκόζης, όπως καστανιας ή Turpelo μέλι, δεν κρυσταλλώνεται. Ορισμένοι τύποι του μελιού μπορεί να παράγουν πολύ μεγάλους, αλλά λίγους κρύσταλλους, ενώ άλλα θα παράγουν πολλούς και μικρούς κρυστάλλους (Tomasik, 2004).

Η κρυστάλλωση επηρεάζεται επίσης από την περιεκτικότητα σε νερό, επειδή ένα υψηλό ποσοστό του νερού θα αναστέλλει την κρυστάλλωση, όπως και μια υψηλή περιεκτικότητα σε δεξτρίνη. Η θερμοκρασία επηρεάζει επίσης την ταχύτητα κρυστάλλωσης, με την ταχύτερη ανάπτυξη να λαμβάνει χώρα μεταξύ 13 και 17 ° C (55 και 63 ° F). Κρυστάλλινοι πυρήνες τείνουν να σχηματίζονται πιο εύκολα αν το μέλι έχει διαταραχθεί, με ανάδευση, ανακίνηση ή ανάδευση, παρά αν μείνει σε κατάσταση ηρεμίας. Ωστόσο, η πυρήνωση των μικροσκοπικών κρυστάλλων είναι μεγαλύτερη μεταξύ 5 και 8 ° C (41 και 46 ° F). Ως εκ τούτου, μεγαλύτεροι, αλλά λιγότεροι κρύσταλλοι τείνουν να σχηματίζονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ οι μικρότεροι αλλά πιο πολυάριθμοι κρύσταλλοι συνήθως σχηματίζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Κάτω από 5 ° C, το μέλι δεν θα κρυσταλλωθεί και, ως εκ τούτου, η αρχική υφή και γεύση μπορεί να διατηρηθεί επ' αόριστον (Kantor, 1999).

Δεδομένου ότι το μέλι υπάρχει κανονικά κάτω από το σημείο τήξης του, είναι ένα υπερψυγμένο υγρό. Σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, το μέλι δεν θα παγώσει. Αντ' αυτού, καθώς οι θερμοκρασίες γίνονται πιο χαμηλές, το ιξώδες του αυξάνεται. Όπως τα περισσότερα παχύρρευστα υγρά, το μέλι θα γίνει παχύ και υποτονικό με την ελάττωση της θερμοκρασίας. Στους -20 ° C (-4 ° F), το μέλι μπορεί να εμφανιστεί σαν στερεό, αλλά θα συνεχίσει να ρέει με πολύ αργούς ρυθμούς (Kantor, 1999 and Vidal Russell, 2000).

Ιξώδες

Το ιξώδες του μελιού επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τη θερμοκρασία και την περιεκτικότητα σε νερό. Όσο υψηλότερη είναι η υγρασία, τόσο πιο εύκολα θα ρέει το μέλι. Πάνω από το σημείο τήξης του, ωστόσο, το νερό έχει μικρή επίδραση επί του ιξώδους. Εκτός από την περιεκτικότητα σε νερό, η σύνθεση του μελιού έχει επίσης μικρή επίδραση επί του ιξώδους, με την εξαίρεση λίγων τύπων μελιού. Στους 25 ° C (77 ° F), μέλι με 14% υγρασία γενικά θα έχει ένα ιξώδες περίπου 400 poise, ενώ ένα μέλι που περιέχει 20% υγρασία θα έχει ένα ιξώδες περίπου 20 poise. Αύξηση

του ιξώδους λόγω της θερμοκρασίας λαμβάνει χώρα πολύ αργά στην αρχή. Ένα μέλι που περιέχει 16% υγρασία, στους 70 ° C (158 ° F), θα έχει ένα ιξώδες περίπου 2 poise, ενώ στους 30 ° C (86 ° F), το ιξώδες του θα είναι περίπου 70 poise. Καθώς εξελίσσεται η ψύξη, το μέλι θα γίνει πιο παχύρρευστο με ένα συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό, φθάνοντας 600 poise περίπου στους 14 ° C (57 ° F). Ωστόσο, ενώ το μέλι είναι πολύ παχύρρευστο, έχει μάλλον χαμηλή επιφανειακή τάση (Value-added products from beekeeping, 1996 and Bogdanov, 2009).

Αγωγιμότητα

Δεδομένου ότι το μέλι περιέχει ηλεκτρολύτες, με τη μορφή των οξέων και μετάλλων, παρουσιάζει διάφορους βαθμούς ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Οι μετρήσεις της ηλεκτρικής αγωγιμότητας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ποιότητας του μελιού από την άποψη της περιεκτικότητας σε τέφρα (Bogdanov, 2009)

Το μέλι έχει την ικανότητα να απορροφά την υγρασία απευθείας από τον αέρα, ένα φαινόμενο που ονομάζεται υγροσκοπία. Η ποσότητα του νερού που θα απορροφήσει το μέλι εξαρτάται από τη σχετική υγρασία του αέρα. Επειδή το μέλι περιέχει ζύμες, πρέπει να αποθηκεύεται σε σφραγισμένα δοχεία για να αποφευχθεί η ζύμωση, η οποία αρχίζει συνήθως όταν η υγρασία του μελιού ανεβαίνει πολύ πάνω από 25%.

Η ζύμωση του μελιού θα συμβεί συνήθως μετά από την κρυστάλλωση, διότι χωρίς την γλυκόζη, το τμήμα του υγρού μελιού αποτελείται κυρίως από ένα συμπυκνωμένο μίγμα φρουκτόζης, οξέων, και νερό. Μέλι που πρόκειται να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου για μεγάλες χρονικές περιόδους συχνά παστεριώνεται, για να σκοτώσει οποιαδήποτε ζύμη, με θέρμανση πάνω από 70 ° C (158 ° F).

Θερμικά χαρακτηριστικά

Όπως όλα τα σάκχαρα, το μέλι θα καραμελωθεί εάν θερμανθεί επαρκώς, θα πάρει πιο σκούρο χρώμα, και τελικά θα καραμελώσει. Ωστόσο, το μέλι περιέχει φρουκτόζη, η οποία μπορεί να καραμελοποιηθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από ό,τι η γλυκόζη (Hans-Dieter Belitz, 2004). Η θερμοκρασία στην οποία αρχίζει η καραμελοποίηση ποικίλλει, ανάλογα με τη σύνθεση, αλλά είναι τυπικά μεταξύ 70 και 110 ° C (158 και 230 ° F). Μέλι περιέχει επίσης οξέα, τα οποία δρουν ως καταλύτες, μειώνοντας τη θερμοκρασία καραμελοποίησης ακόμη περισσότερο.

Η περιεκτικότητα σε οξέα

Το μέσο pH του μελιού είναι 3,9, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 3,4 έως 6,1. Το μέλι περιέχει πολλά είδη οξέων, οργανικά και αμινοξέα. Ωστόσο, οι διάφοροι τύποι και τα ποσά τους ποικίλουν σημαντικά, ανάλογα με το είδος του μελιού. Αυτά τα οξέα μπορεί να είναι αρωματικές ή αλειφατικές (μη-αρωματικές) ενώσεις. Τα αλειφατικά οξέα συμβάλλουν σημαντικά στη γεύση του μελιού από την αλληλεπίδραση με τις γεύσεις των άλλων συστατικών. Το γλυκονικό οξύ, για παράδειγμα, είναι ένα ενισχυτικό γεύσης.

Το μέλι μπορεί να περιέχει έως και 18 από τα 20 αμινοξέα. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε αμινοξέα είναι σχεδόν αμελητέα στο μέλι καθώς αυτά αντιπροσωπεύουν μόνο το 0,05-0,1% της σύνθεσης. Το κύριο αμινοξύ είναι η προλίνη. Τα αμινοξέα προέρχονται σχεδόν αποκλειστικά από τα σώματα των μελισσών.

Τα οργανικά οξέα περιλαμβάνουν τα περισσότερα από τα οξέα στο μέλι, αντιπροσωπεύοντας 0,17 έως 1,17% του μίγματος. Το γλυκονικό οξύ είναι το πιο διαδεδομένο. Το γλυκονικό οξύ σχηματίζεται από τη δράση ενός ενζύμου που ονομάζεται οξειδάση της γλυκόζης. Άλλα οργανικά οξέα είναι το μυρμηκικό, οξικό, βουτυρικό, κιτρικό, γαλακτικό, μηλικό, πυρογλουταμικό, προπιονικό, βαλεριανικό, καπρονικό, παλμιτικό, και ηλεκτρικό, μεταξύ πολλών άλλων (Wilkins, 1995).

1.4.3 Διατροφική αξία μελιού

Το μέλι αποτελείται από 70-80% από σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη και έχει μεγάλη θρεπτική αξία, αφού απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό (1 κουταλιά της σούπας μέλι αποδίδει στον οργανισμό 64 Kcal). Έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 180 διαφορετικές ουσίες στο μέλι που το καθιστούν πολύτιμη τροφή. Περιέχει νερό σε ποσοστό 16%, οργανικά οξέα (δεκαοκτώ τον αριθμό), πρωτεΐνες και αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία σε μικρές ποσότητες (κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο κ.ά.), ένζυμα, συμπλέγματα πρωτεϊνών, βιταμίνες (B2, B6, C, D, E, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ κ.α.), φυσικές αρωματικές ουσίες κ.α. Το μέλι έχει υψηλή ενεργειακή και θρεπτική αξία. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού συμμετέχουν σε διάφορα ενζυμικά συστήματα και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Αυτό που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον

δεν είναι τόσο τα επιμέρους θρεπτικά συστατικά του μελιού όσο η συνύπαρξη όλων αυτών και ο τρόπος με τον οποίο δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό.



1.4.4. Ευεργετικές δράσεις του μελιού στον άνθρωπο

Το μέλι έχει ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Herold 1970), κάποιες από αυτές είναι:

- Δρα ως δυναμωτικό
- Επιδράσεις στην καρδιά
- Επιδράσεις στο ήπαρ
- Επιδράσεις στο πεπτικό σύστημα
- Επούλωση τραυμάτων
- Αντιφλεγμονώδη δράση
- Αντιοξειδωτική δράση
- Υποβοήθηση του ανοσοποιητικού συστήματος

1.4.5. Το μέλι ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Για πολλές εκατοντάδες χρόνια το μέλι χρησιμοποιούνταν για θεραπεία πληγών καθώς και ως θεραπεία παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος (Majno G, 1975 and Zumla A, 1989). Το μέλι έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά παθογόνων μικροοργανισμών και βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα τρόφιμα (Cooper RA, 2002; Kwakman, 2008; Mundo, 2004; Taormina PJ, 2001). Η ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Cooper RA,

2002) και η επιτυχής εφαρμογή του στη θεραπεία χρόνιων μολυσμένων πληγών που δεν ανταποκρίνονται στην αντιβιοτική θεραπεία (Efem S.E.E., 1988), προσέλκυσε εκ νέου το ενδιαφέρον της μοντέρνας ιατρικής για το μέλι ως εναλλακτική θεραπεία.

Πρόσφατα αναγνωρίστηκε η ισχυρή αντιβακτηριακή του δράση καθώς και η ικανότητα του να παρεμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων σε μολυσμένες πληγές καθώς και να τις καθαρίζει (Stomfay-Stitz, 1960, Zumla and Lulat, 1989). Έρευνες (Willix, 1992 and Cooper, 2002) δείχνουν ότι το μέλι είναι αποτελεσματικό *in vitro* ενάντια βακτηρίων που μολύνουν πληγές συμπεριλαμβανομένων *E.coli*, *S.aureus* κ.α. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στην ενζυμική παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (Dustmann, 1979 and Molan, 1992a), της οξύτητας του και της ώσμωσης του. Επιπρόσθετα, συστατικά του μελιού, όπως αρωματικά οξέα ή φαινολικές ενώσεις και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη συνολική αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Weston, 1999).

1.4.6. Μέλι και Αντιοξειδωτική δράση

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες που προκαλείται λόγω των ελευθέρων ριζών είναι καλά τεκμηριωμένος. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και δραστικά είδη αζώτου (RNS), όπως ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH} \bullet$), του υπεροξειδίου, του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), το νιτρικό οξείδιο ($\text{NO} \bullet$), το υπεροξεινιτρικό (ONOO^-), και άλλα, είναι οξειδωτικοί παράγοντες που προκαλούν λιπιδική υπεροξείδωση, οξείδωση των πρωτεϊνών και του DNA στα κύτταρα (S. Orrenius, 2007). Τα κύτταρα εμφανίζουν ένα αμυντικό σύστημα κατά της οξειδωτικής βλάβης. Αυτό το αμυντικό σύστημα αποτελείται από αντιοξειδωτικά ή ενζυμικούς προστατευτικούς παράγοντες όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η περοξειδάση, το ασκορβικό οξύ, η τοκοφερόλη, και οι πολυφαινόλες (G. Block, 1992). Τα αντιοξειδωτικά που ενεργούν ως μέσα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών μπορεί να αναστέλλουν τη διαδικασία του καρκίνου *in vivo* (G. Block, 1992). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών δεν είναι καλά διευκρινισμένος, αλλά ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι μέσω μεταφοράς ενός υδρογόνου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού συμβάλλει στην πρόληψη αρκετών οξειών και χρόνιων παθήσεων όπως ο διαβήτης (O. O. Erejuwa, 2010), οι φλεγμονώδεις διαταραχές (E. K. Akkol, 2010), καρδιαγγειακές παθήσεις (M. K. Rakha, 2008), ο καρκίνος (M. I. Hassan, 2012 and S.

Dragan, 2007). Τα φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή είναι σε σημαντικό βαθμό υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού (T. Nagai, 2001).

Η αντικαρκινική δράση του μελιού μπορεί να αποδοθεί στην αντιοξειδωτική δράση του (M. I. Hassan, 2012 and S. Dragan, 2007). Καθημερινή κατανάλωση μελιού σε ποσότητα 1,2 g/kg βάρους σώματος έχει δειχθεί να ανυψώνει τα επίπεδα και τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως τη βήτα-καροτίνη, τη βιταμίνη C, την αναγωγή της γλουταθειόνης, και του ουρικού οξέος (N. S. Al-Waili, 2003).

1.5. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση (με τη χρήση μοριακών μεθόδων) της αντιοξειδωτικής δράσης, σε μέλια που παράγονται στην ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου. Στο πρώτο μέρος της μελέτης και για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Επίσης προσδιορίστηκε το συνολικό πολυφαινολικό δυναμικό των μελιών με τη μέθοδο Folin. Στη συνέχεια τα μέλια με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση επεξεργάστηκαν με την μέθοδο freeze drying με αποτέλεσμα την λήψη σκόνης. Αυτό έγινε με σκοπό τη δημιουργία ενός έμμεσου προϊόντος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν πρόσθετο σε άλλα προϊόντα με φαρμακευτικά δράση. Τα εκχυλίσματα μελιού μελετήθηκαν όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση με τις μεθόδους DPPH και ABTS. Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν και στο μέλι αναφοράς Manuka. Σκοπός ήταν να γίνει μια σύγκριση μεταξύ μελιών του Ολύμπου με το μέλι Manuka που προέρχεται από τη Νέα Ζηλανδία και είναι γνωστό για τις αντιβακτηριδιακές του δράσεις.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγματα Μελιού

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 13 μέλια της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου και συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka της Νέας Ζηλανδίας. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι περιοχές από τις οποίες προήλθε το μέλι κάθε δείγματος.

Πίνακας 1: Δείγματα μελιών

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Περιοχή προέλευσης
δείγμα 1	Καρυά Ολύμπου
δείγμα 2	Ελασσόνα Ολύμπου
δείγμα 3	Συκέα Ελασσόνας
δείγμα 4	Παλιάμπελα Βερδικούσια
δείγμα 5	Δομένικο
δείγμα 6	Σκαμνιά
δείγμα 7	Σαραντάπορο
δείγμα 8	Κρανιά
δείγμα 9	Άζωρος
δείγμα 10	Βερδικούσια
δείγμα 11	Καλλιθέα
δείγμα 12	Καρυά Ολύμπου
δείγμα 13	Όλυμπος
δείγμα 14	Manuka - Νέα Ζηλανδία

2.2 Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός βασίζεται σε μια φασματοφωτομετρική μέθοδο κατά την οποία μέσω μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC) (Vermeris & Nicholson, 2006; Singleton & Rossi, 1965). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , και αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

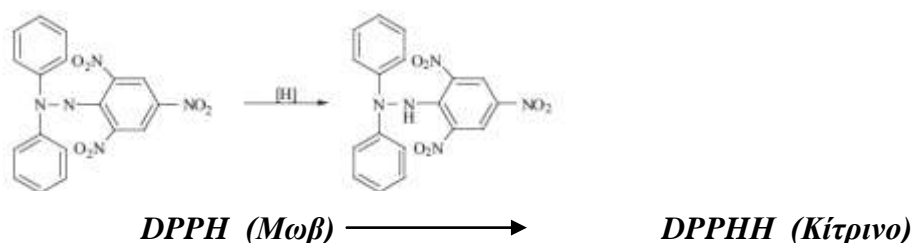
Σε σωληνάρια falcon των 2 mL προστίθενται απιονισμένο νερό όγκου 1 mL και 20 μL του προς εξέταση δείγματος, φυτικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος. Στο τυφλό προστίθενται 1ml και 20 μL απιονισμένου H_2O . Στην συνέχεια προστίθενται 100 μL του αντιδραστηρίου FC. Τα δείγματα ανακινούνται και μετά την πάροδο 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 280 μL διαλύματος Na_2CO_3 25% w/v. Το μίγμα ανακινείται. Ακολουθεί συμπλήρωση του όγκου στα 2 mL με απιονισμένο νερό. Το μίγμα ανακινείται ξανά και επώαζεται για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500 (San Jose, USA) ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Εξετάστηκε ακόμη και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραιώση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0, 31,25, 62,5, 125, 250 και 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 0,001x - 0,0027$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $r = 0,998$ με

$p < 0,01$. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος.

2.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Αντίδραση 5). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Αντίδραση 5: Η αναγωγή του DPPH σε DPPH:H

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH[•]) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 7). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα της ρίζας DPPH[•] σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 6: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
DPPH[•]	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 7: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 517nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_s : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

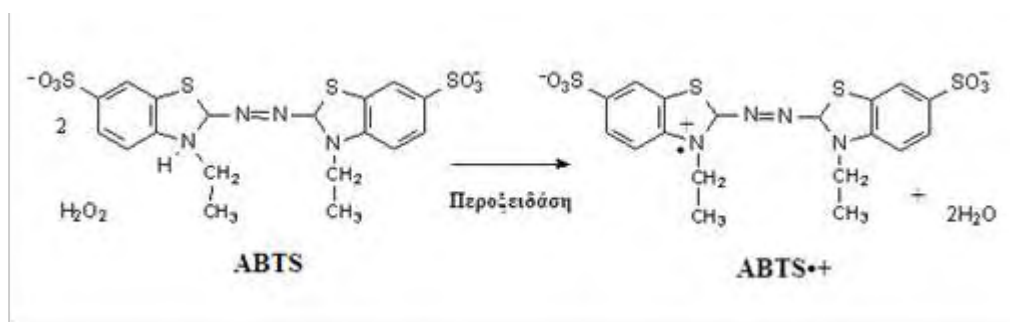
Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

2.4 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

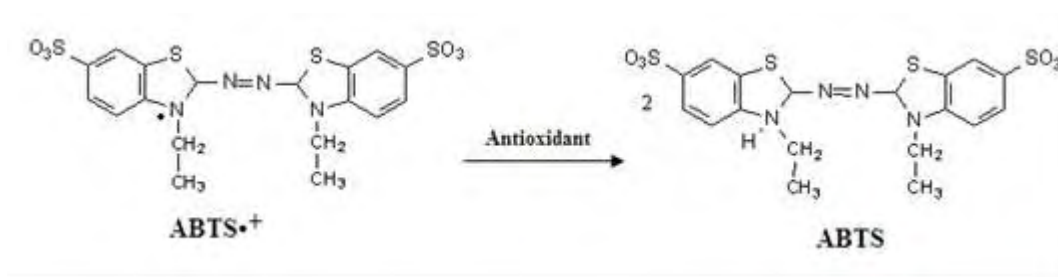
Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller (Miller & Rice-Evans, 1993), βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του (ABTS) και την δημιουργία μιας δραστικής ρίζας, του κατιόντος ABTS^{•+} (Αντίδραση 6). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να

ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Αντίδραση 7) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999)



Αντίδραση 6: Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Αντίδραση 7: Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 80 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1100μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξειδίο του υδρογόνου H₂O₂ και το ένζυμο περοξειδάση. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 8). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των ουσιών ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 10).

Πίνακας 8: Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400 μL	400μl	400μl
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500μl	500μl
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50μl	50μl
HRP	-	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL

Επώαση 45 min

Πίνακας 9: προσθήκη εκχυλίσματος

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl
Μεθανόλη	50μl	50μl	-	-	-	-	-

V τελ	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl	1100μl
--------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Πίνακας 10: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL	450 μL
ABTS	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
H₂O₂	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
Μεθανόλη	50 μL	-	-	-	-	-

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 730nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_8) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730nm

A₈: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730nm

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην

οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

2.5 Λυοφιλίωση για την παραγωγή σκόνης από μέλι

Η λυοφιλίωση πραγματοποιήθηκε στα μέλια με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Αυτό έγινε με σκοπό την παραγωγή σκόνης η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν πρόσθετο σε προϊόντα με φαρμακευτική δράση.

Η λυοφιλίωση αποτελεί διεργασία ξήρανσης ενός καταψυγμένου προϊόντος μέσω εξάχνωσης του πάγου. Κατά τη συγκεκριμένη διεργασία λαμβάνουν χώρα δύο φαινόμενα:

A) η μεταφορά υδρατμού από την επιφάνεια του πάγου ή από το εσωτερικό του προς ξήρανση υλικού στο εξωτερικό περιβάλλον και

B) η μεταφορά θερμότητας από το εξωτερικό περιβάλλον στην επιφάνεια του πάγου.

Από θερμοδυναμική άποψη η εξάχνωση του πάγου βασίζεται στο διάγραμμα φάσεων του ύδατος. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα εξάχνωση πραγματοποιείται όταν περνάμε από τη στερεά φάση κατευθείαν στην αέρια φάση (καμπύλη εξάχνωσης TA). Για να επιτύχουμε λοιπόν εξάχνωση από μία στερεά κατάσταση θα πρέπει να επικρατούν συνθήκες ξήρανσης (πίεση και Θερμοκρασία) τέτοιες ώστε να είμαστε χαμηλότερα του τριπλού σημείου (T) του ύδατος (0°C, 6,11 mbar). Στη πράξη η επικρατούσα πίεση κατά τη διάρκεια της ξήρανσης με κατάψυξη βρίσκεται συνήθως μεταξύ 0,25 και 0,65 mbar.

Η διεργασία της ξήρανσης με κατάψυξη διακρίνεται σε δύο στάδια:

α) Το πρώτο στάδιο αφορά τη κατάψυξη του προς ξήρανση στερεού με σκοπό τον σχηματισμό όλου του περιεχόμενου ύδατος σε μορφή πάγου. Σημειώνεται ότι ο τρόπος κατάψυξης επηρεάζει το τελικό προϊόν (π.χ. μικροί ή μεγάλοι κρύσταλλοι πάγου).

β) Το δεύτερο στάδιο αφορά τη ξήρανση του κατεψυγμένου προϊόντος με σκοπό την μετάδοση θερμότητας στο πάγο υπό κατάλληλες συνθήκες πίεσης για να επιτύχουμε εξάχνωση.

Η λυοφιλίωση, μετατράπηκε για πρώτη φορά σε εμπορική τεχνική στα τέλη του 1930 και εφαρμόστηκε για τη διατήρηση του πλάσματος του αίματος, χωρίς την ανάγκη ψύξης και την παραγωγή στιγμιαίου καφέ. Από τότε, η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για τη διατήρηση εκατοντάδων διαφορετικών ειδών τροφίμων και φαρμάκων.

Η σύγχρονη τεχνική λυοφιλίωσης πραγματοποιείται με τη χρήση μιας ειδικής συσκευής: το λυοφιλιωτή. Αυτό το μηχάνημα αποτελείται από ένα μεγάλο θάλαμο για κατάψυξη και από μία αντλία κενού για απομάκρυνση της υγρασίας. Η επεξεργασία περιλαμβάνει 4 στάδια:

- 1) κατάψυξη, ώστε να δημιουργηθούν οι συνθήκες για ξήρανση σε χαμηλή θερμοκρασία,
- 2) αντλία κενού για να επιτυγχάνεται η εξάτμιση του παγωμένου νερού/διαλύτη χωρίς να περνά από την υγρή φάση, π.χ. εξάχνωση,
- 3) εφαρμογή θερμότητας για να επιταχυνθεί η εξάχνωση,
- 4) συμπίκνωση του εξεταμμένου διαλύτη από τον θάλαμο κενού με τη μετατροπή του ξανά σε στερεό.

Αφού η διαδικασία της ψύξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Η αργή ψύξη θα σχημάτιζε πολύ μεγαλύτερους κρυστάλλους πάγου και θα μπορούσε να καταστρέψει τη δομή του προϊόντος; με την εισχώρηση των κρυστάλλων στα κυτταρικά τοιχώματα. Στο στάδιο της εφαρμογής κενού, η χαμηλή πίεση προστατεύει τα παγωμένα προϊόντα από το να λιώσουν και επιταχύνει το επόμενο στάδιο της διαδικασίας που είναι το πρωταρχικό στάδιο της ξήρανσης. Η εξάχνωση του πάγου διασφαλίζει ότι η δομή του προϊόντος παραμένει ανέπαφη. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Στο δεύτερο στάδιο της ξήρανσης, που μερικές φορές λαμβάνει χώρα σε υψηλότερες θερμοκρασίες, το νερό που είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες μέσα στο προϊόν, επίσης, απομακρύνεται.

Η λυοφιλίωση μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξεως του 1-4%, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και μούχλας, αλλά και τη δράση των ενζύμων από το να προκαλέσουν χημικές αντιδράσεις αλλοίωσης στα τρόφιμα. Τα λυοφιλιωμένα προϊόντα έχουν μακρά

διάρκεια ζωής, σε σφραγισμένη συσκευασία που τα προστατεύει από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο και μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια.

Μετά την επανυδάτωση, τα λυοφιλιωμένα προϊόντα μπορεί να έχουν καλύτερη γεύση, υφή και εμφάνιση σε σύγκριση με κάποιες άλλες τεχνικές διατήρησης τροφίμων.

Τα μειονεκτήματα της λυοφιλίωσης είναι:

α) Το κόστος της. Είναι περίπου 4-8 φορές πιο ακριβή από την τεχνική ξήρανσης με ζεστό αέρα με ψεκασμό (spray drying) και καταναλώνει 2-5 φορές περισσότερη ενέργεια.

β) Είναι ασυνεχής μέθοδος (γίνεται σε στάδια) και απαιτεί πολλούς χειρισμούς, οι χρόνοι που απαιτούνται για την ξήρανση είναι σημαντικά μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους χρόνους.

γ) Μπορεί, επίσης, να υπάρχουν προβλήματα με οξειδωτικό τάγγισμα στα προϊόντα λυοφιλίωσης, λόγω του χαμηλού ποσοστού υγρασίας που περιέχουν. Ως εκ τούτου, ορισμένα από αυτά τα προϊόντα, π.χ. προϊόντα κρέατος, μπορούν να απαιτούν την προσθήκη αντιοξειδωτικών. Για τους λόγους αυτούς, η λυοφιλίωση έχει χρησιμοποιηθεί μόνο για προϊόντα, όπου η ποιότητα είναι ύψιστης σημασίας, όπως διατροφολογικά συστατικά, εμβόλια, αντιβιοτικά, στιγμιαίος καφές, λαχανικά; βότανα και μπαχαρικά, trekking meals, φρούτα για δημητριακά πρωινού, τρόφιμα για αστροναύτες, στιγμιαίες σούπες πολυτελείας, χημικά προϊόντα υψηλής αξίας και χρωστικές ουσίες.

Πειραματική εγκατάσταση

Η πειραματική εγκατάσταση αποτελείται από:

1. λυοφιλιωτή με κατάψυξη (Freeze Dryer) ο οποίος περιλαμβάνει:

α. Φιάλη τοποθέτησης δειγμάτων στον οποίο πραγματοποιείται η ξήρανση υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης κενού.

β. Συμπυκνωτήρα με ψυκτικό κύκλωμα για τη συμπύκνωση και κατάψυξη των υδρατμών, που προέρχονται από τη ξήρανση των δειγμάτων.

2. Αντλία κενού με λάδι για τη δημιουργία στο θάλαμο ξήρανσης

Πειραματική διαδικασία

1. Απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα υγρού από τον κάδο συμπύκνωσης της συσκευής και κλείνουμε τον κρουνό εκκένωσης.
2. Βεβαιωνόμαστε ότι ο κρουνός ελέγχου του αγωγού κενού μεταξύ αντλίας και λυοφιλιωτή είναι κλειστός.
3. Θέτουμε σε λειτουργία την αντλία κενού και τον λυοφιλιωτή.
4. Έπειτα από 30 λεπτά και με την πράσινη λυχνία του λυοφιλιωτή αναμμένη ανοίγουμε τον κρουνό ελέγχου του αγωγού κενού μεταξύ αντλίας και λυοφιλιωτή.
5. Τοποθετούμε τα προς ξήρανση παγωμένα δείγματα εντός των φιαλών ξήρανσης.
6. Περιστρέφουμε τους κρουνούς ελέγχου κενού των φιαλών για την έναρξη ξήρανσης των δειγμάτων.
7. Με την ολοκλήρωση της ξήρανσης περιστρέφουμε τους κρουνούς ελέγχου κενού των φιαλών για την λήξη ξήρανσης των δειγμάτων .
8. Κλείνουμε τον κρουνό ελέγχου του αγωγού κενού μεταξύ αντλίας και λυοφιλιωτή.
9. Διακόπτουμε την λειτουργία του λυοφιλιωτή.
10. Παραλαμβάνουμε τα λυοφιλιωμένα δείγματά μας.
11. Έπειτα από 45' λεπτά διακόπτουμε την λειτουργία της αντλίας κενού.

Για την παραγωγή σκόνης από μέλι ακολουθήθηκαν τα εξής:

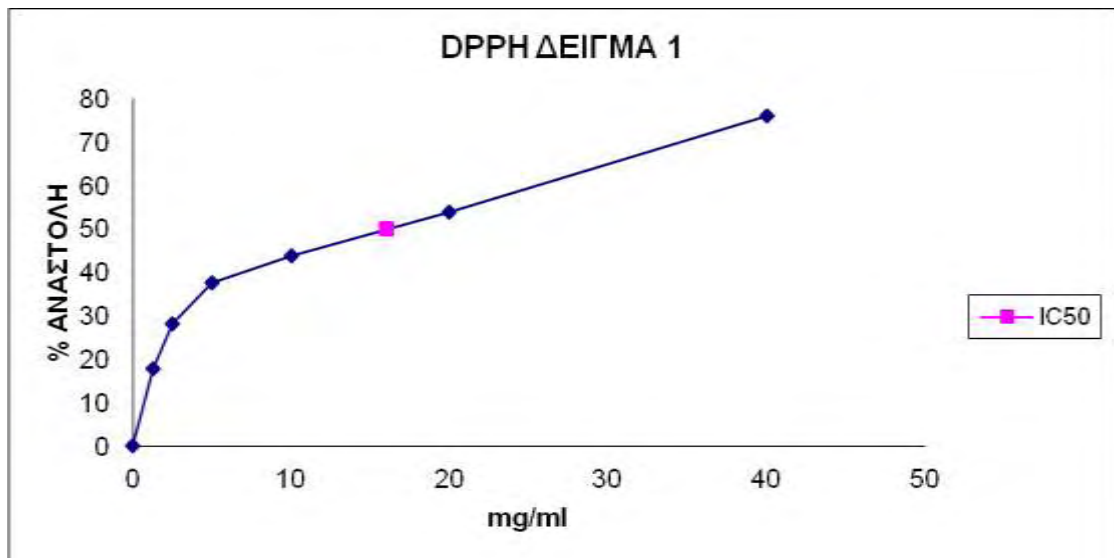
1. Σε ένα διάλυμα 180 gr τοποθετήθηκε σε αναλογία 120 gr νερό,30 gr μέλι,30 gr μαλτροδεξτρίνη και 0.2 gr aerosol (colloidal silicone dioxide).
2. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση για 10 λεπτά.
3. Ζυγίστηκε το συνολικό βάρος (ακριβές).
4. Τοποθετήθηκε στην κατάψυξη μέχρι να δημιουργηθεί μία κρούστα.
5. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο freeze-dryer για 48 περίπου ώρες.
6. Πάρθηκε ένα κρυσταλλικό προϊόν το οποίο τρίφτηκε για να μετατραπεί σε κόκκους.

7. Τοποθετήθηκε στο μπλέντερ στην 1η σκάλα για 30 sec για να ληφθεί το τελικό προϊόν (σκόνη).
8. Κοσκινίστηκε και το συσκευάστηκε σε σακουλάκι το οποίο σφραγίστηκε με ειδικό μηχάνημα.

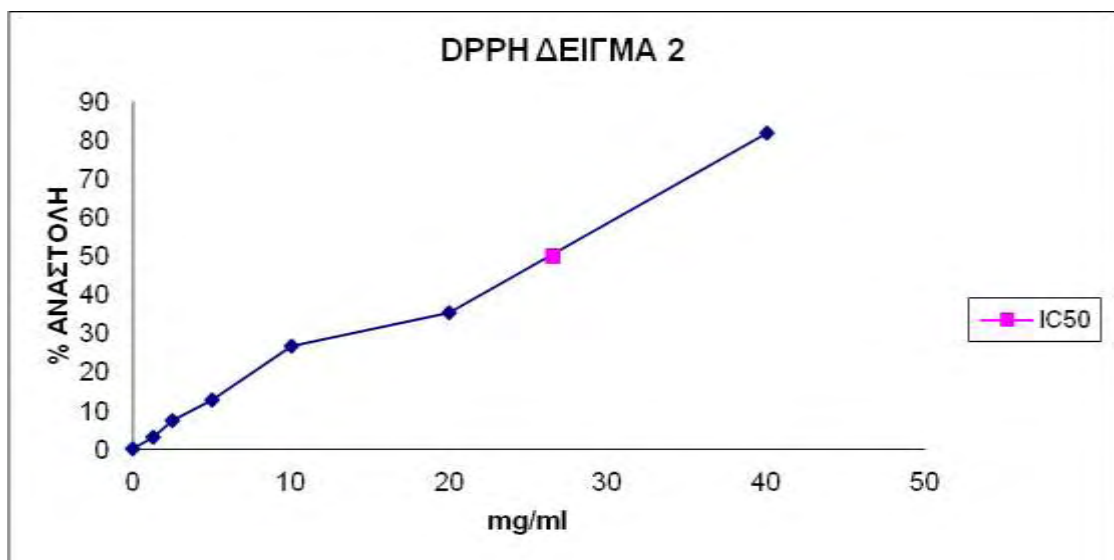
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•

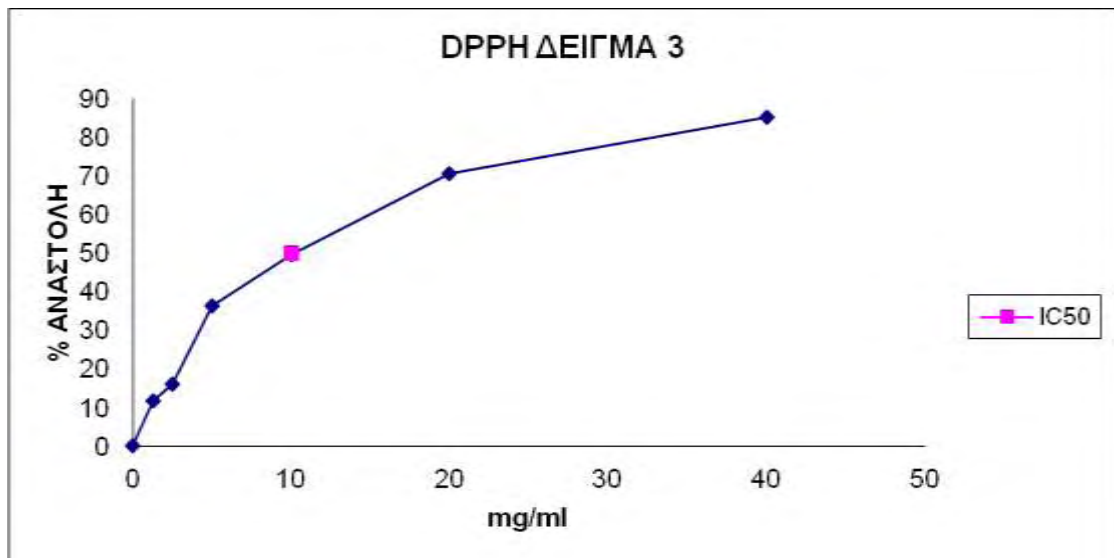
Συνολικά μελετήθηκαν 14 δείγματα μελιού της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου καθώς και το μέλι Manuka από την Νέα Ζηλανδία σαν μέλι αναφοράς. Τα 14 δείγματα εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις από 1,25 έως 160 mg/ml. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 7,5 mg/ml έως 109 mg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το δείγμα μελιού 8 (αγριοτριφύλλο, ακακία, θράμπη, μέντα, βελανιδιά- Κρασιά Ελασσόνας) (Γράφημα 7) με IC₅₀ ίσο με 7,5 mg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το μέλι του δείγματος 5 (Τρύγος Ιούλιος-Δομένικο) (Γράφημα 5) με IC₅₀ ίσο με 109 mg/ml. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



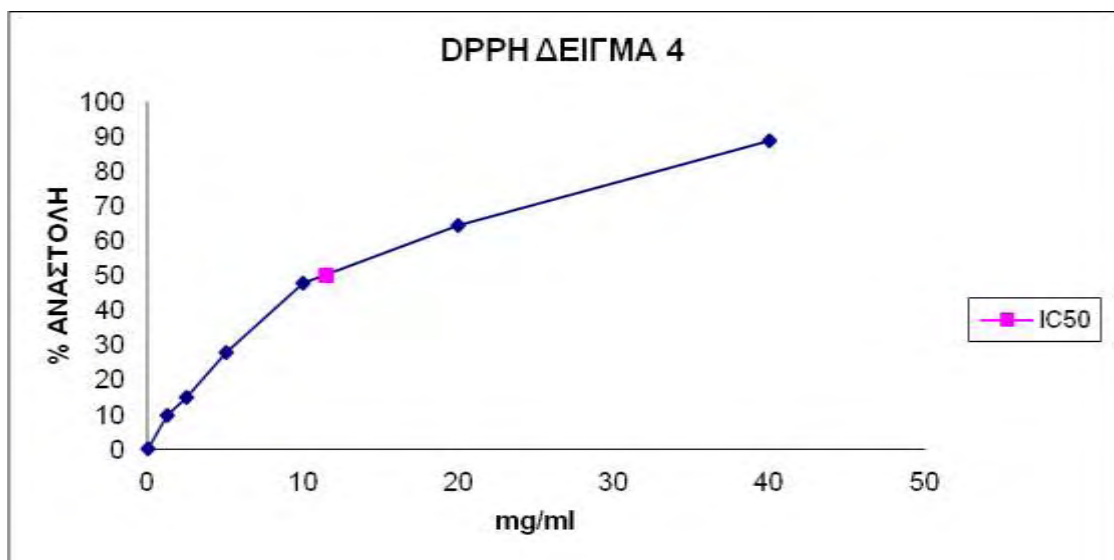
Γράφημα 1: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 1 (Καρνά Ολύμπου)



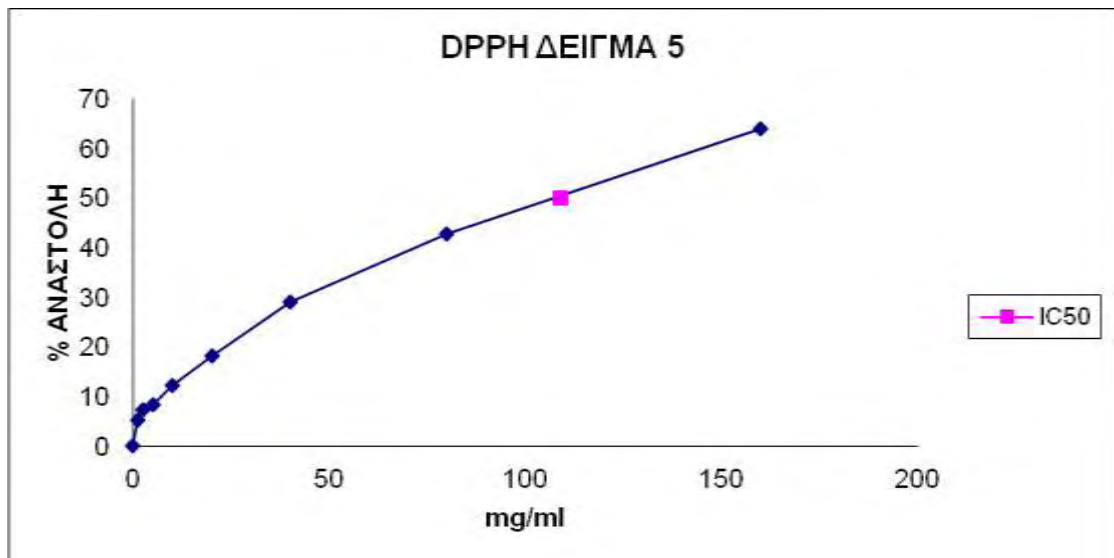
Γράφημα 2: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 2 (Ελασσόνα Ολύμπου)



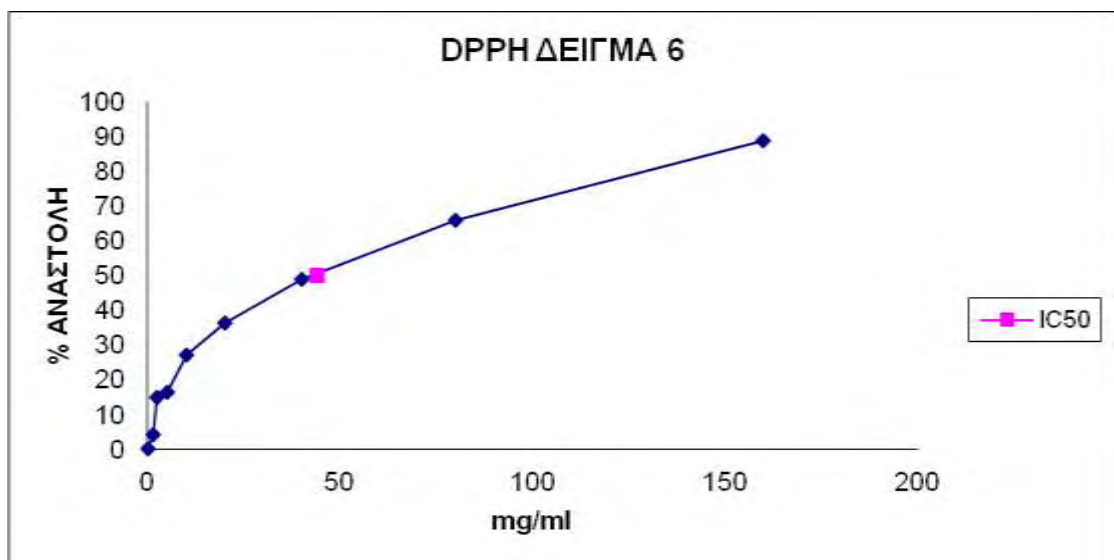
Γράφημα 3: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 3 (Συκέα Ελασσόνας)



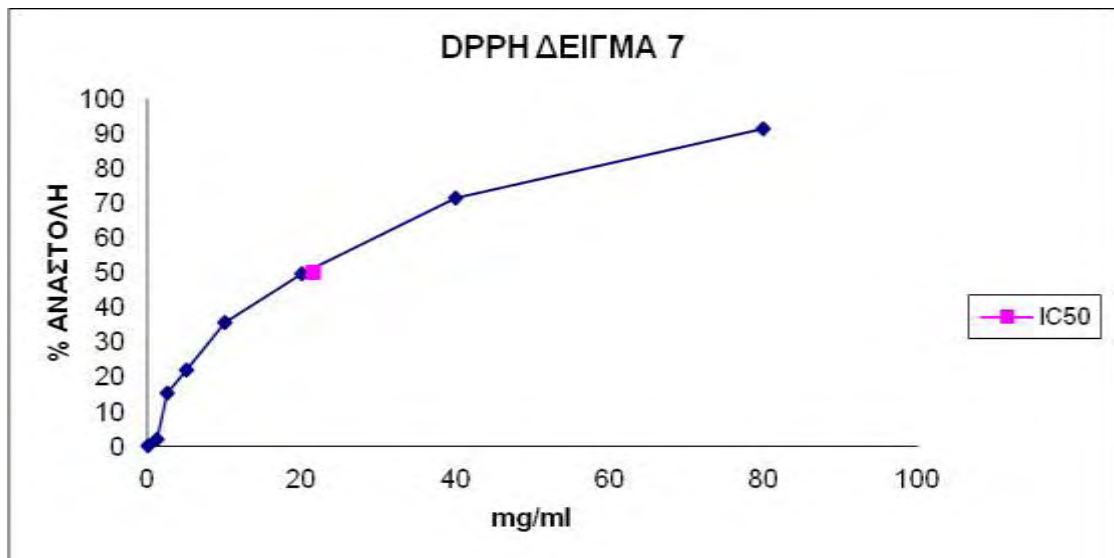
Γράφημα 4: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 4 (Παλιάμπελα Βερδικούσιας)



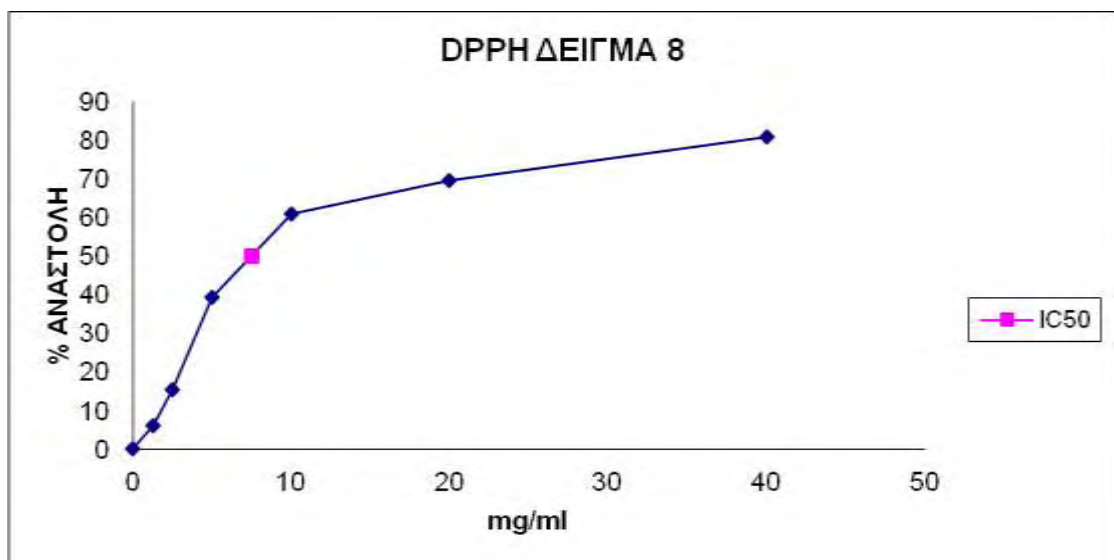
Γράφημα 5: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 5 (Δομένικο)



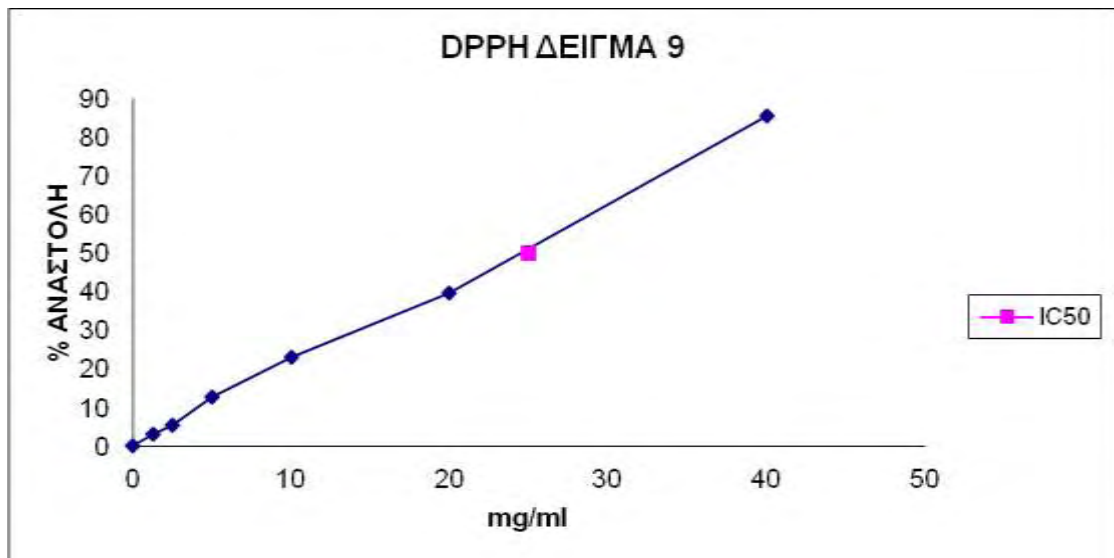
Γράφημα 6: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 6 (Σκαμνιά)



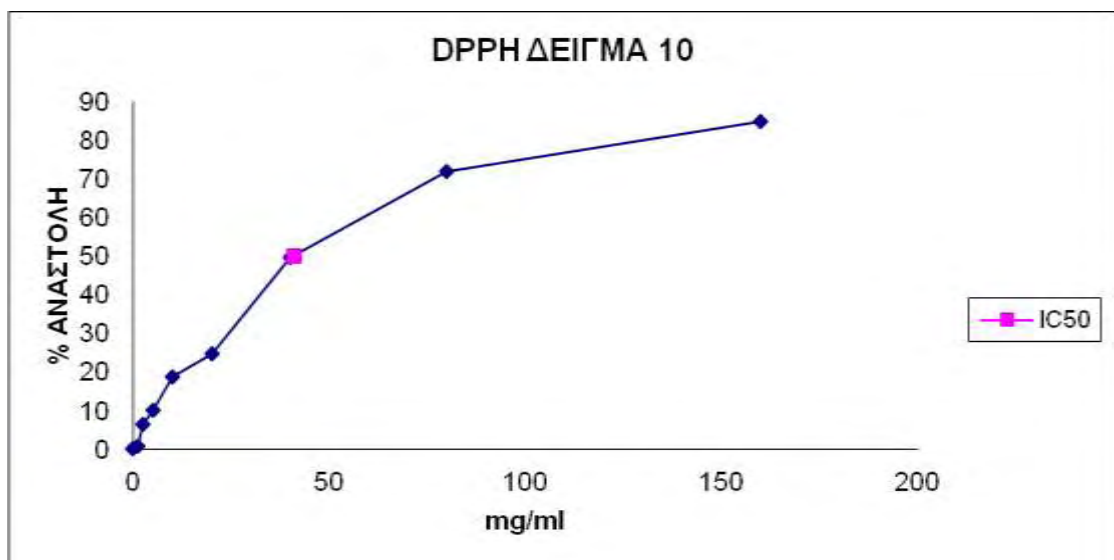
Γράφημα 7: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 7 (Σαραντάπορο)



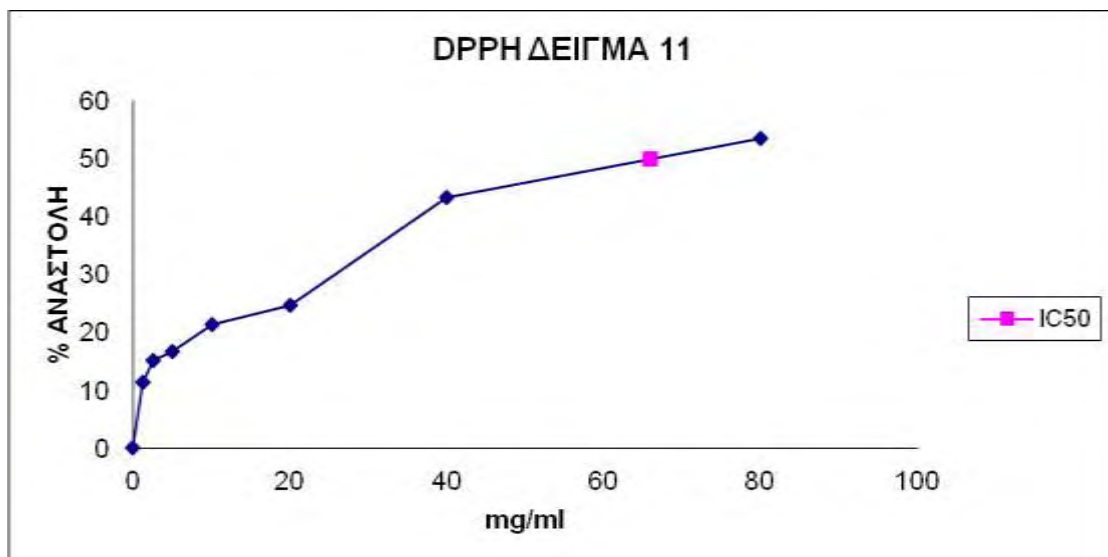
Γράφημα 8: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 8 (Κρανιά Ελασσόνας)



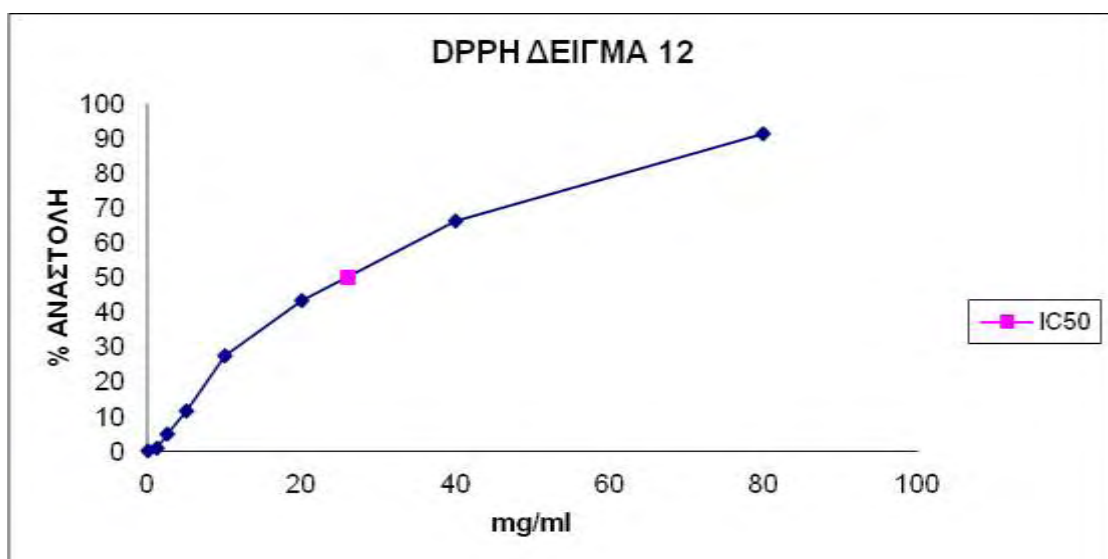
Γράφημα 9: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 9 (Αζωρος Ελασσόνας)



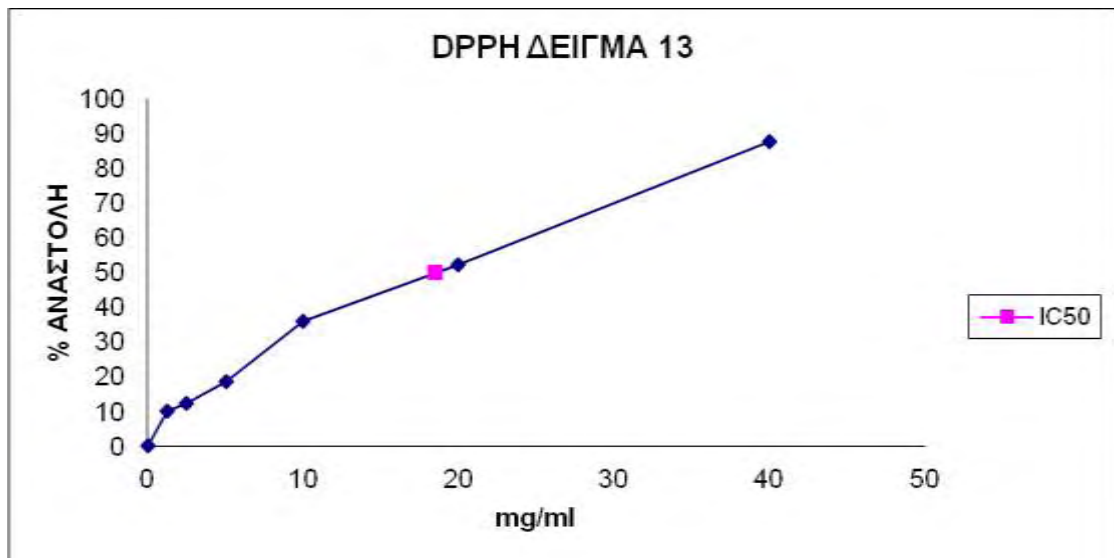
Γράφημα 10: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 10 (Βερδικούσια)



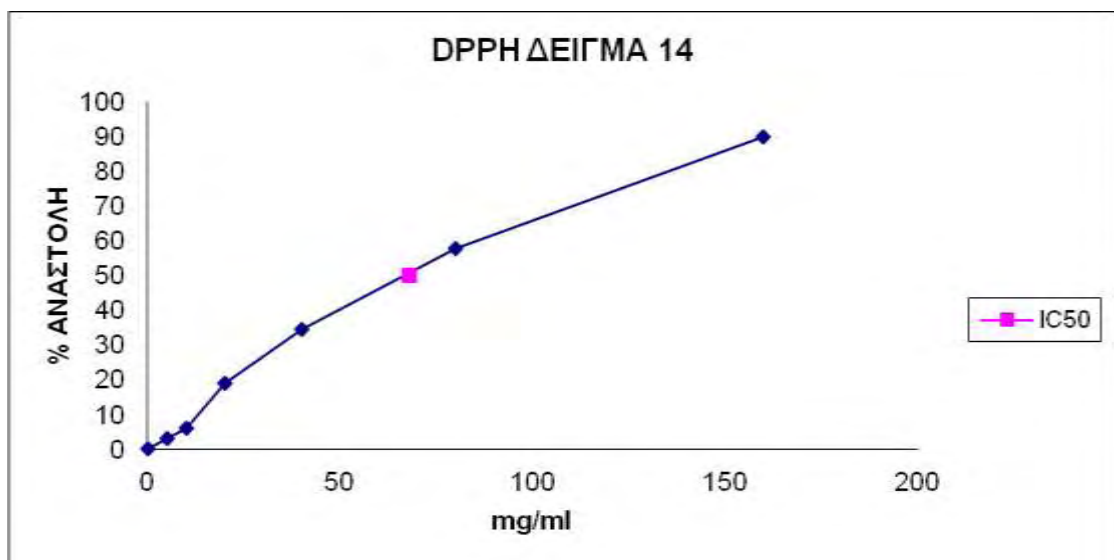
Γράφημα 11: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 11 (Καλλιθέα Ελασσόνας)



Γράφημα 12: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 12 (Καρυά Ολύμπου)



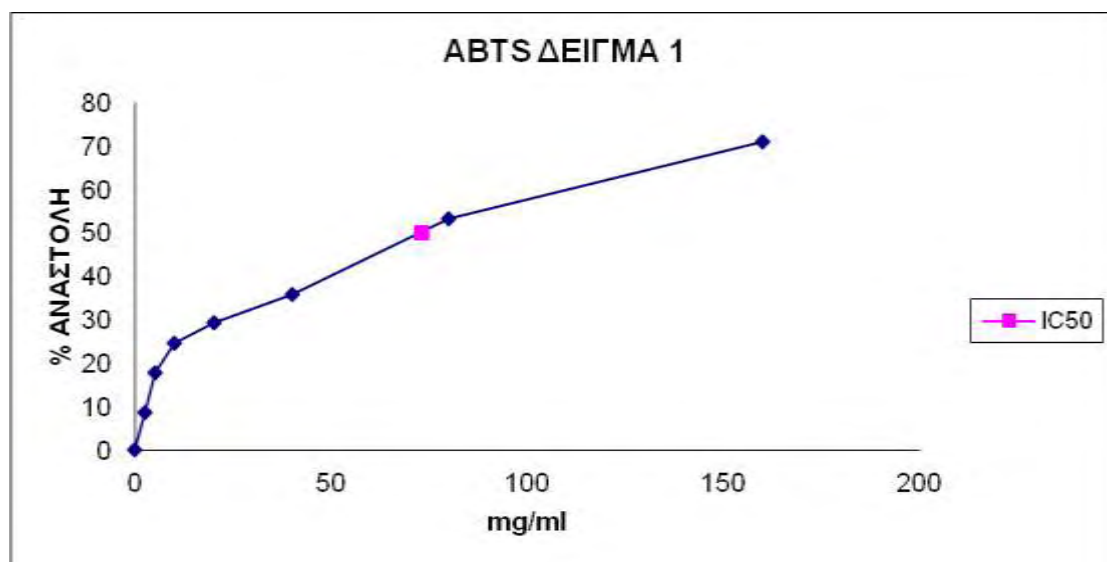
Γράφημα 13: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 13 (Όλυμπος)



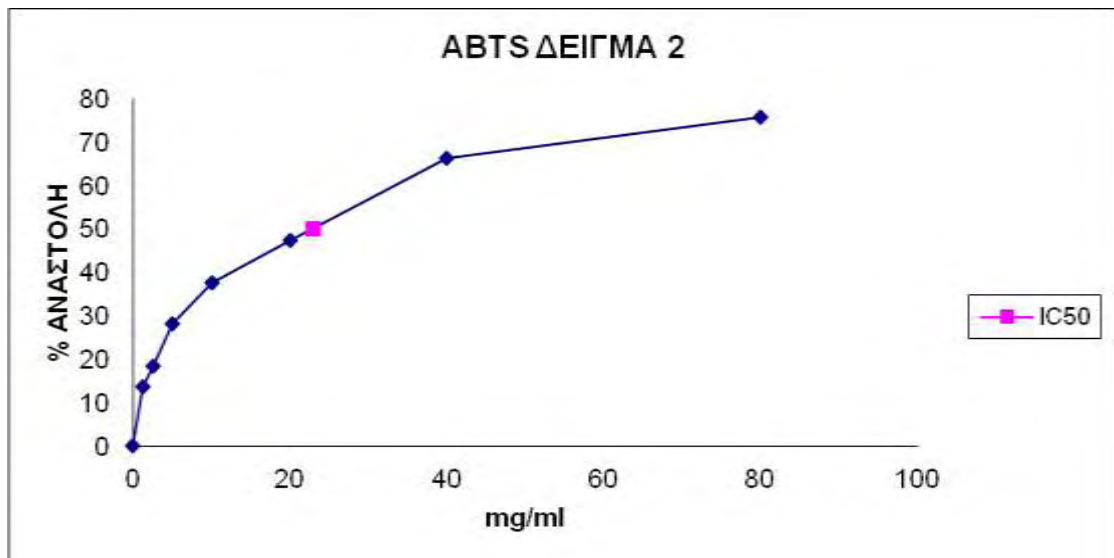
Γράφημα 14: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH* από το μέλι του Δείγματος 14 (Manuka, Νέας Ζηλανδίας)

3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS⁺

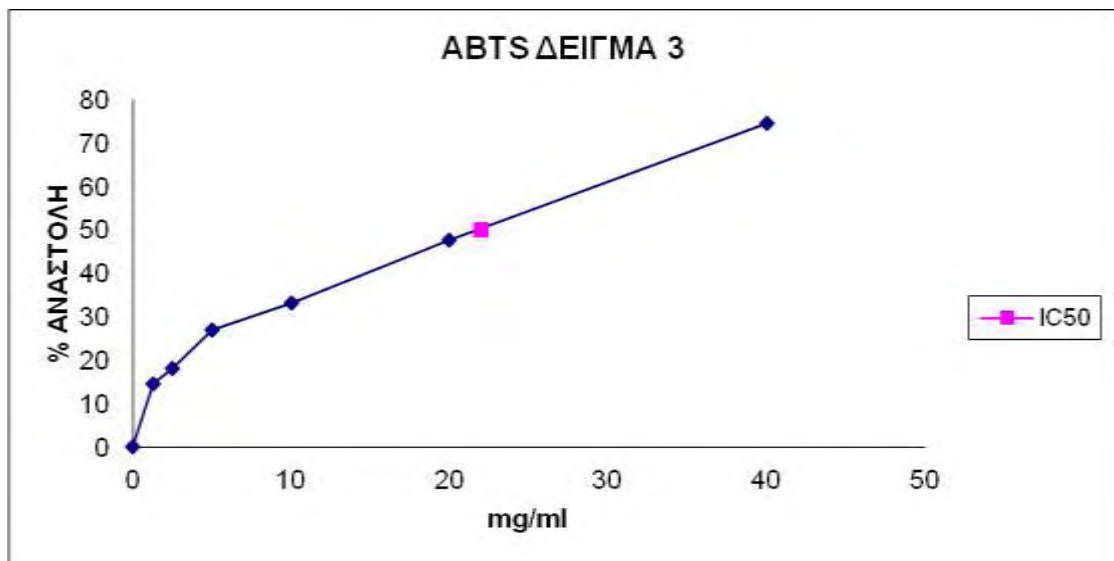
Συνολικά μελετήθηκαν 14 δείγματα μελιού της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου καθώς και το μέλι Manuka από την Νέα Ζηλανδία σαν μέλι αναφοράς. Τα 14 δείγματα εξετάστηκαν σε συγκεντρώσεις από 1,25 έως 160 mg/ml. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS⁺. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 4,5 mg/ml έως 81 mg/ml. Το πιο ισχυρό ήταν το δείγμα μελιού 8 (αγριοτριφύλλο, ακακία, θράμπη, μέντα, βελανιδιά- Κρασιά Ελασσόνας) (Γράφημα 22) με IC₅₀ ίσο με 4,5 mg/ml ενώ το πιο ασθενές ήταν το μέλι του δείγματος 11 (Καλλιθέα Ελασσόνας) (Γράφημα 25) με IC₅₀ ίσο με 81 mg/ml. Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH⁺ από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα.



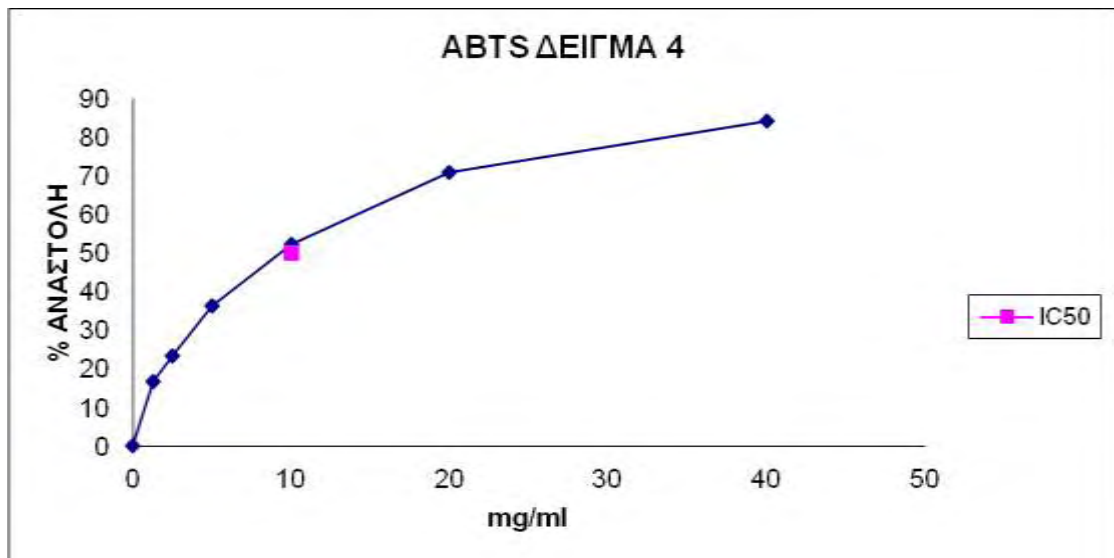
Γράφημα 15 : Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ από το μέλι του Δείγματος 1 (Καρυά Ολύμπου)



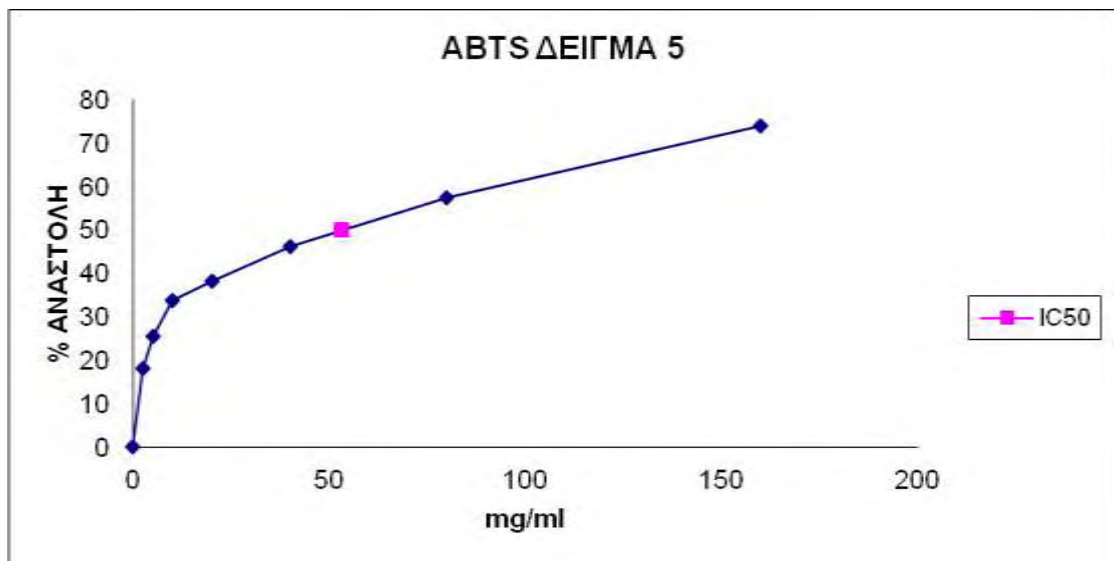
Γράφημα 16: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 2 (Ελασσόνα Ολύμπου)



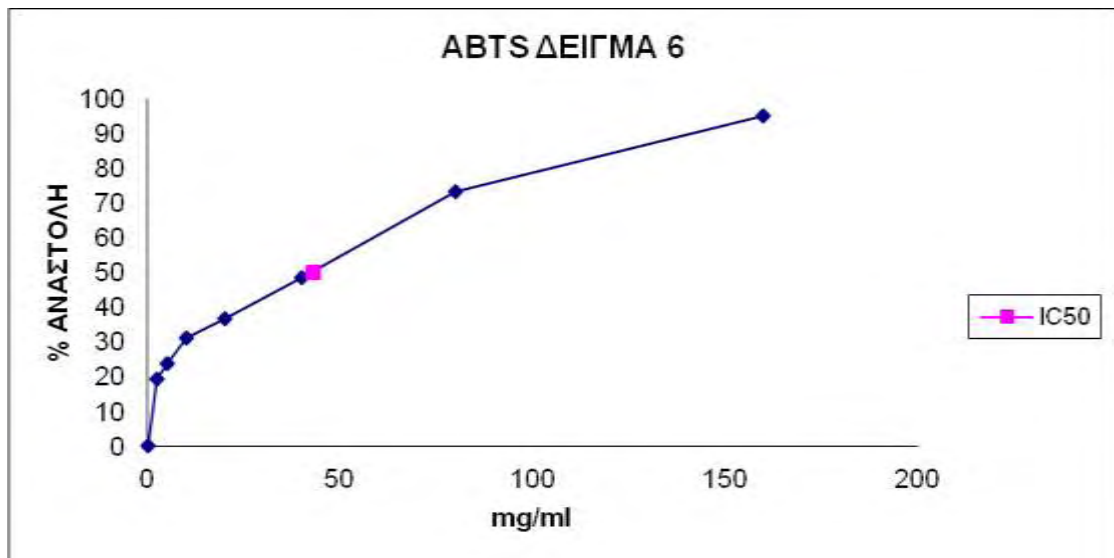
Γράφημα 17: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 3 (Συκέα Ελασσόνας)



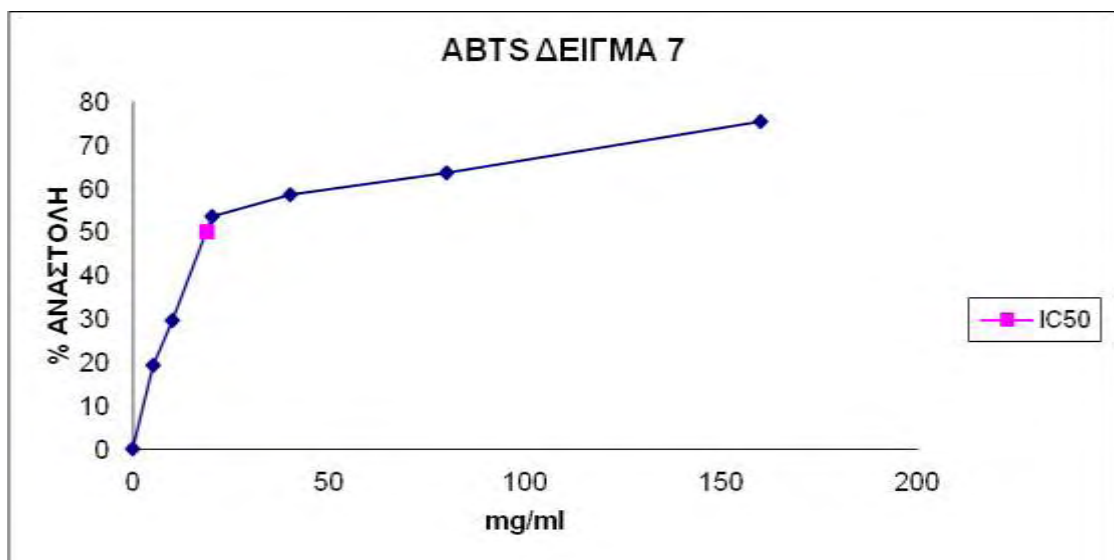
Γράφημα 18: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 4 (Παλιάμπελα Βερδικούσιας)



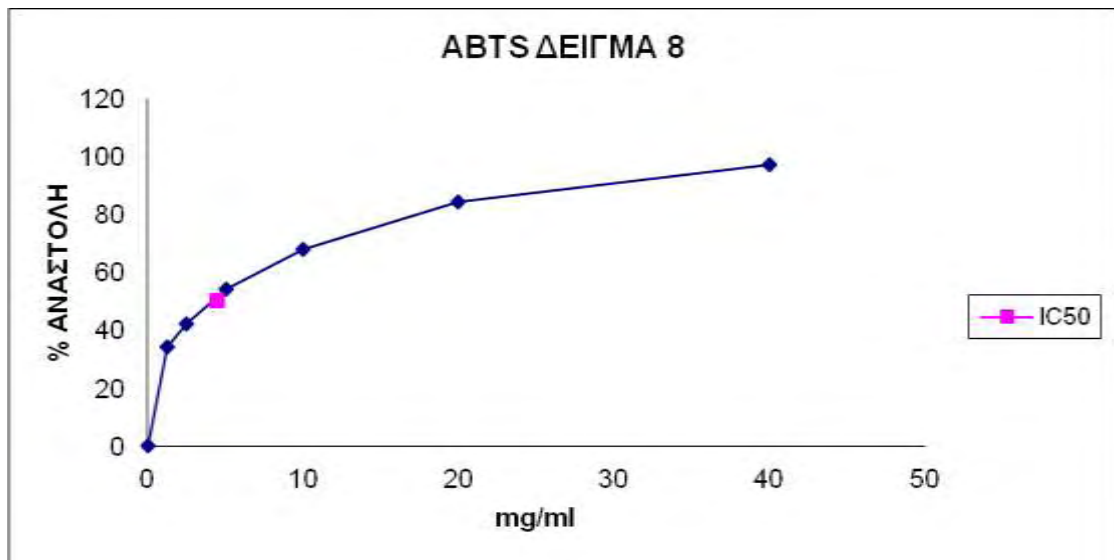
Γράφημα 19: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 5 (Δομένικο)



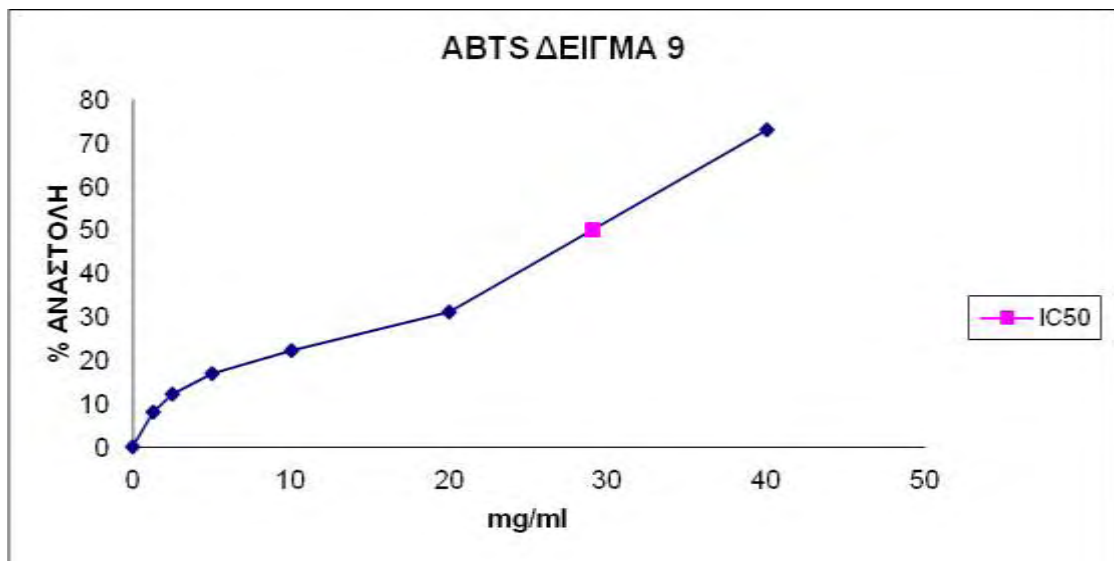
Γράφημα 20: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 6 (Σκαμνιά)



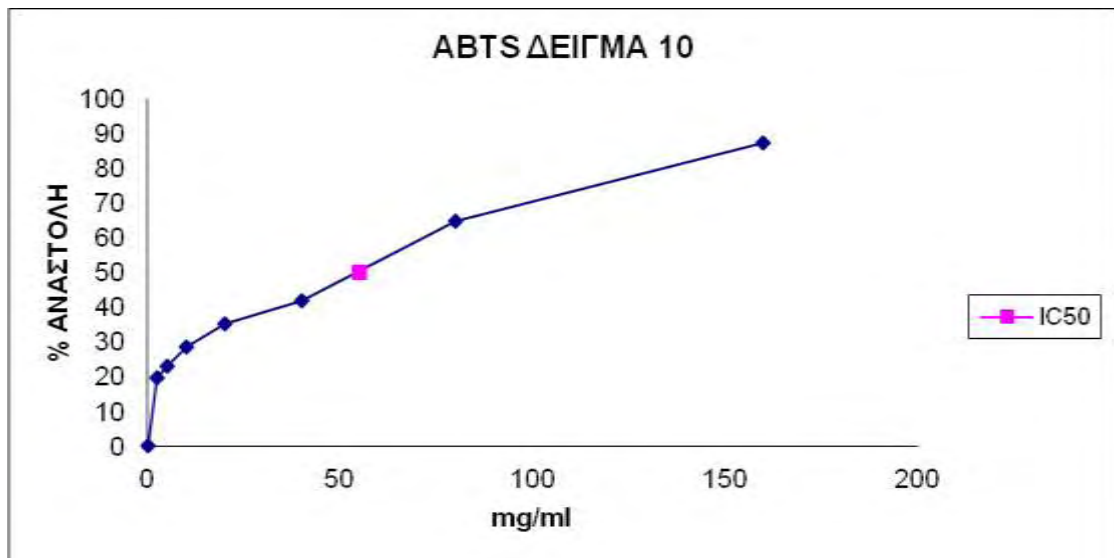
Γράφημα 21: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 7 (Σαραντάπορο)



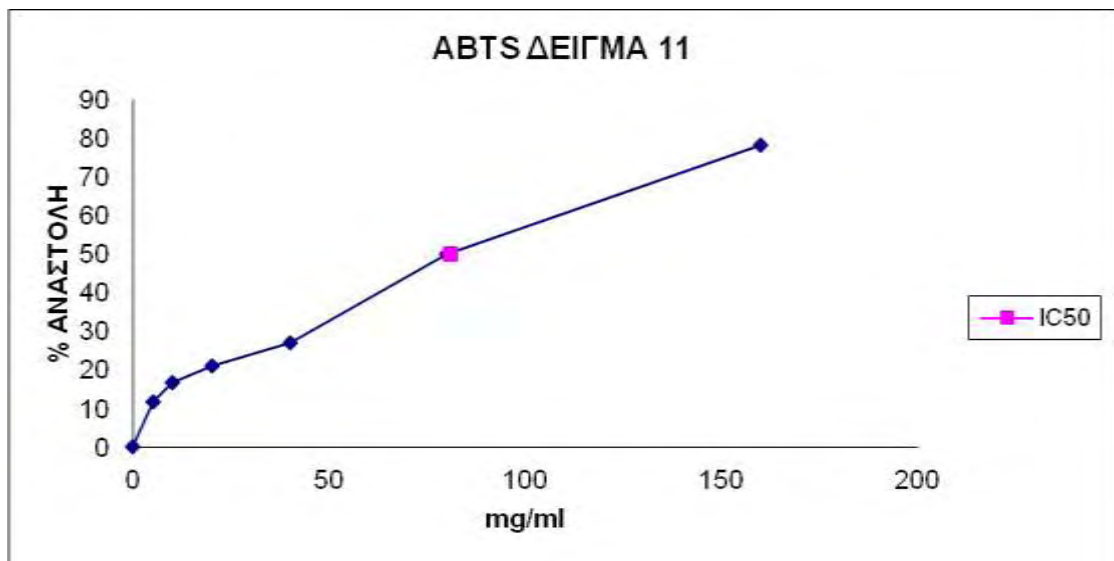
Γράφημα 22: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ από το μέλι του Δείγματος 8 (Κρασιά Ελασσόνας)



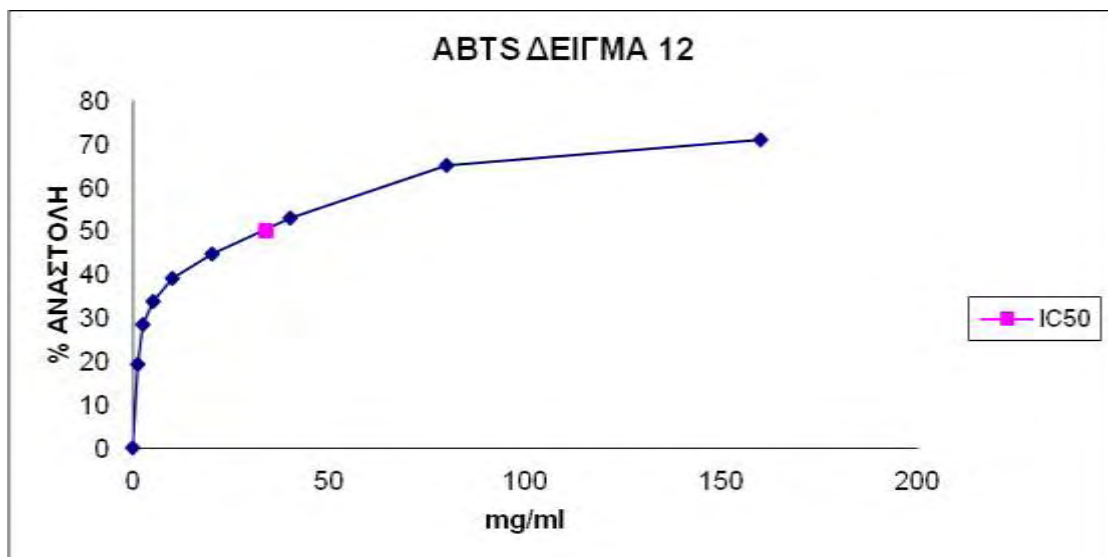
Γράφημα 23: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS⁺ από το μέλι του Δείγματος 9 (Άζωρος Ελασσόνας)



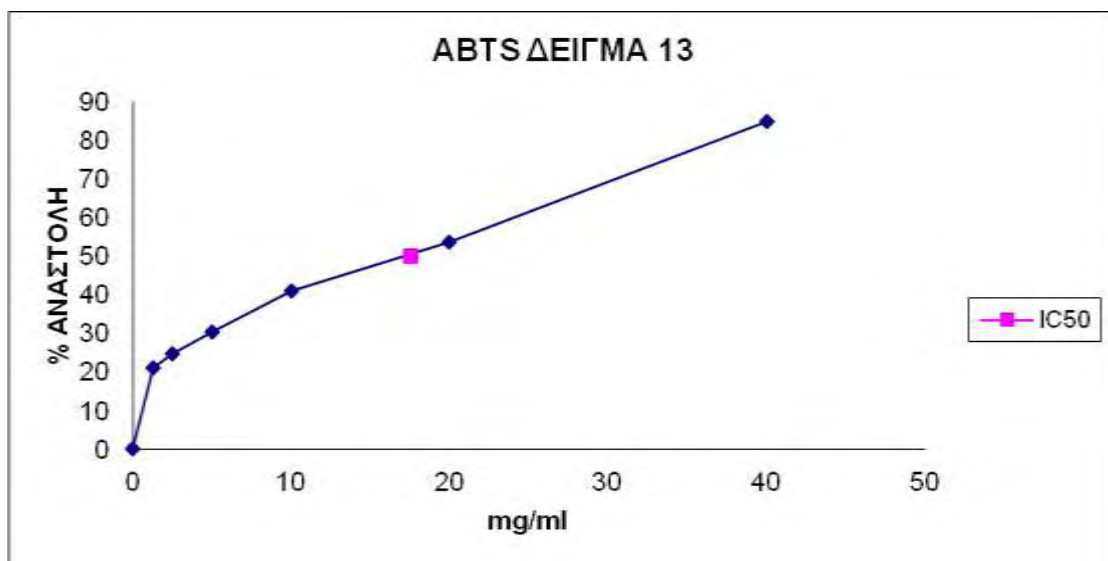
Γράφημα 24: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 10 (Βερδικούσια)



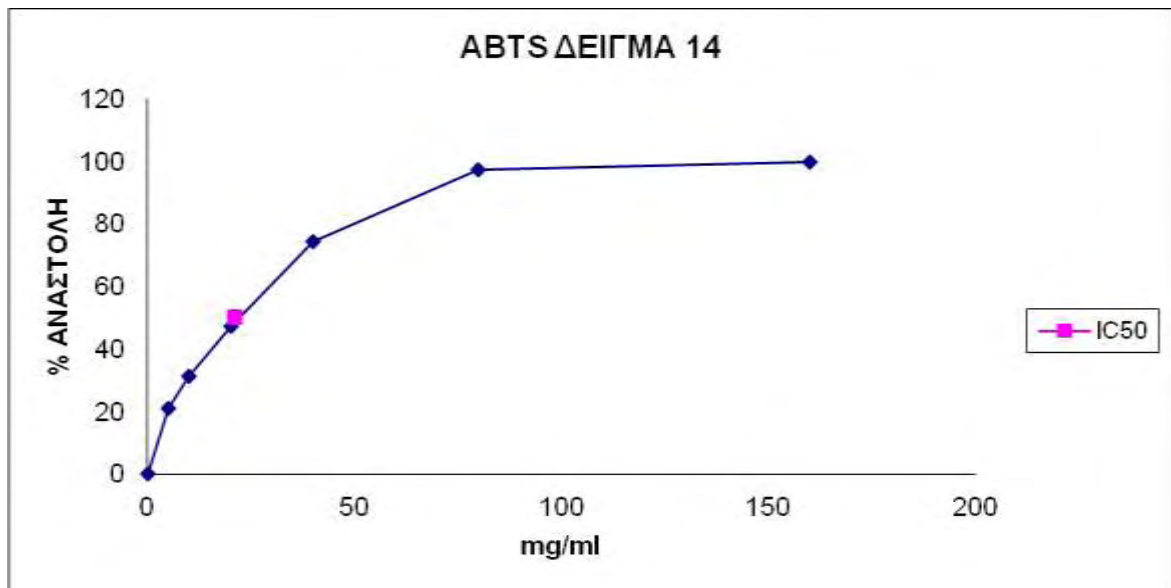
Γράφημα 25: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 11 (Καλλιθέα Ελασσόνας)



Γράφημα 26: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 12 (Καρνά Ολύμπου)

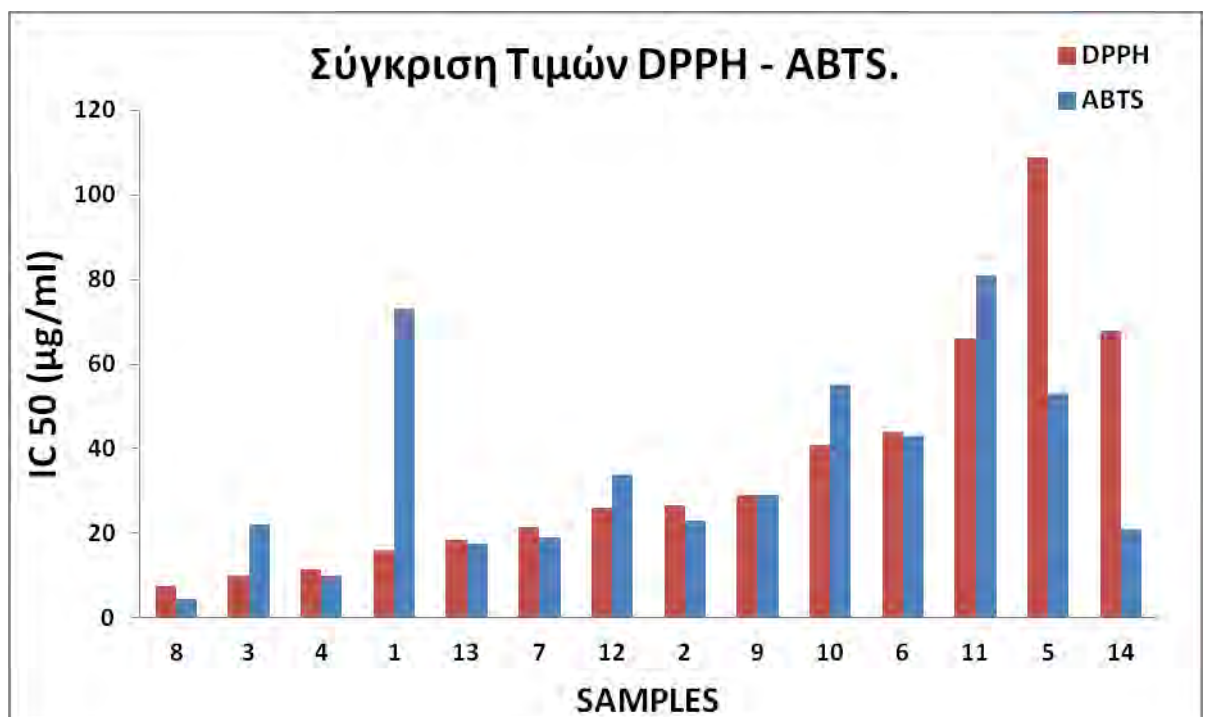


Γράφημα 27: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι του Δείγματος 13 (Ολύμπος)



Γράφημα 28: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS* από το μέλι του Δείγματος 14 (Manuka, Νέας Ζηλανδίας)

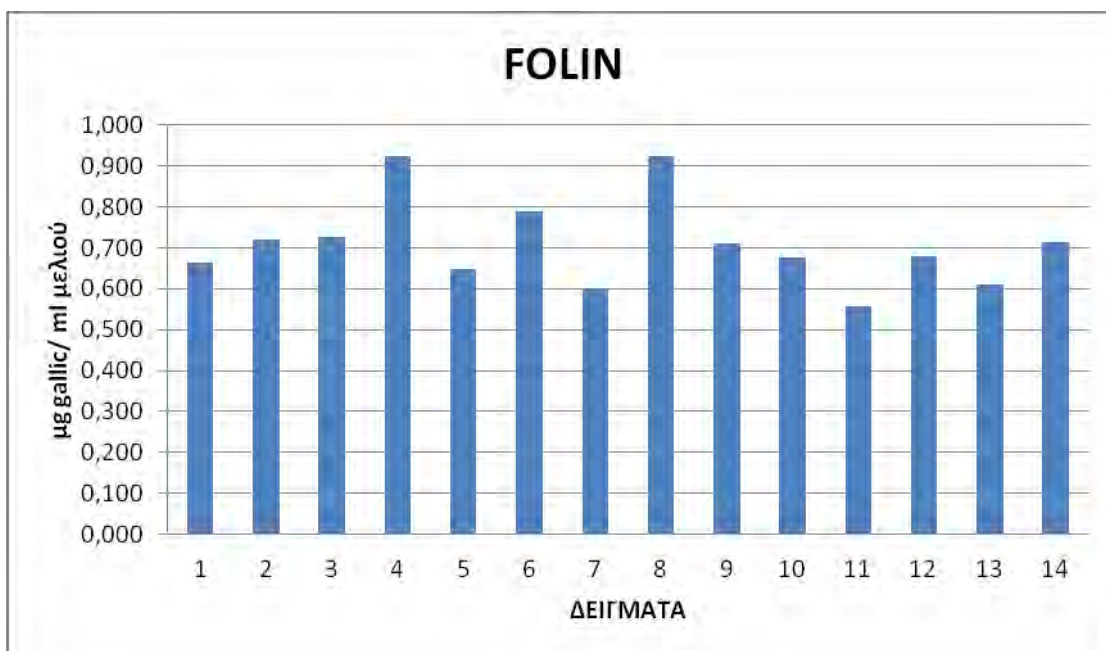
Παρακάτω παρουσιάζονται συγκριτικά όλα τα αποτελέσματα και από τις 2 μεθόδους.



Γράφημα 29: Συγκριτικές τιμές IC50 από όλα τα δείγματα

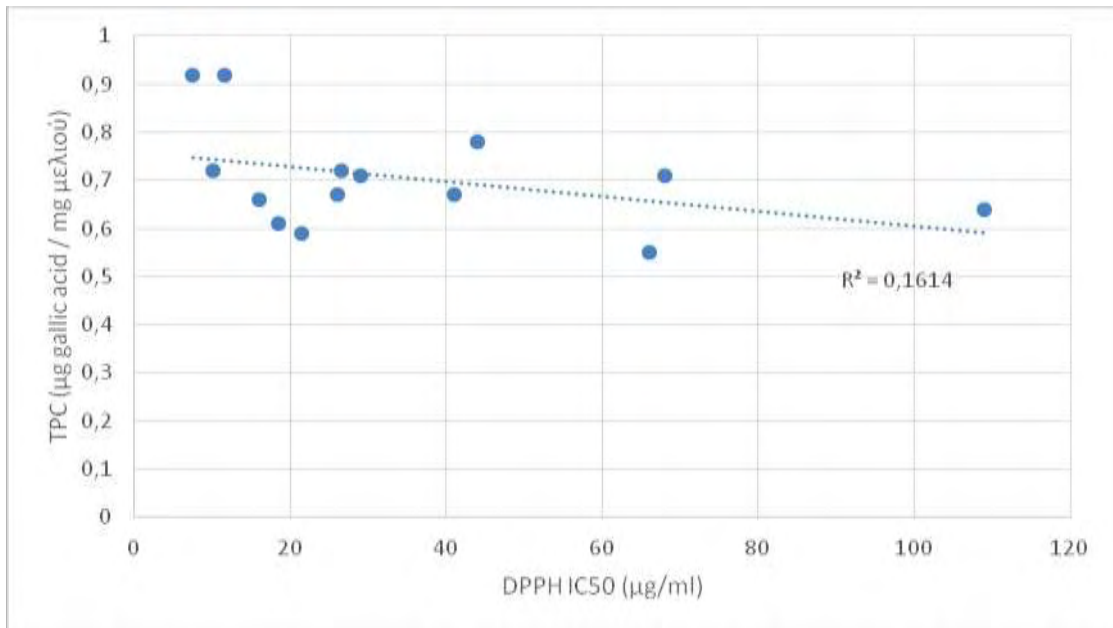
3.3. Εκτίμηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin Ciocalteu

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται συγκριτικά η ισοδυναμία της πολυφαινολικής σύστασης των μελιών που μελετήθηκαν σε μg γαλλικού/ mg μελιού.

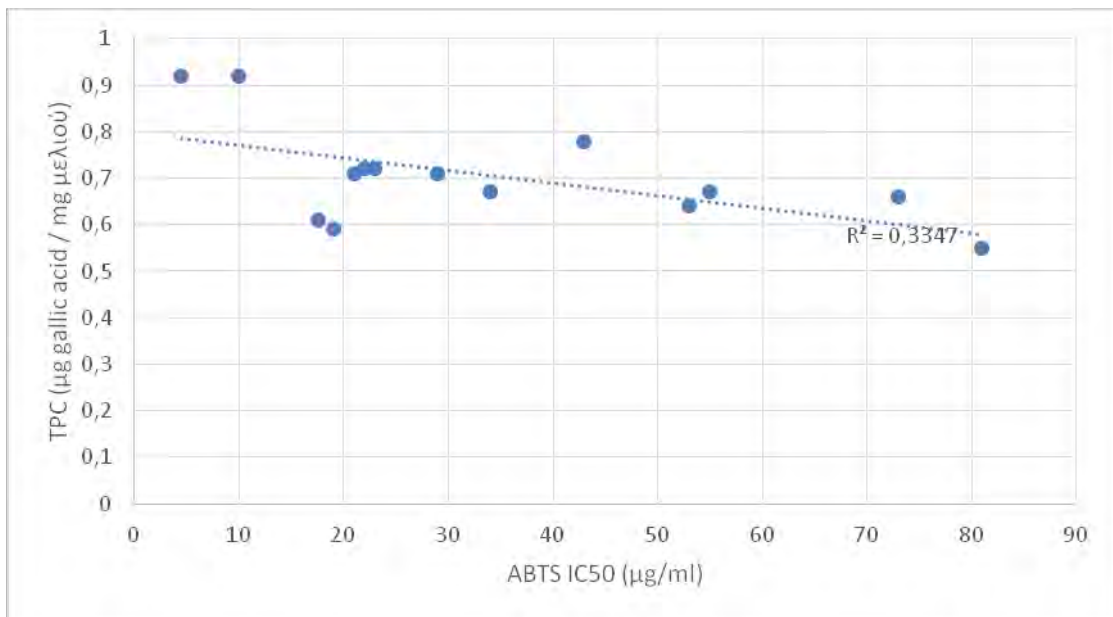


Γράφημα 30: Συγκριτικές τιμές πολυφαινολικής σύστασης από όλα τα δείγματα σε μg gallic/ ml μελιού.

Παρακάτω παρουσιάζονται διαγράμματα συσχέτισης της ποσότητας των πολυφαινολών με την αντιοξειδωτική ικανότητα των μελιών όπως προκύπτει από τις τιμές IC50 των μεθόδων DPPH και ABTS. Παρατηρήθηκε μικρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC50 και του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των μελιών.



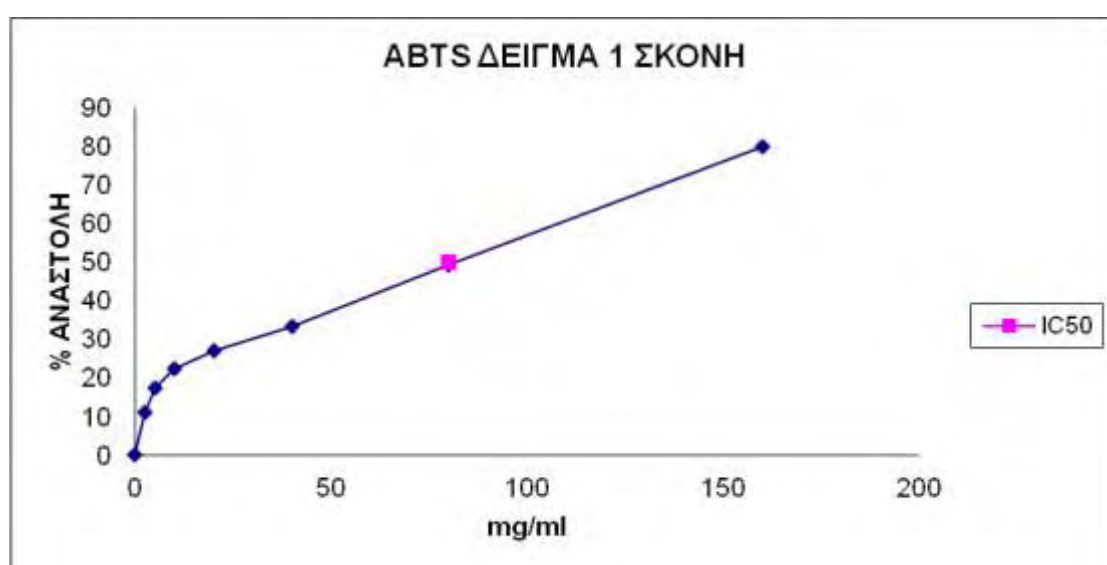
Γράφημα 31: Συσχέτιση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των μελιών σε σχέση με το IC50 της μεθόδου του DPPH.



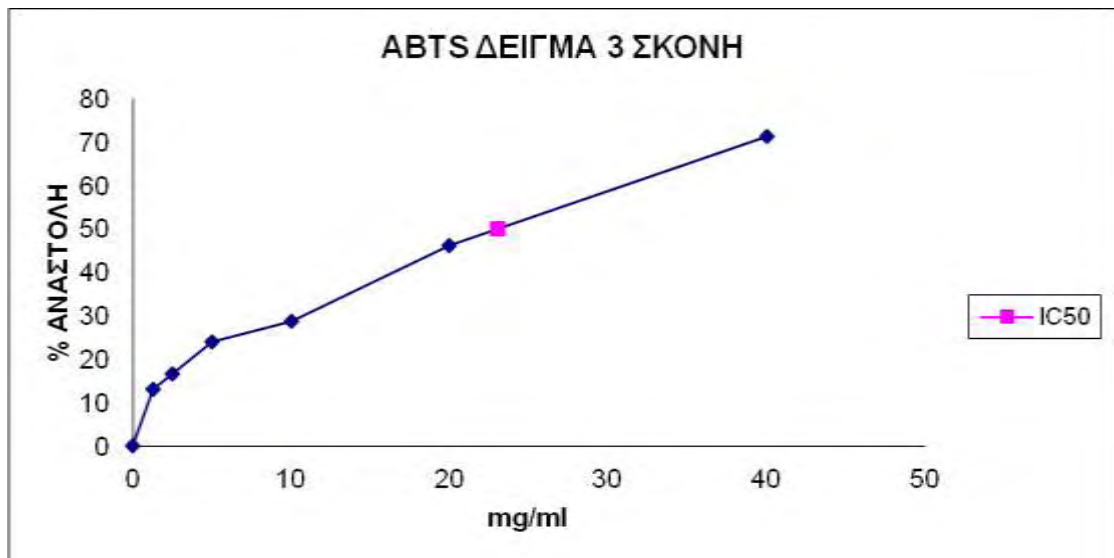
Γράφημα 32: Συσχέτιση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των μελιών σε σχέση με το IC50 της μεθόδου του ABTS.

3.4. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των σκονών των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS^{•+}

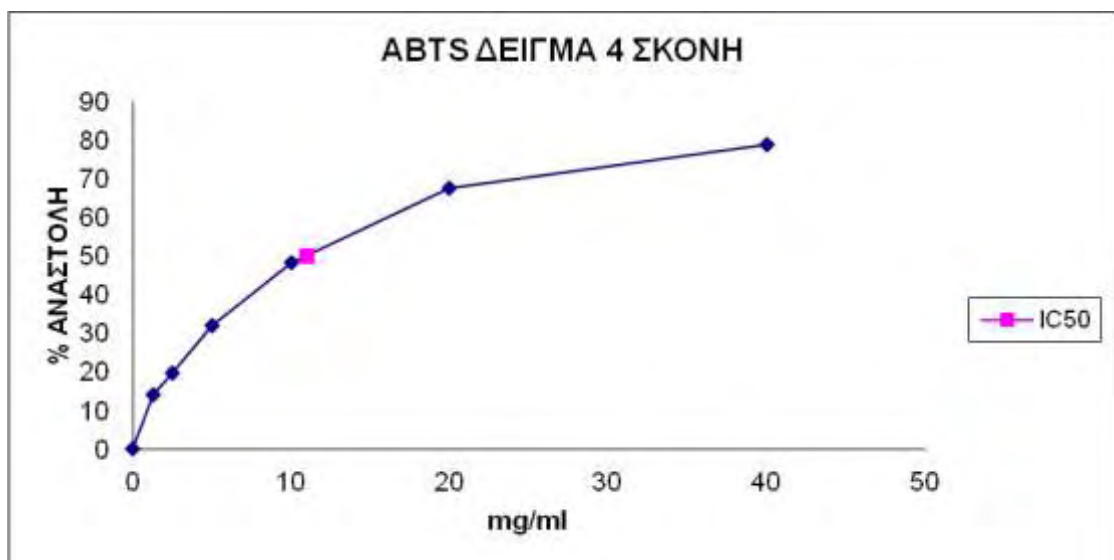
Τα δείγματα με την μεγαλύτερη δράση έναντι των ριζών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή σκόνης. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή σκόνης ήταν τα 1,3,4,7,8 και 14. Στη συνέχεια οι σκόνες μελετήθηκαν με την μέθοδο του ABTS. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.



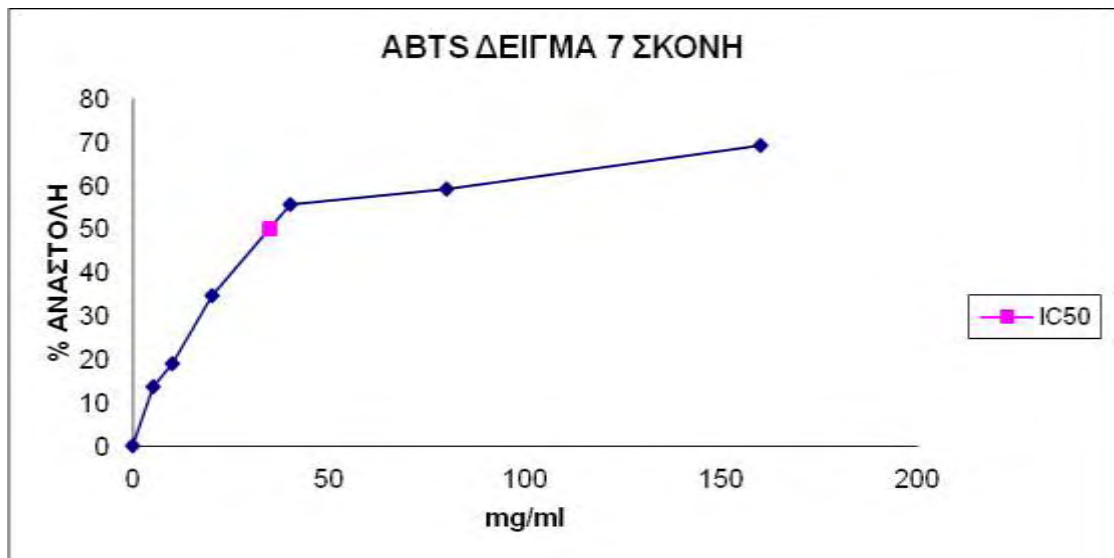
Γράφημα 33: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} από τη σκόνη του μελιού του Δείγματος 1



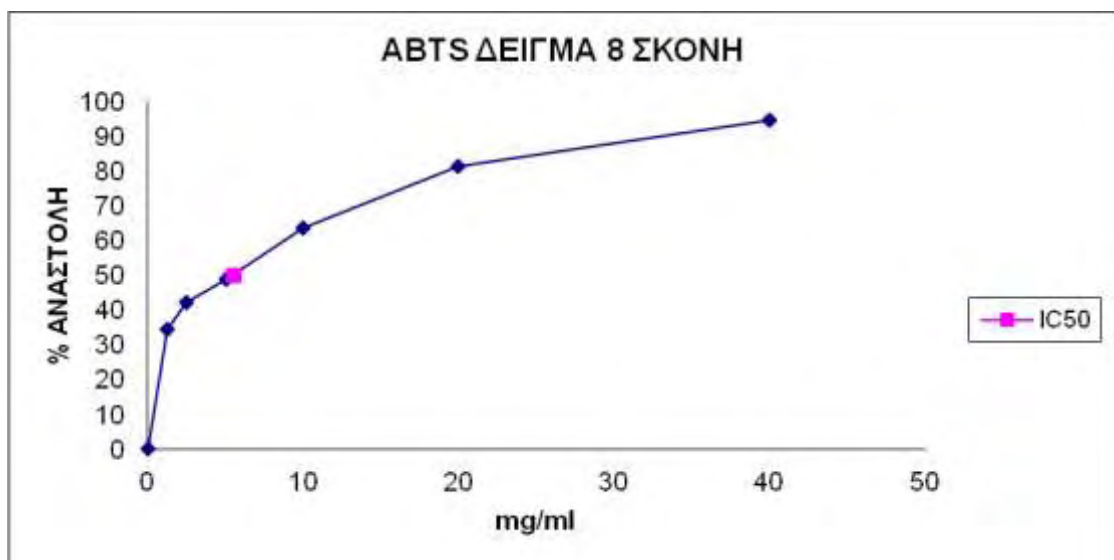
Γράφημα 34: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS[•] από τη σκόνη του μελιού του Δείγματος 3



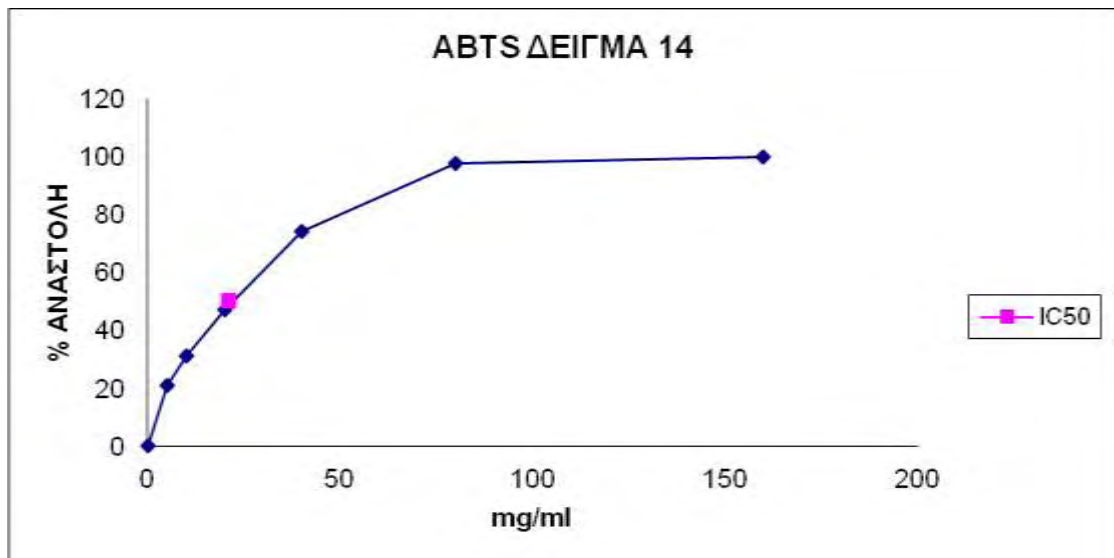
Γράφημα 35: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS[•] από τη σκόνη του μελιού του Δείγματος 4



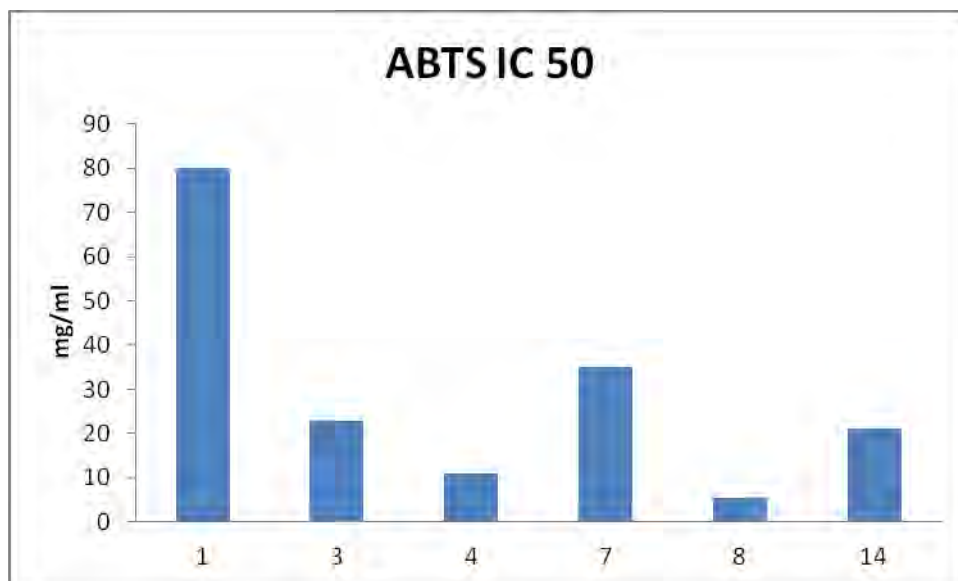
Γράφημα 36: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS[•] από τη σκόνη του μελιού του Δείγματος 7



Γράφημα 37: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS[•] από τη σκόνη του μελιού του Δείγματος 8



Γράφημα 38: Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS[•] από το μέλι του Δείγματος 14 (Manuka)



Γράφημα 39: Συγκριτικές τιμές IC50 από τις σκόνες των δειγμάτων.

3.5. Εκτίμηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των σκονών των δειγμάτων με την μέθοδο Folin Ciocalteu

Οι σκόνες μελετήθηκαν και με την μέθοδο Folin Ciocalteu με σκοπό τον προσδιορισμό του ολικού πολυφαινολικού δυναμικού. Στις σκόνες παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές IC50 σε σχέση με το αντίστοιχο μέλι. Επίσης παρατηρήθηκαν και μικρότερες τιμές πολυφαινολών.



Γράφημα 40: Συγκριτικές τιμές των επιπέδων των πολυφαινολών από τις σκόνες των δειγμάτων.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξειδωτικό στρες που εμφανίζεται στα κύτταρα λόγω της παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελεί ένα δυσμενή παράγοντα για τα κύτταρα. Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται στο DNA από τις ελεύθερες ρίζες, θεωρούνται ένα σημαντικό στάδιο κατά την καρκινογένεση, καθώς και σε άλλες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως είναι οι καρδιοπάθειες, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) και η πρόωγη γήρανση (Wiseman, 1995). Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν (Torres et al, 2002).

Το μέλι είναι γνωστό ως ένα φυσικό τρόφιμο που εκτός από τις υπόλοιπες θρεπτικές του ιδιότητες έχει και αντιοξειδωτική δράση. Τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού είναι κυρίως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, βιταμίνες και ένζυμα, καθώς και μια μικρή ποσότητα μακροστοιχείων, κυρίως του χαλκού και του σιδήρου (Erlund, 2004; Meda, 2005). Ωστόσο, πιστεύεται ότι υπάρχουν και άλλοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες στο μέλι οι οποίοι δεν είναι γνωστοί. Επίσης, πιστεύεται ότι η αντιοξειδωτική δράση του μελιού δεν οφείλεται σε μεμονωμένα συστατικά του, αλλά στη συνεργιστική δράση πολλών διαφόρων συστατικών του (Gheldof, 2002; Erejuwa, 2012). Επίσης, πολλές από τις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού οφείλονται σε μεγάλο βαθμό συνδέεται στην αντιοξειδωτική ικανότητα του (Ferreira, 2005). Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αντιοξειδωτική δράση του μελιού (Al-Mamary, 2002).

Στην παρούσα μελέτη για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού έχουν χρησιμοποιηθεί μια σειρά από δείγματα μελιού, προερχόμενα από την ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου, από μέλισσες που τρέφονταν από άνθη διαφόρων φυτών. Επίσης μελετήθηκαν σκόνες που προέκυψαν από την επεξεργασία των μελιών με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, τα διάφορα δείγματα μελιών συγκρίθηκαν με το μέλι Manuka που προέρχεται από τη Νέα Ζηλανδία. Πρόκειται για ένα μέλι με γνωστές με μεγάλη εμπορική αξία λόγω της ευρείας χρήσης του ως φαρμακευτικό σκέυασμα. Η μελέτη μελιών από συγκεκριμένες περιοχές παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς το μέλι κάθε περιοχής έχει ιδιαίτερα και μοναδικά

χαρακτηριστικά όσον αφορά την σύστασή του καθώς αυτή εξαρτάται από το σύνολο των φυτών από τα οποία οι μέλισσες βόσκουν. Η ευρύτερη περιοχή του Ολύμπου αποτελεί ένα σημαντικό οικοσύστημα που περιέχει μια πληθώρα ενδημικών φυτών με αποτέλεσμα τα μέλια που προέρχονται από αυτή την περιοχή να περιέχουν σύσταση μοναδική και πιθανόν αντιοξειδωτική δράση συσχετιζόμενη με την επιλογή των φυτών από τα οποία προέρχονται.

Έτσι, στην παρούσα εργασία, προσδιορίστηκε αρχικά το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων δειγμάτων μελιού λόγω του ότι όπως αναφέρθηκε στις φυτικές πολυφαινόλες αποδίδεται κυρίως η αντιοξειδωτική του δράση. Όσον αφορά την ποσότητα πολυφαινολών που εμπεριέχονται στα διάφορα δείγματα μελιού περιείχαν ποσότητες πολυφαινολών (0,558 έως 0,923 $\mu\text{g/ml}$). Τα δείγματα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ήταν τα 4 και 8 με 0,923 $\mu\text{g/ml}$ και ακολουθεί το δείγμα 6 με 0,788 $\mu\text{g/ml}$. Την μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είχαν τα δείγματα 11, 7 και 13 με περιεκτικότητα 0,558, 0,598 και 0,610 $\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Το μέλι αναφοράς Manuka παρουσίασε μια ενδιάμεση περιεκτικότητα 0,710 $\mu\text{g/ml}$.

Στη συνέχεια, η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων μελιού εξετάστηκε με την αλληλεπίδρασή τους με δύο ελεύθερες ρίζες, την DPPH[•] και ABTS^{•+}. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας την ρίζα DPPH. Μεγαλύτερη δράση παρουσίασαν τα δείγματα 8, 3 και 4 με τιμές IC₅₀ 7,5, 10, και 11,5 mg/ml αντίστοιχα. Τη χαμηλότερη δράση παρουσίασαν τα δείγματα 5, 14 και 11 με τιμές IC₅₀ 109, 68 και 66 mg/ml αντίστοιχα. Το μέλι αναφοράς Manuka που αποτελεί το δείγμα 14 παρουσίασε τη δεύτερη ισχυρότερη δράση έναντι της ρίζας DPPH.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των μελιών έναντι της ρίζας ABTS. Εδώ τη μεγαλύτερη δράση παρουσίασαν τα δείγματα 8, 4 και 13 με τιμές IC₅₀ 4,5, 10 και 17,5 mg/ml και την μικρότερη τα δείγματα 10, 11 και 1 με τιμές IC₅₀ 55, 73 και 81 mg/ml. Το μέλι αναφοράς Manuka παρουσίασε σχετικά ισχυρή δραστηριότητα έναντι της ρίζας ABTS με τιμή IC₅₀ 17,5mg/ml.

Γενικά, υπήρξε μια πολύ καλή συσχέτιση των τιμών του DPPH με αυτές του ABTS, γεγονός που δείχνει ότι οι ίδιες ουσίες των δειγμάτων ευθύνονται για την εξουδετέρωση των δύο ριζών.

Με βάση τα συνολικά αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι το πιο ισχυρό μέλι όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση είναι το μέλι του δείγματος 8. Πρόκειται για

ένα μέλι του οποίου ο τρύγος έγινε τον Ιούνιο – Ιούλιο του 2013. Προέρχεται από αγριοτρίφυλλο, ακακία, θρούμπη, μέντα, βελανιδιά, μελούρας, από την περιοχή της Κρανιάς Ελασσόνας. Ήταν το μέλι με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινολικό δυναμικό 0,923 μg gallic acid /ml μελιού. Επίσης είχε την μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι της ρίζας DPPH ($\text{IC}_{50}=7,5\text{mg/ml}$) και της ρίζας ABTS ($\text{IC}_{50}=4,5\text{mg/ml}$). Η σκόνη που προέκυψε από την επεξεργασία του συγκεκριμένου μελιού είχε επίσης τη μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι της ρίζας ABTS ($\text{IC}_{50}=4,5\text{mg/ml}$). Την αμέσως καλύτερη δραστηριότητα είχε το μέλι του δείγματος 4. Το συγκεκριμένο μέλι προέρχεται από μελισσοκομικά φυτά, τριφύλλια, γκορτσιά, κοντορίγανη – λαδανιά, μελιτώματα της περιοχής Παλιάμπελα Βερδικούσιας. Το πολυφαινολικό περιεχόμενό του είναι ανάλογο με το δείγμα 8 με 0,923 μg gallic acid /ml μελιού. Παρουσίασε σχετικά χαμηλό $\text{IC}_{50} = 11,5 \text{ mg/ml}$ στην ρίζα DPPH και $\text{IC}_{50}= 10 \text{ mg/ml}$ στην ρίζα ABTS. Το αμέσως επόμενο ισχυρότερο μέλι ήταν αυτό του δείγματος 3. Πρόκειται για μέλι ανθέων από την Συκέα Ελασσόνας. Το πολυφαινολικό του ισοδύναμο ήταν 0,728 μg gallic acid /ml μελιού. Το IC_{50} για την μέθοδο DPPH ήταν 10mg/ml και για την μέθοδο ABTS ήταν 22 mg/ml.

Τα παραπάνω μέλια παρουσίασαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το μέλι αναφοράς Manuka. Το συγκεκριμένο μέλι παρουσίασε πολυφαινολικό περιεχόμενο 0,715 μg gallic acid /ml μελιού και $\text{IC}_{50} = 68\text{mg/ml}$ για το DPPH και $\text{IC}_{50} = 21\text{mg/ml}$ για το ABTS. Το μέλι Manuka προέρχεται από τη Νέα Ζηλανδία και είναι ένα πιστοποιημένο μέλι με σημαντική εμπορική αξία.

Παρατηρήθηκε επίσης μικρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών IC_{50} και του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των μελιών. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ποιοτική πολυφαινολική σύσταση των μελιών και όχι τόσο στην ποσοτική. Επομένως, θα πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να εξακριβωθεί η πολυφαινολική σύσταση των συγκεκριμένων δειγμάτων μελιού.

Τα 5 δείγματα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση επεξεργάστηκαν με σκοπό την παραγωγή σκόνης. Τα δείγματα αυτά ήταν τα 1,3,4,7 και 8. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με την μέθοδο ABTS. Οι τιμές IC_{50} των δειγμάτων κυμαινόταν από 5,5 έως 80 mg/ml. Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές IC_{50} των σκονών των δειγμάτων ήταν αυξημένες σε σχέση με το αρχικό δείγμα του ίδιου μελιού. Αυτό υποδηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής σκόνης χάθηκε ένα μέρος της αντιοξειδωτικής δράσης των μελιών όπως ήταν αναμενόμενο. Συγκεκριμένα, οι τιμές του IC_{50} στις σκόνες ήταν μειωμένες κατά 4,5

έως 22% στα 4 δείγματα, και σε ένα μόνο δείγμα παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση κατά 84% σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα μελιών.

Επίσης παρατηρήθηκαν και μικρότερες τιμές πολυφαινολών. Οι τιμές του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου ήταν από 0,16 έως 0,29 μg gallic acid /ml μελιού. Δηλαδή, οι τιμές στις σκόνες ήταν μειωμένες κατά 21 έως 33% σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των μελιών. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά την επεξεργασία των μελιών για την παραγωγή σκόνης έγινε ανάμιξη με άλλες ουσίες. Παρατηρούμε ότι η μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης ήταν μικρότερη από τη μείωση στη συγκέντρωση των πολυφαινολών, γεγονός που δείχνει ότι η αντιοξειδωτική δράση των μελιών οφείλεται και σε άλλες ουσίες εκτός από τις πολυφαινόλες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας δείχνουν ότι μέλια της ευρύτερης περιοχής του Ολύμπου έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση και θα μπορούσαν να πιστοποιηθούν και να αποκτήσουν σημαντική προστιθέμενη αξία. Θα είναι σημαντικό να γίνουν και άλλες μελέτες για να προσδιοριστεί η ακριβής τους σύσταση σε πολυφαινόλες και σε άλλα βιοδραστικά μόρια καθώς και να μελετηθεί η αντιοξειδωτική τους δράση και οι μοριακοί μηχανισμοί αυτής της δράσης σε κυτταροκαλλιέργειες καθώς και σε *in vivo* πειράματα. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η μεθοδολογία του freeze-drying που χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή των μελιών σε σκόνη ήταν επιτυχής λόγω του ότι δεν ελαττώθηκε σημαντικά η αντιοξειδωτική τους δράση ή το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Άρα, θα μπορούσε να εφαρμοστεί αυτή η μεθοδολογία για τη μετατροπή των μελιών σε σκόνες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων, καλλυντικών ή φαρμακευτικών σκευασμάτων που θα διαθέτουν τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες του μελιού μεταξύ των οποίων και η αντιοξειδωτική του δράση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Antunes F, Han D, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H(2)O(2) detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med. 2002 Nov 1;33(9):1260-7.

Al-Mamary M., A. Al-Meeri, and M. Al-Habori, "Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey," Nutrition Research, vol. 22, no. 9, pp. 1041–1047, 2002.

Baruchel S, Wainberg MA, "The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus": Journal of Leukocyte Biology, 52, 111–114: 1992

Bogdanov VY, Cimmino G, Tardos JG, Tunstead JR, Badimon JJ. Assessment of plasma tissue factor activity in patients presenting with coronary artery disease: limitations of a commercial assay. J Thromb Haemost. 2009 May;7(5):894-7. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03315.x. Epub 2009 Feb 12. No abstract available.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", Food Science and Technology, 28, 25–30, 1995

Brudzynski K. and L. Kim, "Storage-induced chemical changes in active components of honey de-regulate its antibacterial activity," Food Chemistry, vol. 126, no. 3, pp. 1155–1163, 2011.

Cammack PL, Edie RN, Edmunds LH Jr. J Thorac Cardiovasc. Bar calcification of the mitral anulus. A risk factor in mitral valve operations. Surg. 1987 Sep;94(3):399-404.

Cheeseman KH, Slater TF, "An introduction to free radical biochemistry" : Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin, vol 49, 481-93, 1993.

Colic MI, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. J Mol Med (Berl). 2000;78(6):333-6.

Cooper RA, Halas E, Molan PC. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil.* 2002 Nov-Dec;23(6):366-70.

Cooper, R.A., Molan, P.C., Harding, K.G., 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of Royal Society of Medicine* 92, 283–285

Cooper RA and Molan PC , 1999 The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. *J. Wound Care* 8 (4) 161-164

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004 May;43(3):200-27. Review.

Dustman RE, Snyder EW, Creel D, Beck EC. Ontogeny of the visual evoked response in the stump-tailed macaque. *Dev Psychobiol.* 1979 Mar;12(2):161-7.

Efem SE. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *Br J Surg.* 1988 Jul;75(7):679-81.

Elliot RH, Strunin L, "Hepatotoxicity of volatile anaesthetics", *British Journal of Anaesthesia*, 70: 339–349, 1993.

Erejuwa O.O., S.A. Sulaiman, and M. S.Wahab, "Honey: a novel antioxidant," *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4400–4423, 2012.

Erlund I, "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology," *Nutrition Research*, vol. 24, no. 10, pp. 851–874, 2004.

Evans PH, "Free radicals in brain metabolism and pathology", *British Medical Bulletin*, 49: 577–587, 1993.

Ferreira, E. Aires, J. C. M. Barreira, and L. M. Estevinho, "Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract," *Food Chemistry*, vol. 114, no. 4, pp. 1438–1443, 2009.

Gheldof N., X. Wang, and N. J. Engeseth, "Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 21, pp. 5870–5877, 2002. Gilbert D.L, "Fifty years of radical ideas", *Ann NY Acad Sci*, 899:1, 2000

Gilliam, M., Moffett, J.O. and Kauffeld, N.M. 1983 Examination of floral nectar of citrus, cotton and Arizona desert plants for microbes. *Apidologie* 14, 299-302.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995 Dec;41(12 Pt 2):1819-28. Review.

Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc*. 1988 Feb;20(1):55-9.

Khah EM, Kouretas D Influence of storage conditions on protein profile of pepper seeds, analyzed by SDS-PAGE. *In Vivo*. 2003 May-Jun;17(3):259-60.

Kerbel RS, Man MS, Dexter D. A model of human cancer metastasis: extensive spontaneous and artificial metastasis of a human pigmented melanoma and derived variant sublines in nude mice. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Jan;72(1):93-108.

Kwakman PH1, Van den Akker JP, Güçlü A, Aslami H, Binnekade JM, de Boer L, Boszhard L, Paulus F, Middelhoek P, te Velde AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Schultz MJ, Zaat SA. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 1;46(11):1677-82. doi: 10.1086/587892.

Ladas S. D., D. N. Haritos, and S. A. Raptis, "Honey may have a laxative effect on normal subjects because of incomplete fructose absorption," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 62, no. 6, pp. 1212–1215, 1995.

Meda A., C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, and O. G. Nacoulma, "Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity," *Food Chemistry*, vol. 91, no. 3, pp. 571–577, 2005.

N. M. Nasir, A. S. Halim, K. B. Singh, A. A. Dorai, and M. M. Haneef, "Antibacterial properties of tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 10, article 31, 2010.

Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, *Methods in Enzyme* 186, 1990.

Halliwell B, "Free Radicals and other reactive species in Disease", National University of Singapore, 2001.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 102:5-12.

Wilson RL, "Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In biochemical mechanism of liver injuries", New York Academic Press: 123-224, 1978.

Winston L Mark, 1987 *The Biology of the honey bee*, Harvard University Press Cambridge Massachusetts London England p.p.281

Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120

Willet KE, Kramer BW, Kallapur SG, Ikegami M, Newnham JP, Moss TJ, Sly PD, Jobe AH. Intra-amniotic injection of IL-1 induces inflammation and

maturation in fetal sheep lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Mar;282(3):L411-20.

Whitmire JK, Eam B, Benning N, Whitton JL. Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory. *J Immunol.* 2007 Jul 15;179(2):1190-7.

White JW Jr, Subers MH, Schepartz AI, 1963 The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochim Biophys Acta*, 73:57-70

White J.W. Jr, 1993 *Honey, in the hive and the honey bee*, Dadant and Sons Publication Hamilton- Illinois p.p. 869-895

Willix DJI, Molan PC, Harfoot CG. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *J Appl Bacteriol.* 1992 Nov;73(5):388-94.

Weston CE, Feibelman MB, Wu K, Simon EE. Effect of oxidant stress on growth factor stimulation of proliferation in cultured human proximal tubule cells. *Kidney Int.* 1999 Oct;56(4):1274-6. Review.

Subrahmanyam M., "Topical application of honey in treatment of burns," *British Journal of Surgery*, vol. 78, no. 4, pp. 497–498, 1991.

Tonks A. J., R. A. Cooper, K. P. Jones, S. Blair, J. Parton, and A. Tonks, "Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes," *Cytokine*, vol. 21, no. 5, pp. 242–247, 2003.

Zumla A, Lulat A. Honey--a remedy rediscovered. *J R Soc Med.* 1989 Jul;82(7):384-5. Review.

