

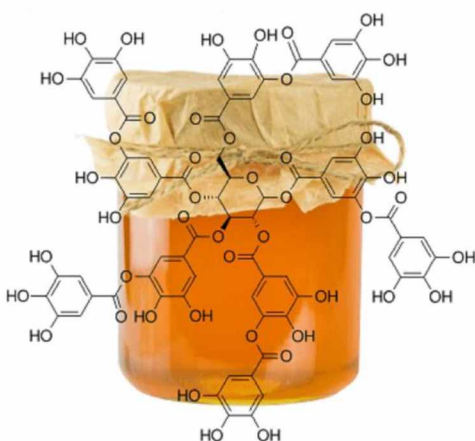


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας:

“ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ”

***“Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων μελιού της
ευρύτερης περιοχής της Πίνδου, με *in vitro* τεχνικές”***



Πλίτσης Γρηγόριος, Φαρμακοποιός

Λάρισα, 2021

"Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας δειγμάτων μελιού της ευρύτερης περιοχής της Πίνδου, με in vitro τεχνικές"

"Study of the antioxidant capacity of honey samples of the Pindos area, with in vitro techniques"

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων), Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας
- Στάγκος Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών
- Βεσκούκης Αριστείδης, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε για να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, όπως επίσης για τη πολύτιμη βοήθεια και το ενδιαφέρον που έδειξε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο και το κ. Βεσκούκη που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου Αναστασία, Μαρία, Ζωή, Ελένη, Σωτηρίνα, Περικλή και Φώτη για τη πολύτιμη βοήθειά τους καθώς ήταν εκεί να απαντήσουν σε οποιαδήποτε απορία μου πάντα με φιλική διάθεση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου να με συμβουλεύουν και να με στηρίζουν σε ότι κάνω.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	11
1.1. Το μέλι.....	11
1.1.1. Τύποι μελιού.....	12
1.1.2. Κυψέλη και Προϊόντα.....	12
1.1.3. Συστατικά του μελιού.....	15
1.1.4. Οφέλη για την υγεία.....	16
1.1.5. Η Πίνδος.....	18
1.2. Ελεύθερες ρίζες.....	20
1.2.1. Παραγωγή Ελευθέρων ριζών.....	21
1.2.2. Βιολογικές δράσεις ελευθέρων ριζών.....	22
1.3. Οξειδωτικό Στρες.....	23
1.4. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	24
1.4.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	25
1.4.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	26
1.4.2. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού.....	29
1.4.3. Αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού.....	29
2. Σκοπός.....	30
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	31
3.1 Δείγματα (καταγραφή και επεξεργασία).....	31
3.2. Μέθοδος DPPH.....	31
3.3. Μέθοδος ABTS.....	32
3.4. Superoxide Radical.....	34
3.5. Hydroxyl Radical.....	35
3.6. Reducing power assay.....	35
3.7. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.....	36

3.8.	Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	37
3.9.	Στατιστική Ανάλυση	39
4.	Αποτελέσματα	40
4.2.	Μέθοδος DPPH \cdot	40
4.3.	Μέθοδος ABTS.....	41
4.4.	Μέθοδος Hydroxyl Radical	42
4.5.	Μέθοδος Superoxide Radical	43
4.6.	Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου ($\text{ROO}\cdot$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA	44
4.7.	Μέθοδος Reducing Power	45
4.8.	Μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC).....	46
5.	Συζήτηση	47
6.	Βιβλιογραφία	52

Υπόμνημα Εικόνων

Figure 1: ΤΟ ΜΕΛΙ: Η ΚΟΡΩΝΙΔΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	12
Figure 2: Τα συστατικά του μελιού	15
Figure 3: Η Πίνδος	18
Figure 4: Δημιουργία ελεύθερης ρίζας.....	20
Figure 5: Εξωτερικοί παράγοντες για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών	22
Figure 6: Δεξιά η χημική δομή της ρίζας 1,1 –διφαινυλ-2-πικρυδραζυλ (DPPH·). Αριστερά η χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραξίνης	32
Figure 7: Παραγωγή της ρίζας του ABTS•- μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H ₂ O ₂	33
Figure 8: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικής ουσίας με την ρίζα του ABTS ^{•+}	33
Figure 9: Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA.....	38
Figure 10: Πηκτή αγαρόζης.....	38

Υπόμνημα Πινάκων

Table 1: Ετήσια παραγωγή μελιού μεταξύ των χωρών της Ε.Ε	11
Table 2: Η σύσταση της γύρης	14
Table 3: Ενζυμικοί-μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	25
Table 4: Δείγματα μελιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη	31
Table 5: Αποτελέσματα μετρήσεων Folin-Ciocalteu	46
Table 6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης	47

Υπόμνημα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας DPPH. a-d: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). .	40
Διάγραμμα 2: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας ABTS. a-c: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$). ..	41
Διάγραμμα 3: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας OH. a-e: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	42
Διάγραμμα 4: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας O_2 . a-e: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	43
Διάγραμμα 5: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας προστασίας του πλασμιδιακού DNA από την επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. a-e: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	44
Διάγραμμα 6: Μέτρηση αναγωγικής ικανότητας μελιών μέσω της μεθόδου Reducing Power. a-c: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την πάροδο των χρόνων οι άνθρωποι έχουν την τάση να στρέφονται όλο και περισσότερο προς έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής, ο οποίος εμπεριέχει άθληση και σωστή διατροφή, με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της σωματικής και ψυχικής τους υγείας. Γι' αυτόν τον λόγο, λοιπόν, άρχισε καθημερινά να εμπλουτίζεται το διαιτολόγιο των ανθρώπων με τροφές και προϊόντα, με γνώμονα όχι μόνο τις θρεπτικές τους ιδιότητες αλλά και τη συμβολή τους στη βελτίωση της υγείας. Πολλές έρευνες έχουν δείξει τη σύνδεση της ευζωίας με τη κατανάλωση προϊόντων της μέλισσας σε καθημερινή βάση. Ένας από τους κύριους λόγους είναι και η περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες είναι μία ομάδα βιοδραστικών μορίων με βιολογικές ιδιότητες, με σημαντικότερη τη δράση τους ως αντιοξειδωτικά. Έχουν δηλαδή την ικανότητα να αδρανοποιούν ελεύθερες ρίζες, αποσιωπώντας έτσι τις αρνητικές για τον ανθρώπινο οργανισμό επιδράσεις τους.

Είναι γνωστό ότι το μέλι έχει σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου λόγω της περιεκτικότητάς του σε πολυφαινόλες. Στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή εξετάστηκαν 8 τύποι μελιού, 4 μέλια ανθέων και 4 μέλια από δένδρα, από την ευρύτερη περιοχή της Πίνδου και εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα.

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των διάφορων τύπων μελιού έγινε χρήση των μεθόδων DPPH, ABTS, Hydroxyl Radical, Superoxide Radical, Peroxyl Radical και Reducing Power assay. Ενώ, για την εκτίμηση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου έγινε χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι ως επί το πλείστον τα μέλια που προέρχονται από τα δέντρα σε σύγκριση με τα ανθόμελα παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και έχουν πλουσιότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο.

ABSTRACT

As the years go by, people have the tendency to follow a healthier way of life aiming to ameliorate their physical health by encompassing physical activity and proper diet. On account of this change, they started enriching their diet with food and products not only in view of their nutritional properties but also their contribution in health improvement. Research has shown a connection between people's well-being and the use of bee's products on daily basis. One of the main reasons of this phenomenon is their content in polyphenols. Polyphenols is a group of bioactive molecules with many organic properties. One of these properties that stands out is their activity as antioxidants. This means that they have the ability to inactivate free radicals and thus, concealing their negative influence on the human organism.

It is known that honey plays an important role in human health due to its content in polyphenols. This dissertation thesis examined 8 types of honey, 4 blossom honeys and 4 tree honeys, from the broader area of Pindos and assessed their antioxidant property.

For the measurement of the antioxidant property of the different types of honey the following methods were applied: DPPH, ABTS, Hydroxyl Radical, Superoxide Radical, Peroxyl Radical και Reducing Power assay. In order to assess the total polyphenolic content, the Folin-Ciocalteu reagent was used.

The results proved that honey stemming from trees rather than blossoms mostly have a higher antioxidant activity and a richer polyphenolic content.

1. Εισαγωγή

1.1. Το μέλι

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο παράγεται από τη μέλισσα και χρησιμοποιείται ευρέως σε όλες τις χώρες του κόσμου. Η Ε.Ε φιλοξενεί πάνω από 15 εκατομμύρια κυψέλες, καθώς έχει περίπου 600.000 μελισσοπαραγωγούς και παράγει ετησίως περίπου 250.000 τόνους μέλι.

Χώρες της Ε.Ε	Ισπανία, Ουγγαρία, Γερμανία, Ρουμανία	Πολωνία, Ελλάδα	Πορτογαλία, Γαλλία, Βουλγαρία, Τσεχία, Ην.Βασίλειο	Ιταλία, Κροατία	Αυστρία, Σλοβακία, Σουηδία, Δανία, Βαλτικές Χώρες	Κύπρος, Ιρλανδία, Λουξεμβούργο
Ετήσια παραγωγή μελιού	Πάνω από 20000 τόνους	Μεταξύ 15000 και 20000 τόνων	Μεταξύ 10000 και 15000 τόνων	Μεταξύ 5000 και 10000 τόνων	Μεταξύ 1000 και 5000 τόνων	Λιγότερο από 1000 τόνους

Table 1: Ετήσια παραγωγή μελιού μεταξύ των χωρών της Ε.Ε

Εκτός από τις χώρες της Ε.Ε, η οποία καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση στην παγκόσμια κατάταξη παραγωγής μελιού, η Κίνα είναι η χώρα με την μεγαλύτερη παραγωγή μελιού ετησίως, αφού παράγει περίπου 500.000 τόνους. Στην τρίτη θέση βρίσκεται η Τουρκία με ετήσια παραγωγή περίπου 100.000 τόνων. Παρ' όλη την παραγωγή της Ε.Ε οι ανάγκες της είναι μεγαλύτερες (σχεδόν διπλάσιες) οπότε γίνεται εισαγωγή από την Κίνα (περίπου 40%) και από χώρες της Αμερικής (Μεξικό και Αργεντινή) [1].



Figure 1: Το μέλι: Η ΚΟΡΩΝΙΔΑ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Από τα αρχαία χρόνια, το μέλι είναι γνωστό για τις θρεπτικές και θεραπευτικές του αξίες. Παράγεται σε διάφορα μέρη του κόσμου ανεξαρτήτως κλιματολογικών και εδαφολογικών χαρακτηριστικών. Η παγκόσμια παραγωγή υπολογίζεται περίπου στους 1.2 εκατομμύρια τόνους ετησίως [2] και οι κυριότερες χώρες παραγωγού είναι η Κίνα, η Τουρκία, η Αργεντινή, η Ουκρανία, το Μεξικό και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής.

1.1.1. Τύποι μελιού

Υπάρχουν περίπου 320 διαφορετικές ποικιλίες μελιού που προέρχονται από διάφορες πηγές φυτών (π.χ. ανθόμελο, πεύκου, ελάτου κ.α.). Η γεύση, το χρώμα και η οσμή ενός συγκεκριμένου τύπου μελιού εξαρτώνται από τις διάφορες υγρές πηγές των λουλουδιών και των φυτών που επισκέπτονται οι μέλισσες. Τα διάφορα είδη μελιού είναι συγκρίσιμα όσον αφορά τη θερμοκρασία, τις βροχοπτώσεις και τις εποχιακές και κλιματικές αλλαγές. Το χρώμα του μελιού κυμαίνεται από ανοιχτό καφέ έως σκούρο καφέ, ανάλογα με τον τόπο δράσης των μελισσών [1].

1.1.2. Κυψέλη και Προϊόντα

Οι μέλισσες μπορούν να προσαρμοστούν σε κάθε είδους κατάλυμα εφόσον προστατεύονται από τις καιρικές συνθήκες. Πρώτοι οι Αιγύπτιοι άρχισαν να τις εκτρέφουν, όπως έχει απεικονιστεί σε ανάγλυφα χιλιάδων ετών. Η πρώτη κυψέλη με κινητά πλαίσια δημιουργήθηκε από Έλληνες μελισσοκόμους πριν από περίπου εικοσιπέντε αιώνες. Ο σκοπός τους ήταν να οδηγηθούν οι

μέλισσες στις κατασκευές τους, ώστε να εξαχθούν οι κερήθρες χωρίς να επηρεαστεί η αποικία. Οι μέλισσες χτίζουν τις κερήθρες τους μέσα στα πλαίσια, γεγονός που επιτρέπει στον μελισσοκόμο να τις παρατηρεί και να συγκομίζει το μέλι τους χωρίς να καταστρέφει το κερί ή τις μέλισσες. Το κάτω μέρος της κυψέλης, που λέγεται «σώμα», προορίζεται για τις μέλισσες. Στο μέρος αυτό, τα ενήλικα μεγαλώνουν τις προνύμφες και αποθηκεύουν το μέλι και τη γύρη. [15] Η κυψέλη εκτός από το μέλι παράγει και πλήθος άλλων προϊόντων, όπως τη γύρη, το βασιλικό πολτό, την πρόπολη και το κερί.

1.1.2.1 Η γύρη

Η γύρη που συλλέγει η μέλισσα είναι απαραίτητη για τη διατροφή της ενώ καταναλώνεται και από τον άνθρωπο καθώς θεωρείται τροφικό συμπλήρωμα ιδιαίζουσας σημασίας, αφού[15]:

- Ενισχύει την αντιοξειδωτική δύναμη του οργανισμού
- Βελτιώνει την υγεία της καρδιάς
- Έχει αντιφλεγμονώδη δράση
- Ενισχύει την άμυνα του οργανισμού
- Ενισχύει την καλή λειτουργία του ήπατος
- Ανακουφίζει από τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης

Η σύνθεση της γύρης ποικίλει ανάλογα με την ανθική καταγωγή γεγονός που εξυπηρετεί τις μέλισσες καθώς χρειάζονται αυτή τη ποικιλία για να ισορροπήσουν τη διατροφή τους. Έτσι εκτός από το νερό και την κυτταρίνη (36.5%), οι σάκοι αποτελούνται και από στοιχεία όπως:

Πρωτεΐνες	23.7%	Αποτελεί το 5-6% του συνολικού όγκου της γύρης, όπου βρίσκουμε πολλά αμινοξέα
Σάκχαρα	27%	Κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη.
Μεταλλικά στοιχεία	5%	Κάλιο, ασβέστιο, θείο, μαγνήσιο, ψευδάργυρος, φώσφορος, αλουμίνιο, σίδηρος, σελήνιο
Λιπίδια	4.8%	Υδρογονάνθρακες, κεριά και άνω των 40% βασικά λιπαρά οξέα, εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια των γύρεων
Ιχνοστοιχεία	3%	Βιτ.Α, Β1, Β2, Β3, Β5, Β6, Β8, Β9, Β12, Βιτ.С, Βιτ.Д, Βιτ.Е, Βιτ.Н, φολικό οξύ

Table 2: Η σύσταση της γύρης

1.1.2.2 Ο βασιλικός πολτός

Ο βασιλικός πολτός όπως υποδεικνύει και το όνομα του είναι η διατροφική πηγή της βασίλισσας. Η έκκριση αυτή προέρχεται από τους φαρυγγικούς αδένες που βρίσκονται στο κεφάλι των νεαρών μελισσών. Ο πολτός δίνεται σε όλες τις προνύμφες κατά τις πρώτες τους μέρες, κι έπειτα μόνο στις προνύμφες των βασιλισσών μέχρι την απολέπιση του κελιού τους. Η απολέπιση είναι ένα απαραίτητο ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ συλλογής κερηθρών και εξαγωγής μελιού, χωρίς την οποία το μέλι δε μπορεί να φύγει από τις κερήθρες. Τα βασιλικά κελιά περιέχουν τον πιο πλούσιο πολτό και σε αρκετή ποσότητα για τη συλλογή.

1.1.2.3 Η πρόπολη

Η πρόπολη δρα ως προστατευτικός παράγοντας της κυψέλης. Οι αρχαίοι Έλληνες είχαν διαπιστώσει ότι ορισμένα είδη μελισσών μίκραιναν την είσοδο της κυψέλης με μία φυτική ρητίνη για να υπερασπιστούν την αποικία τους: από εκεί προκύπτει και το όνομα της (πρό-πολη). Για το σφράγισμα της εισόδου, η μέλισσα χρησιμοποιεί ένα μείγμα κεριού και ρετσινιού. Στο εκχύλισμα που παίρνουμε μετά την εξάτμιση, έχουν αναγνωριστεί πολλές μεγάλες τάξεις συστατικών, εκ των οποίων αυτή με τη μεγαλύτερη παρουσία είναι εκείνη των φλαβονοειδών, ενώ περιλαμβάνονται και διάφορα φαινολικά και αρωματικά σύνθετα. Η φαρμακολογία της πρόπολης είναι πολύ μεγάλη και συνηθέστερα χρησιμοποιείται στην ωτορινολαρυγγολογία, στην στοματολογία και την δερματολογία. [15]

1.1.3. Συστατικά του μελιού



Figure 2: Τα συστατικά του μελιού

Το μέλι είναι το μοναδικό παράγωγο εντόμου που καταναλώνεται από τους ανθρώπους. Είναι μία τροφή που περιλαμβάνει περίπου 200 ουσίες [4] και αποτελείται κυρίως από σάκχαρα, νερό και άλλες ουσίες όπως πρωτεΐνες (ένζυμα), οργανικά οξέα, βιταμίνες (ειδικά βιταμίνη Β6, θειαμίνη, νιασίνη, ριβοφλαβίνη και παντοθενικό οξύ),

μέταλλα – συμπεριλαμβανομένων των ασβεστίου, χαλκού, σιδήρου, μαγνησίου, μαγγανίου, φωσφόρου, καλίου, νατρίου και ψευδαργύρου, χρωστικές, φαινολικά οξέα (χάρη στα οποία εκδηλώνονται ποικίλα βιολογικά αποτελέσματα, που το τοποθετούν ψηλά στη λίστα των φυσικών αντιοξειδωτικών), μια μεγάλη ποικιλία πτητικών ενώσεων καθώς και στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη συγκομιδή του μελιού [3].

1.1.4. Οφέλη για την υγεία

Από την αρχαιότητα το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί από διάφορους για την εποχή προηγμένους πολιτισμούς ως φαρμακευτικό προϊόν. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να έχει γίνει εκτεταμένη χρήση του για την αποκατάσταση μολύνσεων. Η πρώτη γραπτή αναφορά σχετικά με το μέλι είναι από τους Σουμέριους και χρονολογείται περί το 2000 π.Χ., όπου και αναφέρεται η χρήση του ως φάρμακο και αλοιφή. Το μέλι Manuka είναι μονοανθικό μέλι που παράγεται από το νέκταρ του δένδρου manuka. Το μέλι manuka παρασκευάζεται από μέλισσες *Apis mellifera*, οι οποίες προήλθαν από την Αυστραλία πριν από την έναρξη της Μειόκαινου ζηρασίας. Το μέλι manuka έχει μελετηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες ανά το κόσμο καθώς έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό κατά πολλών ανθρώπινων παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*. καθιστώντας αυτό το μέλι μια πολλά υποσχόμενη λειτουργική τροφή για τη θεραπεία τραυμάτων ή έλκους στομάχου [7]. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι το μέλι είναι αποτελεσματικό έναντι των MRSA, των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων και των ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντεροκόκκων (VRE).

Οι θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού μπορούν να αποδοθούν στο γεγονός ότι διαθέτει αντιβακτηριακή δράση, διατηρεί ένα υγρό περιβάλλον στη πληγή που προάγει την επούλωση και έχει υψηλό ιξώδες το οποίο βοηθά στην πρόληψη λοιμώξεων [6]. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού επιταχύνουν την ανάπτυξη νέου ιστού για να επουλώσει την πληγή [5]. Τα μέλια *Medihoney* και *Manuka* έχει αποδειχθεί ότι έχουν δράση *in vivo* και είναι κατάλληλα για τη θεραπεία ελκών, μολυσμένων τραυμάτων και εγκαυμάτων [5,6]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο τομέα της υγείας εκτός από το μέλι παρουσιάζουν και τα υπόλοιπα προϊόντα της μέλισσας. Παραδείγματος χάριν η πρόπολη είναι ένα προϊόν που ενδείκνυται για τις αναπνευστικές παθήσεις, κυρίως για τη μείωση της συχνότητας και της έντασης των κρίσεων άσθματος. Οι ορμονικές και ανοσοπροστατευτικές της επενέργειες ευνοούν την αύξηση των αμυντικών ικανοτήτων του οργανισμού.

Ο βασιλικός πολτός έχει ιδιότητες που επιτρέπουν τη μείωση του χρόνου νοσηλείας των ατόμων που υποφέρουν από μη ειδικές ασθένειες των πνευμόνων. Οι ανοσορυθμιστικές του ιδιότητες καταπραΰνουν τα πιο ενοχλητικά συμπτώματα όπως είναι ο βήχας, η βραχνάδα, οι

κρίσεις άσθματος και η εφίδρωση. Λόγω των αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονώδων της ιδιοτήτων, η πρόπολη είναι πολύ αποτελεσματική στο σύνολο των ωτορινολαρυγγολογικών παθήσεων, όπως η ωτομύκωση, η ωτόρροια ή η τυμπανοϋμενίτιδα. Επιπλέον η πρόπολη έχει αντισηπτική δράση και επιδρά ισχυρά κατά ορισμένων παρασιτώσεων , όπως είναι η ταινία. Ο βασιλικός πολτός είναι ένας ρυθμιστής της αγγειακής λειτουργίας (μειώνει την αρτηριακή πίεση χάρη στα φλαβονοειδή, των οποίων οι αντιυπερτασικές και καρδιοτονωτικές ιδιότητες είναι γνωστές).

Το μέλι φαίνεται να καταπολεμά ρινίτιδες, ιγμορίτιδες και κόρυζες (οξύς κατάρρους των ρινικών βλενογόνων), λόγω των αποχρεμπτικών, καταπραϋντικών και αντιβηχικών ιδιοτήτων του. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας του σε φρουκτόζη, το μέλι έχει μία ήπια καθαρτική ιδιότητα. Επιπροσθέτως, η γύρη, το ψωμί των μελισσών, ή ‘τούρτα’ της κυψέλης, έχει την ικανότητα να μειώνει την αρτηριακή υπέρταση, καθώς και την ευθραυστότητα των τριχοειδών, ενώ ο βασιλικός πολτός επιτρέπει να μειώνεται σταδιακά η αθηρωματική πλάκα και, επομένως, να βελτιώνεται η κατάσταση των ιστών που έχουν προσβληθεί από αθηρωματοσκλήρωση. Τέλος, το μέλι και όλα τα προϊόντα που παράγει η μέλισσα βρίσκουν πλήθος εφαρμογών σε ρευματοπάθειες, δερματοπάθειες, παθήσεις των οφθαλμών, νευρολογικές παθήσεις, ουρογεννητικές, γυναικολογικές και μαιευτικές παθήσεις, άλλες πεπτικές παθήσεις, σε συνήθεις ασθένειες των παιδιών καθώς ακόμη και στην κτηνιατρική [15].

1.1.5. Η Πίνδος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται την αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζουν διάφορες ποικιλίες μελιού από μελίσσια τοποθετημένα στην ευρύτερη περιοχή της Πίνδου. Η Πίνδος είναι μία περιοχή στην ραχοκοκκαλιά της Ελλάδας, που είναι πολύ πλούσια σε φυτά, δένδρα, άνθη κ.λ.π. και παρουσιάζει μεγάλη βιοποικιλότητα και ειδικότερα ως προς το φυτικό της βασίλειο. Ελιά, μουσμουλιά, κουμαριά, δενδρολίβανο, αλογοθύμαρο, αρκουδόβατος, ακονιζιά, ζίννια, στάχυς ο γερμανικός, βατομουριά, αγιόκλημα, ασφάκα, λάμιο το δισχιδές, γεράνι, ασπάλαθος, γκορτσιά (άγρια αχλαδιά), ανεμόνη, αγριοτρινταφυλλιά, παλιούρι το αγκάθι του Χριστού, αγριόβικος (καβαλλαριά) είναι μερικά μόνο από τα ενδημικά φυτά της Πίνδου και πιθανές εστίες και θέλγητρα των μελισσών [57].

1.1.5.1. Κλίμα και Έδαφος

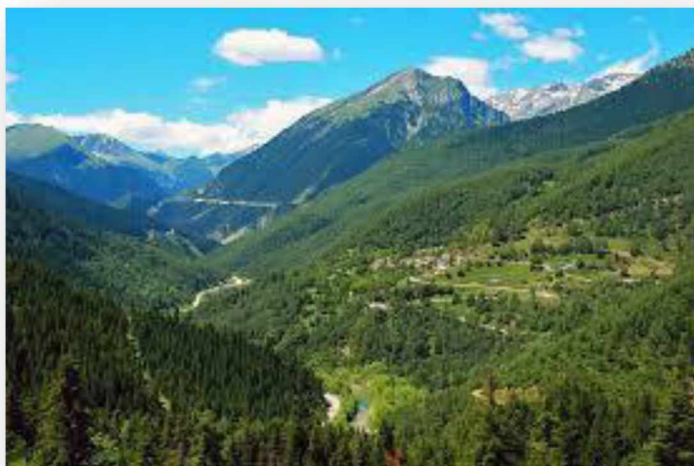


Figure 3: Η Πίνδος

Στα βουνά, τα χαρακτηριστικά του πετρώδους εδάφους, πάνω στο οποίο εγκαθίσταται το χώμα, καθορίζουν και το είδος των φυτών. Όσο μεγαλύτερο είναι το υψόμετρο, τόσο πιο δυσμενείς είναι οι συνθήκες επιβίωσης της χλωρίδας και της πανίδας. Η μείωση της θερμοκρασίας κατά 1 βαθμό ανά 100 μέτρα υψόμετρο, η

οποία ενισχύεται με τους δυνατούς ανέμους στις πιο εκτεθειμένες πλαγιές και ράχες, και οι συχνές χιονοπτώσεις δεν ευνοούν την ανάπτυξη των φυτών. Ωστόσο, το χιόνι προστατεύει τα φυτά το χειμώνα από το ψύχος, καθώς η θερμοκρασία του εδάφους διατηρείται κοντά στους 0°C. Η ηλιακή ακτινοβολία εντείνεται όσο αυξάνεται το υψόμετρο και οι υπεριώδεις ακτίνες κάνουν πιο έντονα τα χρώματα των φυτών, οπότε και πιο ελκυστικά στα έντομα και τα άλλα ζώα που συμβάλλουν στην επικονίαση τους.

Η περίοδος βλάστησης περιορίζεται κατά 6-7 μέρες κάθε 100 μέτρα υψόμετρο. Έτσι τα φυτά διαχωρίζονται σε επίπεδα, γεγονός που έχει άμεσες συνέπειες για τη μελισσοκομία. Μέχρι τα 500-800 μέτρα, στο ημιορεινό επίπεδο, η μορφή του φυτικού περιβάλλοντος μεταβάλλεται μόνο από την ύπαρξη πλαγιών, και τα είδη των φυτών είναι τα ίδια με εκείνα που υπάρχουν στις πεδιάδες: μεγάλες καλλιέργειες, βελανιδιές και ποικιλία φυτών.

Το ορεινό επίπεδο: από τα 500-800 μέτρα έως τα 1300-1800, οι χιονοπτώσεις και οι πάγοι αυξάνονται, ενώ η ομίχλη ευνοεί την ανάπτυξη της οξιάς, των πεύκων και των ελάτων. Στο επίπεδο αυτό υπάρχουν ζώνες με βοσκοτόπια και καλλιέργειες φυτών για την εκτροφή των ζώων, κυρίως στις πλαγιές που βλέπουν προς το Νότο. Επίσης, υπάρχουν φυτά που φύονται και στις πεδιάδες ή είναι συγγενικά με τα είδη που αναπτύσσονται στα βουνά.

Το ημιαλπικό επίπεδο: η μέση θερμοκρασία μειώνεται κατά 5°C – 8°C, ενώ η βλάστηση διαρκεί μόλις πέντε μήνες. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας την ημέρα και την νύχτα είναι μεγάλες. Εδώ υπάρχουν κυρίως δάση με κωνοφόρα: πεύκα στα βόρεια και λάριγες στα νότια. Στα 2000-2400 μέτρα δεν υπάρχουν δέντρα κι εμφανίζεται μία ζώνη πλούσια σε θαμνοειδή μελιτοφόρα φυτά (ροδόδενδρα). Στις πιο υγρές ζώνες αναπτύσσονται ψηλά χόρτα και πολλά μελιτοφόρα φυτά. Οι βοσκοτόποι και τα λιβάδια με θεριστικά φυτά είναι ελκυστικά στις μέλισσες, αρκεί ο θερισμός να μην προηγείται της ανθοφορίας τους [15].

Το αλπικό επίπεδο: μόνο σπάνια είδη επιβιώνουν κατά τους τρεις μήνες της βλάστησης. Οι ανθοφορίες είναι όψιμες και η βλάστηση αραιή. Κατά τα άλλα, το μόνο είδος που επιβιώνει είναι μερικές λειχήνες, που είναι καλυμμένες με χιόνι όλο το χρόνο.

Στο βουνό, η γεωγραφική πίεση είναι μικρότερη και επομένως περιορίζεται η χρήση ζιζανιοκτόνων και λιπασμάτων. Οι ανθοφορίες είναι συχνά έντονες, αλλά μικρής διάρκειας. Ωστόσο, οι μέλισσες επωφελούνται από την ανθοφορία των φυτών μέχρι τα πρώτα χιόνια. Το ξεχειμώνιασμα των κυψελών επιτρέπει την μεγιστοποίηση των σύντομων περιόδων βλάστησης σε μεγάλα υψόμετρα, τον περιορισμό του κινδύνου που επιφυλάσσουν οι χαμηλές θερμοκρασίες, συμπεριλαμβανομένων και των θερινών, και την καλύτερη εκμετάλλευση των ορεινών αποθεμάτων νέκταρ και γύρης [15].

1.2. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή άτομα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ασταθή που έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και έχουν την τάση να απομακρύνουν ηλεκτρόνια από τα βιομόρια, όπως το DNA, τα λιπίδια ή τις πρωτεΐνες ώστε να συμπληρώσουν τη στιβάδα σθένους τους. Αυτό έχει ως απόρροια τη μετατροπή των ίδιων μορίων-στόχων σε ρίζες, οδηγώντας έτσι στην έναρξη αλυσιδωτής αντίδρασης με τελικό αποτέλεσμα τη βλάβη των κυττάρων [16]. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και δύναται να παραχθούν και ως συνέπεια άλλων κυτταρικών διεργασιών (π.χ. λόγω του ανοσοποιητικού συστήματος) ή

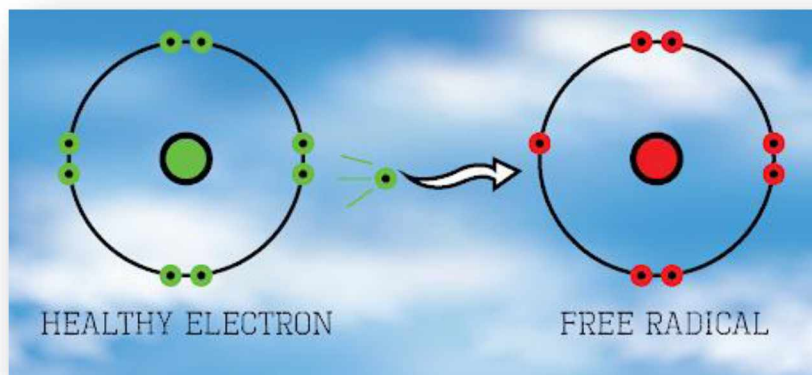


Figure 4: Δημιουργία ελεύθερης ρίζας

εξωτερικών παραγόντων (άθληση, έκθεση σε τοξικούς παράγοντες κλπ.) [17]. Αυτά τα μόρια που έχουν το οξυγόνο ως κεντρικό άτομο, ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive

Oxygen Species, ROS) με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη ρίζα του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και την υδροξυλική ρίζα (HO^{\cdot}). Επιπλέον, στις ROS ανήκουν και μη ριζικά παράγωγα, όπως το υπεροξίδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Όμως, εκτός των ROS, υπάρχουν και ελεύθερες ρίζες με διαφορετικά κεντρικά άτομα, όπως το άζωτο, έχοντας παρεμφερή τρόπο δράσης και οι δυο δραστικές μορφές. Αντίστοιχα οι ελεύθερες ρίζες με κεντρικό άτομο το άζωτο, ονομάζονται δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS), όπως είναι το μονοξειδίο (NO^{\cdot}) και το διοξειδίο (NO_2^{\cdot}) του αζώτου [18].

1.2.1. Παραγωγή Ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε ενδογενώς είτε εξωγενώς. Ενδογενώς δημιουργούνται με τους εξής τρόπους:

- Κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης προκύπτει η ατελής αναγωγή του οξυγόνου με αποτέλεσμα τη δημιουργία ανιόντος σουπεροξειδίου [19]. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου στην οποία δημιουργείται διαβάθμιση πρωτονίων κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από μόρια NADPH με τελικό αποδέκτη το οξυγόνο. Η γλυκόλυση και ο κύκλος του κιτρικού οξέως παράγουν μόρια NADH και FADH₂ επιφορτισμένα με ένα ζεύγος ηλεκτρονίου. Αυτά τα ηλεκτρόνια οδηγούνται στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων τα οποία ανάγουν το O₂ σε H₂O [20].
- Το οξυγόνο που εισέρχεται στην κυκλοφορία αλλά δε καταλήγει στα μιτοχόνδρια, χρησιμοποιείται από ενζυμικά συστήματα στο κυτταρόπλασμα και το ενδοπλασματικό δίκτυο (π.χ. NADH οξειδάση, οξειδάση του κυτταροχρώματος P450 κ.α.). Τα ένζυμα αυτά, οδηγούν βαθμιαία ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, χωρίς να το ανάγουν πλήρως, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων σε κάθε στάδιο. Τελικά, γίνεται βαθμιαία η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου προς νερό, με τα ενδιάμεσα προϊόντα να είναι -κατά σειρά παραγωγής τους- το O^{2•-}, το H₂O₂ και το HO• [21].
- Ένας οργανισμός σε κατάσταση φλεγμονής μπορεί να έχει σαν επακόλουθο τη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Μετά την είσοδο παθογόνων η φλεγμονώδης αντίδραση βοηθά στη συσσώρευση μακροφάγων κυττάρων. Τα μακροφάγα διαθέτουν στην πρωτεϊνική τους μεμβράνη την NADPH οξειδάση η οποία σε κατάσταση φλεγμονής, ενεργοποιείται και παράγει ROS στη προσπάθειά της να καταστρέψει τα παθογόνα [22].

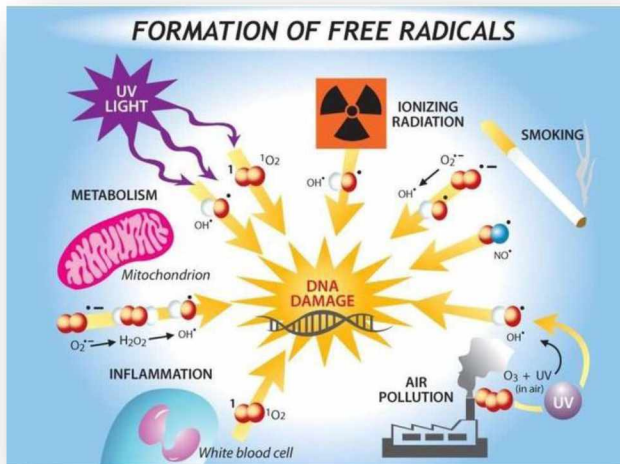


Figure 5: Εξωτερικοί παράγοντες για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών

Εξωγενώς η παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υπερόδου ακτινοβολίας, του αλκοόλ, του καπνίσματος, του στρες και της επαφή με ξενοβιοτικές ουσίες όπως είναι τα απόβλητα των βιομηχανιών και τα φυτοφάρμακα [17].

1.2.2. Βιολογικές δράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παρότι δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις μέσω του οξειδωτικού στρες (βλέπε 1.3), εντούτοις συμμετέχουν και σε ένα πλήθος φυσιολογικών οξειδοαναγωγικών διεργασιών των οργανισμών. Στο πλαίσιο αυτό, στους αερόβιους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί πολλοί μηχανισμοί που εκμεταλλεύονται τις ελεύθερες ρίζες για τη μεταγωγή σήματος, τον πολλαπλασιασμό, την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στο ανοσοποιητικό σύστημα, συνεισφέροντας στην ομοίωση των κυττάρων και ολόκληρου του οργανισμού. Όταν οι ελεύθερες ρίζες είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις (ή όταν ανεπαρκούν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού), αυτές αλληλεπιδρούν με κυτταρικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) αλλοιώνοντας τη δομή τους ή καταστρέφοντάς τα [23-27].

1.3. Οξειδωτικό Στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η κατάσταση στην οποία υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των ελευθέρων ριζών [28]. Ο ορισμός που αναφέρθηκε παραπάνω διατυπώθηκε για 1^η φορά το 1985 από τον Helmut Sies. Με την πάροδο των χρόνων, πολλές επιστημονικές ομάδες ασχολήθηκαν με το θέμα αυτό, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα να προκύψουν κάποιοι ακόμη ορισμοί. Επικρατέστερος και πιο ευρέως αποδεκτός είναι εκείνος που διατυπώθηκε το 2006 από τον Sean P. Jones και ορίζει το οξειδωτικό στρες ως 'η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων και διαταραχή στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση ή/και μοριακή βλάβη'. Από τις πρώτες κιόλας μελέτες το φαινόμενο αυτό θεωρήθηκε ως επιζήμιο για τον οργανισμό, αφού συνδέθηκε με αρκετές παθολογικές καταστάσεις. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να επέλθει είτε από τη μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, είτε από την αύξηση της παραγωγής των δραστικών μορφών του οξυγόνου ή/και του αζώτου. Κατά τη μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών παρατηρούνται μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και τη μείωση των επιπέδων των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων. Όταν υπάρχει αύξηση της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου τα κύτταρα εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα ROS ή σε παράγοντες που αυξάνουν τη παραγωγή τους [29].

Μελέτες έχουν συνδέσει το οξειδωτικό στρες με διάφορες ασθένειες, μερικές από τις οποίες είναι: ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές νόσοι, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η ισχαιμική βλάβη, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer, Parkinson) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα [30]. Τα αναπνευστικά προβλήματα, οι δερματικές παθήσεις, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, το χρόνια σύνδρομο κόπωσης, καθώς και το AIDS είναι μερικές ακόμη παθολογικές καταστάσεις που έχουν συνδεθεί με το οξειδωτικό στρες [31].

1.4. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Αφού οι αερόβιοι οργανισμοί παράγουν συνεχώς ελεύθερες ρίζες, έχουν αναπτύξει εξελικτικά πλήθος αντιοξειδωτικών μηχανισμών για να προλαμβάνουν και να επιδιορθώνουν τις οξειδωτικές βλάβες. Αντιοξειδωτικό είναι «κάθε ουσία, μικρής συγκέντρωσης σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα που μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος» [17]. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ενός κυττάρου μειώνουν τις οξειδωτικές βλάβες των ελευθέρων ριζών συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού [32]. Όμως είναι απαραίτητη η διατήρηση κάποιων επιπέδων ελευθέρων ριζών ώστε να λειτουργούν τα οξειδοαναγωγικά σηματοδοτικά μονοπάτια, δηλαδή οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί πρέπει να εξουδετερώνουν μόνο την περίσσεια των παραγόμενων οξειδωτικών μορίων [33].

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

(α) ενζυμικούς που είναι αμιγώς ενδογενείς και

(β) μη ενζυμικούς που μπορεί να είναι ενδογενείς αλλά και εξωγενείς, προσλαμβανόμενοι δηλαδή από τη διατροφή.

Ενα μόριο θεωρείται αντιοξειδωτικό όταν αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες, σχηματίζοντας λιγότερο δραστικά προϊόντα από τα αρχικά μόρια.

Ενζυμικοί Μηχανισμοί	Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί
Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)	Βιταμίνη Α (ρετινόλη)
Καταλάση (CAT)	Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)	Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	Θειόλες (γλουταθειόνη)
Στρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs)	Πολυφαινόλες
	Ουρικό οξύ
	Φερριτίνη
	Χολερυθρίνη
	Χημικά στοιχεία συμπαραγόντες σε ορισμένα από τα ανωτέρω ένζυμα (σελήνιο, ψευδάργυρος, σίδηρος, χαλκός και μαγνήσιο)

Table 3: Ενζυμικοί-μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

1.4.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

1.4.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Αυτό το ένζυμο καταλύει τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου (O_2^-) σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η δισμουτάση παράγεται σε τρεις ισομορφές, μια κυτταροπλασματική, μια μιτοχονδριακή και μια εξωκυτταρική [34-35]. Θεωρείται απαραίτητη για την επιβίωση των αερόβιων οργανισμών καθώς είναι η πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι των οξειδωτικών μορίων.

1.4.1.2. Καταλάση (CAT)

Πρόκειται για μια τετραμερή αιμοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα και διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο [36].

1.4.1.3. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη) έχει τη δυνατότητα προσφοράς ενός ηλεκτρονίου της σουλφυδριλικής ομάδας προς εξουδετέρωση ηλεκτρονιόφιλων μορίων, οδηγώντας ταυτόχρονα στην οξείδωση της ίδιας. Η οξειδωμένη της μορφή (GSSG) αποτελείται από δυο μόρια γλουταθειόνης ενωμένα μέσω δισουλφιδικού δεσμού και είναι ανενεργή. Η επανενεργοποίηση της προϋποθέτει τη δραστηριότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), κάνοντας χρήση του NADPH ως δότη ηλεκτρονίων [37].

1.4.1.4. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι μια σεληνοπρωτεΐνη που καταλύει την οξείδωση της GSH σε GSSH. Απαντάται σε 8 ισομορφές με την πρώτη να είναι η αφθονότερη. Οι υπεροξειδάσες δρουν προστατευτικά έναντι οξειδωτικών βλαβών μέσω της εξουδετέρωσης υπεροξειδίων, όπως π.χ. τα λιπιδικά υπεροξειδία. Η δραστηριότητα της GPx είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της GSH.

1.4.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τόσο ενδογενή μόρια όσο και εξωγενή τα οποία μπορούν να ληφθούν μέσω της διατροφής.

1.4.2.1. Βιταμίνες C και E

Είναι οι δυο πιο γνωστές βιταμίνες και όπως όλες οι ενώσεις αυτής της ομάδας, λαμβάνονται από τη διατροφή. Η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή ενώ οι E λιποδιαλυτές. Και οι δυο εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ λόγω της διαλυτότητας τους παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση (Οι βιταμίνες E λόγω λιποδιαλυτότητας συναντώνται στις κυτταρικές μεμβράνες όπου προστατεύουν από λιπιδική υπεροξειδωση). Η βιταμίνη C είναι ένα από τα σημαντικότερα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά μόρια καθώς μπορεί να εξουδετερώσει δραστικά μόρια μέσω της προσφοράς ηλεκτρονίων. Οι βιταμίνες E (τοκοφερόλες) είναι ένα σύνολο οκτώ ενώσεων με την πλέον δραστική να είναι η α-τοκοφερόλη [38].

1.4.2.2. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι μια τριπεπτιδική (γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη) θειόλη, μοριακού βάρους 307 Da και αποτελεί το πιο σημαντικό ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, αφού συναντάται σε όλους τους αερόβιους καθώς και σε κάποιους αναερόβιους οργανισμούς. Το μεγαλύτερο ποσοστό της (~90%) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Η παρουσία της είναι καθοριστική στην άμυνα έναντι οξειδωτικών παραγόντων [39,40]. Η υπεροξειδάση (GPx) και οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) οδηγούν σε οξείδωση του τριπεπτιδίου και ταυτόχρονη σύνδεση του (ή προσφορά ηλεκτρονίου του) με άλλα μόρια. Μέσω της GPx εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ηλεκτρόνια, ενώ μέσω των GSTs συμμετέχει στη φάση II του μεταβολισμού ξενοβιοτικών, καθώς τα καθιστά πιο υδατοδιαλυτά. Ακόμα, συμβάλλει στην αναγέννηση των βιταμινών C και E [39].

1.4.2.3. Ουρικό οξύ

Το ουρικό είναι προϊόν καταβολισμού των πουρινών και είναι αξιοσημείωτη η παρουσία του στο πλάσμα, ενώ η ισχυρή αντιοξειδωτική του δράση οφείλεται στην αναγωγική του ικανότητα [41].

1.4.2.4. Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι φυτικά παράγωγα του δευτερογενούς μεταβολισμού και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική άμυνα έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων [42]. Εντοπίζονται σε όλα τα είδη φυτών, όπως τα λαχανικά, τα φρούτα, τα ροφήματα (Τσάι καφέ κ.α.) και τους ξηρούς καρπούς [43]. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία καθώς έχουν αναγνωρισθεί μέχρι στιγμής αρκετές χιλιάδες. Οι κυριότερες κατηγορίες είναι: οι πολυφαινόλες, οι αζωτούχες ενώσεις (αλκαλοειδή) και τα τερπένια [44,45]. Εκ των τριών ομάδων, οι πολυφαινόλες είναι η πολυπληθέστερη με πάνω από 8000 αναγνωρισμένα είδη. Όλες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό έναν αρωματικό δακτύλιο με μία τουλάχιστον υδροξυλομάδα [46]. Η πλειοψηφία των πολυφαινολών απαντώνται ως σύμπλοκα άνω του ενός φαινολικού μορίου, όντας έτσι διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή μόρια. Ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η συσχέτιση που διαφαίνεται μεταξύ της κατανάλωσης τους και των ευεργετικών επιπτώσεων για την υγεία [47-49]. Τα φλαβονοειδή είναι η πιο καλά μελετημένη υποκατηγορία, καθώς έχουν εντοπιστεί πάνω από 5000 διαφορετικές ενώσεις που χωρίζονται στις φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες. Συχνότερα απαντώνται σε πολυμερή μορφή σε σύνδεση με σάκχαρα που οδηγούν σε γλυκοζυλιωμένα παράγωγα. Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός οξυγονωμένου πυρανικού δακτυλίου. Μελέτες δείχνουν πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία όπως η μείωση συχνότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [50,51]. Μετά τα φλαβονοειδή, τα πολυφαινολικά οξέα αποτελούν τη δεύτερη μεγαλύτερη υποκατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων, έχοντας ως βάση το υδροξυκινναμικό ή το υδροξυβενζοϊκό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα (όπως το καφεϊκό, το κουμαρικό και το φερουλικό οξύ) παράγονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τα υδροξυβενζοϊκά και συνήθως συναντώνται σε γλυκοζυλιωμένη ή εστερική μορφή. Από την άλλη, τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. το γαλλικό οξύ) βρίσκονται συνήθως σε μικρές ποσότητες, αποτελώντας κυρίως υπομονάδες πολυμερών (π.χ. ταννίνες) [51].

1.4.2. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μελιού

Έρευνες έχουν αποδείξει στην πάροδο των ετών την αντιοξειδωτική δράση του μελιού. Στοιχεία διαφόρων μελετών ανά το κόσμο, δείχνουν ότι το μέλι δρα μέσω ενός ρυθμιστικού δρόμου πολλαπλών οδών σηματοδότησης και μοριακών στόχων. Μπορεί να επηρεάσει πολλαπλούς στόχους στις οδούς σηματοδότησης των κυττάρων όπως η επαγωγή των κασπασών στην απόπτωση, η διέγερση των TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFNGR1, p53 και ανοσοκυττάρων, αναστολή πολλαπλασιασμού κυττάρων, διακοπή κύκλου κυττάρων, αναστολή της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών, IL-1, IL-10, COX-2, LOXs και PGE2, και διαμόρφωση άλλων διαφορετικών στόχων [9]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της βελτίωσης των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, ρυθμιστικών του ανοσοποιητικού και οιστρογονικών αποκρίσεων για τη μείωση διαφορετικών τύπων ασθενειών [8]. Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού αποδίδεται κυρίως στις πολυφαινόλες του (φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα), στα αντιοξειδωτικά ένζυμα (καταλάση και υπεροξειδάση), στις βιταμίνες (βιταμίνη C), στα προϊόντα αντίδρασης Maillard (μελανοειδείς), στα καρτενοειδή και στα αμινοξέα (προλίνη). Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις του μελιού μπορούν να αποτρέψουν τις παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες [13,14].

1.4.3. Αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού έχει αποδοθεί στην παρουσία αδρανών αντιβιοτικών παραγόντων σε αυτό. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν το όξινο pH του, την οσμωτική δράση των σακχάρων και την παραγωγή H₂O₂ από υπεροξειδάση. Τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και η λυσοζύμη δρουν συνεργατικά και υποστηρίζουν την αντιμικροβιακή δράση του μελιού [8,10]. Επιπλέον, η υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα μπορεί να βοηθήσει στην εξάλειψη των βακτηρίων μέσω της όσμωσης [11]. Η ύπαρξη μεθυλογλυοξάλης (MGO) και η πρόδρομη διυδροξυακετόνη (DHA) έχουν αναγνωριστεί ως αναστολείς της βακτηριακής ανάπτυξης μέσω της αναστολής της ουρεάσης. Το ένζυμο ουρεάση διευκολύνει τα βακτήρια να προσαρμοσθούν και να αναπτυχθούν γρήγορα παράγοντας αμμωνία σε όξινο περιβάλλον [8,12].

2. Σκοπός

Ως κύριος σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ορίζεται η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων ειδών μελιού, προερχόμενων από παραγωγούς που δραστηριοποιούνται στην ευρύτερη περιοχή της Πίνδου. Η μέχρι τώρα γνώση σχετικά με την αποτελεσματικότητα, τη δράση και τη σύσταση των μελιών που παράγονται στην περιοχή αυτή περιορίζεται κυρίως σε εμπειρικό και θεωρητικό επίπεδο. Στην κατεύθυνση αυτή θεωρείται ιδιαίτερα σπουδαία η ανάδειξη επιστημονικών δεδομένων, που θα δώσουν απαντήσεις και πιθανώς θα επιβεβαιώσουν τον άνωθεν ισχυρισμό. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, τα δείγματα θα εξετασθούν αρχικά ως προς το πολυφαινολικό τους περιεχόμενο, την αντιοξειδωτική αλλά και την αναγωγική τους ικανότητα.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Δείγματα (καταγραφή και επεξεργασία)

Τα δείγματα προέρχονται από παραγωγούς που δραστηριοποιούνται στην ευρύτερη περιοχή της Πίνδου. Για να είναι δυνατή η χρήση των δειγμάτων έγινε αραιώση 1:2 με dH₂O ενώ ακολούθησε θέρμανση του δείγματος στους 30-35 °C για 5 λεπτά με σκοπό την πλήρη διάλυση και ομογενοποίηση του. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε ντουλάπι σε θερμοκρασία δωματίου όπου και διατηρήθηκαν για 2 ημέρες. Με το πέρας των 2 ημερών η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

<u>Κατηγορία Μελιού</u>	<u>Τύπος Μελιού</u>	<u>Ημερομηνία Συγκομιδής</u>
Ανθόμελο	Ανθόμελο	07/2020
	Ανθόμελο	07/2020
	Ανθόμελο	07/2020
	Ανθόμελο	07/2020
Μέλι Δένδρων	Μέλι Καστανίας	08/2020
	Μέλι Δάσους	07/2020
	Μέλι Βελανιδιάς	07/2020
	Μέλι Δρύς-Βελανιδιά	07/2020

Table 4: Δείγματα μελιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

3.2. Μέθοδος DPPH

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Figure 6). Το διάλυμα αυτή της ρίζας διαθέτει έντονο μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Με τη προσθήκη ουσίας που διαθέτει αντιοξειδωτική ικανότητα η ρίζα DPPH ανάγεται - λαμβάνοντας ένα άτομο υδρογόνου (ή ένα e⁻) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Εικόνα 6) η οποία έχει κίτρινο χρώμα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον

αποχρωματισμό του δείγματος αλλά και τη μείωση της οπτικής απορρόφησης. Όσο πιο έντονη είναι η μείωση, τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

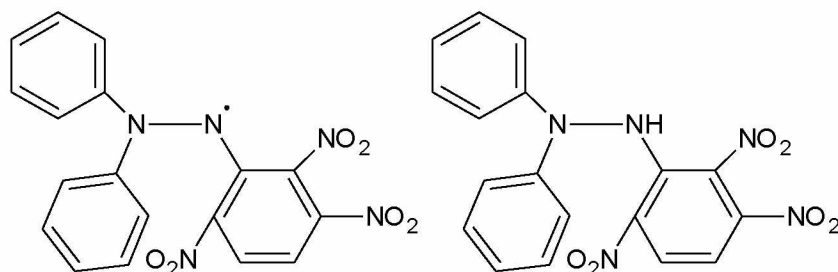


Figure 6: Δεξιά η χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζυλ (DPPH·). Αριστερά η χημική δομή της 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με τη παρασκευή της ρίζας του DPPH σε συγκέντρωση 2mM. Στη συνέχεια σε erpendorf προστίθενται η εξεταζόμενη ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις, μεθανόλη και τέλος η ρίζα DPPH. Ακολουθεί έντονη ανάδευση, επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος [58].

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.3. Μέθοδος ABTS

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των μορίων με την σταθερή ρίζα $ABTS^{\bullet+}$. Η ρίζα αυτή παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS) μέσω δράσης περοξειδάσης (HRP) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) (Figure 7). Η ουσία προστίθεται μετά το σχηματισμό της ρίζας. Η ρίζα του $ABTS^{\bullet+}$ φέρει πράσινο χρώμα

και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί ουσία με αντιοξειδωτική ικανότητα τότε η ρίζα του $ABTS^{\bullet+}$ ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση στα 730 nm να ελαττώνεται (Figure 8).

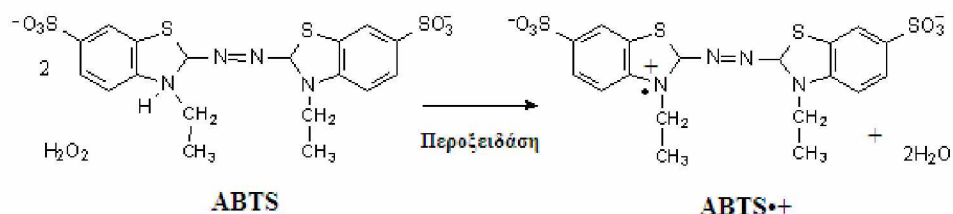


Figure 7: Παραγωγή της ρίζας του $ABTS^{\bullet+}$ μέσω της δράσης περοξειδάσης παρουσία H_2O_2

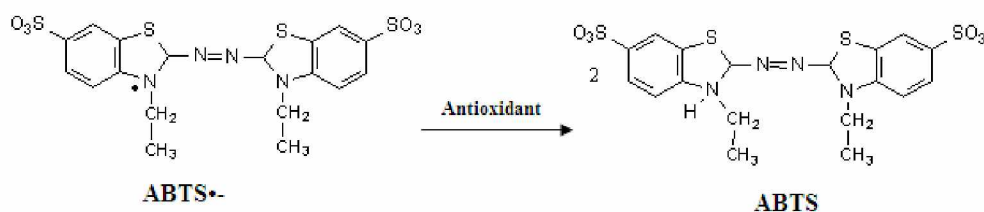


Figure 8: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτική ουσίας με την ρίζα του $ABTS^{\bullet+}$

Για τη δημιουργία της ρίζας παρασκευάζεται διάλυμα ABTS σε συγκέντρωση 2 mM από το οποίο στην αντίδραση προστίθενται 500 μ l. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται διάλυμα H_2O_2 30% 8.8 M το οποίο αραιώνεται ώστε στην αντίδραση με τη προσθήκη 50 μ l η συγκέντρωση να είναι 30 μ M. Τέλος προστίθενται 50 μ l ενζύμου HRP αραιώσεως 1:20 από το αρχικό διάλυμα. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εξεταζόμενου εκχυλίσματος/ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος [59].

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.4. Superoxide Radical

Έχει παρατηρηθεί ότι η ρίζα $O_2^{\bullet-}$ μπορεί να οδηγήσει σε θανάτωση των κυτάρρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Είναι επίσης πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι $O_2^{\bullet-}$ προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\bullet-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλέ NBT. Όσο πιο έντονος είναι ο αποχρωματισμός τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας. Στην αντίδραση αρχικά προστίθεται η προς εξέταση ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 16mM, pH 8.0 το οποίο αραιώνεται από διάλυμα 1M. Ενώ τέλος προστίθενται NBT 300 μ M, NADH 468 μ M και PMS 60 μ M. Τα δείγματα επωάζονται στο σκοτάδι για 5 λεπτά κι έπειτα μετρούνται φασματοφωτομετρικά στα 560 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος [60].

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.5. Hydroxyl Radical

Η ρίζα υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα. Είναι ιδιαίτερα επιβλαβής ρίζα, ικανή να βλάψει βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Αυτές οι ρίζες συνδιάζονται με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλούν θραύση των κλώνων που οδηγούν σε καρκινογέννεση, μεταλλαξιγέννεση και κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα απομάκρυνσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) ενός εκχυλίσματος σχετίζεται με την αντιοξειδωτική του δράση. Η επίδραση των εκχυλισμάτων σε ρίζες υδροξυλίου δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη αποικοδομείται κατόπιν έκθεσής της σε ρίζες υδροξυλίου που παράγονται από την αντίδραση Fenton. Για την δημιουργία της αντίδρασης αρχικά παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα 0.2M, pH 7.4. Στη συνέχεια προστίθενται 2-deoxyribose 10mM, διάλυμα $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ 10mM, H_2O_2 10mM το οποίο έχει αραιωθεί από stock 8,8 M, dH_2O και το δείγμα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ακολουθεί έντονη ανάδευση και επώαση για 1 ώρα σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37°C. Με το πέρας της επώασης ακολουθεί η προσθήκη Trichloroacetic acid (TCA) 2,8% w/v και TBA 1%. Έπειτα τα δείγματα βράζουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 95-100 °C και κρύνουν σε πάγο για 5 λεπτά. Με το πέρας αυτής της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 3000 rpm και τέλος φωτομέτρηση στα 520 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος [60].

Η αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\%RSC = (\text{απορρόφηση control} - \text{απορρόφηση ουσίας}) / \text{απορρόφηση control} * 100$$

RSC = radical scavenging capacity

3.6. Reducing power assay

Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη αυτής. Ενώσεις με αναγωγική ισχύ υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι

ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον Fe^{3+} και τον ανάγουν σε Fe^{2+} , ο οποίος όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο προκύπτει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλέ ανάλογα με την αναγωγική ικανότητα της προς εξέταση ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700 nm, τόσο υψηλότερη είναι και η αναγωγική ικανότητα. Αρχικά σε erpendorf 1,5ml προστίθεται το δείγμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση 0.2M και pH 6.6 και 1% w/v Potassium ferricyanide. Έπειτα πραγματοποιείται ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στους 50 °C. Με το τέλος της επώασης προστίθεται 10% w/v Trichloroacetic acid (TCA) και οι αντιδράσεις φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στα 3000 rpm. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης συλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο erpendorf στο οποίο προστίθενται dH_2O και 0.1 % w/v Ferric chloride. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με 10 λεπτή επώαση στη σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 700 nm. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν ενώ μετρήθηκε και η οπτική απορρόφηση χωρίς τη παρουσία δείγματος ώστε να διαπιστωθεί (εάν υπάρχει) η απορρόφηση του δείγματος [61].

Η αναγωγική ικανότητα υπολογίστηκε ως εξής:

$AU_{0,5}$ = απορρόφηση ουσίας - απορρόφηση control

AU = Absorbance Unit

3.7. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των

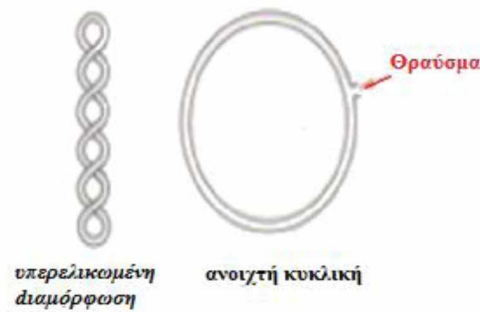
ετεροπολυμερών οξέων ($P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$, $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) μπλε χρώσης που απορροφά στα 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστήριου FC και του προϊόντος της αντίδρασης. Σε erpendorf προστίθεται αρχικά dH_2O , το αντιδραστήριο Folin-Cicalteu και το προς εξέταση δείγμα. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 3 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθεται διάλυμα Na_2CO_3 το οποίο διατηρεί την αλκαλικότητα της αντίδρασης και εκ νέου dH_2O . Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται για 1 ώρα στο σκοτάδι. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάζεται εις τριπλούν. Εξετάζουμε ακόμη και την οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστήριου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάζεται με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250 και 1500 $\mu g/mL$ γαλλικού οξέος. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/g εκχυλίσματος [62].

3.8. Επαγόμενη από ρίζες Περοξυλίου ($ROO\cdot$) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για παρατήρηση της αντιοξειδωτικής/προστατευτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων ή βιοδραστικών ουσιών απέναντι στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες και ένζυμα, πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Βασίζεται στο ότι το πλασμιδιακό DNA έχει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με τον βαθμό υπερελίκωσής του. Οι διαμορφώσεις είναι οι εξής:

✓ **Υπερελικωμένη διαμόρφωση** (Supercoiled conformation): το πλασμιδιακό DNA δεν έχει θραύσματα και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.

✓ **Ανοιχτή κυκλική** (Open circular, relaxed conformation): μεταβαίνει όταν προκαλούνται σε αυτό μονόκλωνα σπασίματα από παράγοντες όπως οι ελεύθερες ρίζες .



✓ **Γραμμική διαμόρφωση** (Linear conformation): δημιουργείται όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Figure 9: Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA

Όσο πιο μικρή είναι η διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης και εμφανίζεται πιο κάτω στο πήκτωμα της αгарόζης. Επομένως η υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτη, δεύτερη η γραμμική και τρίτη η ανοιχτή κυκλική όπως φαίνεται και στην εικόνα .

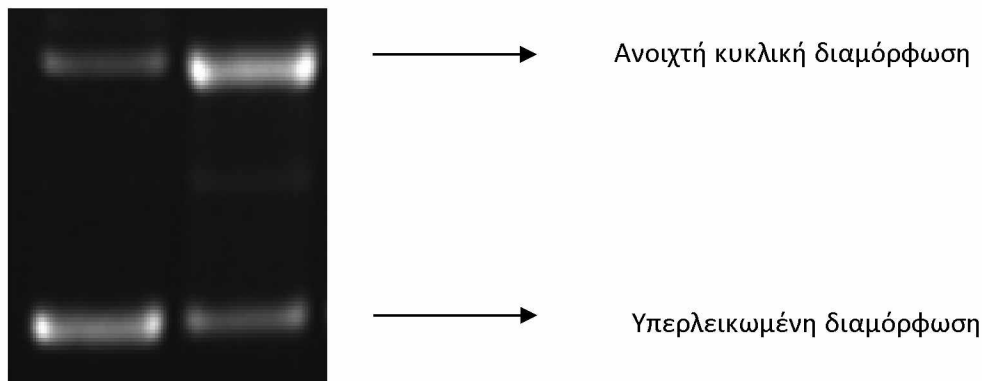


Figure 10: Πηκτή αгарόζης

Η πειραματική διαδικασία ξεκινάει με τη προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο χρησιμοποιείται για τη συσκευή ηλεκτροφόρησης αλλά και τη παρασκευή της πηκτής αгарόζης (πυκνότητας 0,8%). Ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων (PBS, plasmid DNA, AAPH και η

ουσία σε διάφορες συγκεντρώσεις) και η επώασή τους στους 37°C για 45 λεπτά. Με το πέρας της επώασης γίνεται προσθήκη loading buffer και οι αντιδράσεις τοποθετούνται στη πηκτή αγαρόζης. Έπειτα ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 80V για περίπου 1 ώρα. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση γίνεται χρώση της πηκτής με Βρωμιούχο Αιθίδιο για 30 λεπτά και έπειτα πλύση με H₂O για 30 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής. Τέλος, γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων σε ειδικά διαμορφωμένο πρόγραμμα [63].

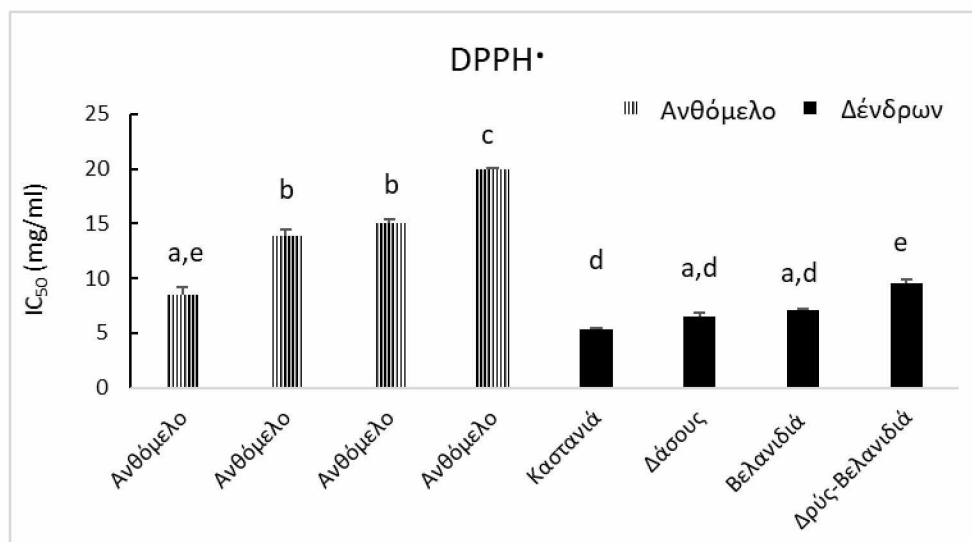
3.9. Στατιστική Ανάλυση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις αναλύθηκαν με το λογισμικό SPSS 20. Πιο συγκεκριμένα έγινε χρήση του test one-way ANOVA. Σε όλες τις αναλύσεις το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν το $p < 0.05$. Όλα τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μέσος όρος \pm SD. Οι μέσοι όροι προέκυψαν από τα αποτελέσματα τριών (3) ανεξάρτητων πειραμάτων.

4. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα για τις μεθόδους που βασίζονται στην αναστολή των ριζών DPPH, ABTS, OH, O₂ και ROO έχουν εκφραστεί σε IC₅₀, στη συγκέντρωση δηλαδή που χρειάζεται το κάθε δείγμα ώστε να εξουδετερώσει την εκάστοτε ρίζα κατά 50%. Τα δείγματα με χαμηλή τιμή IC₅₀ έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η διαφορά στο χρώμα στις στήλες των διαγραμμάτων που ακολουθούν έχει να κάνει με τη διαφορά των φυτών προέλευσης των μελιών. Οι στήλες με τις κάθετες γραμμές αφορούν μέλια που προέρχονται από μέλισσες που έχουν τραφεί κυρίως από πόες και είναι τα λεγόμενα ανθόμελα. Οι μαύρες στήλες αντιστοιχούν σε μέλια των οποίων οι μέλισσες έχουν τραφεί με άνθη δένδρων. Τα γράμματα που τοποθετήθηκαν πάνω από τη κάθε στήλη προέκυψαν από στατιστική ανάλυση (βλέπε κεφάλαιο 3.8). Διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

4.2. Μέθοδος DPPH*

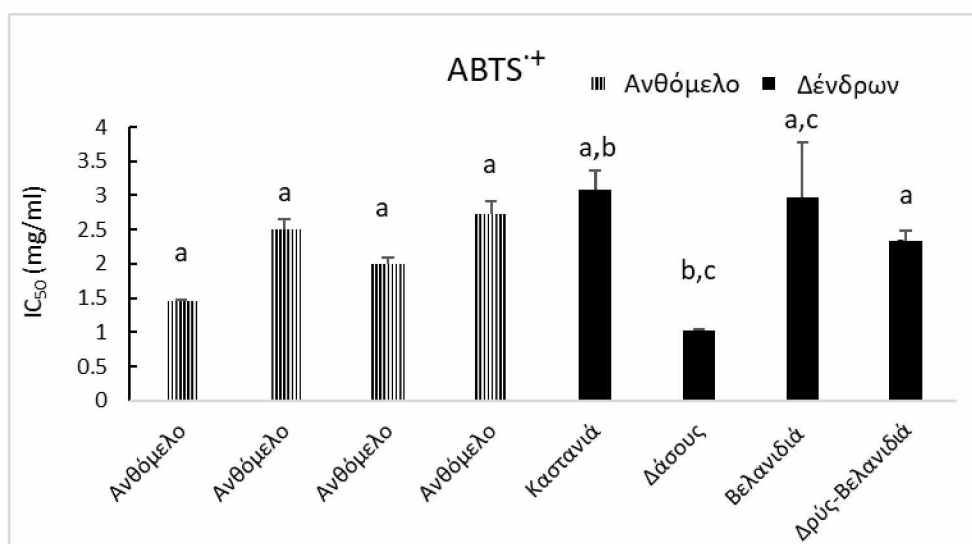


Διάγραμμα 1: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας DPPH. a-d: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Στο Διαγράμμα 1 απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του DPPH από τα 8 μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (25, 12.5, 6.25, 3.125 και 1.56 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀ τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Καστανιάς είναι εκείνο με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα χωρίς να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τα δείγματα Δάσους και Βελανιδιάς. Παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση των δειγμάτων ανάμεσα στις 2 κατηγορίες αλλά και εσωτερικά στη κατηγορία των ανθόμελων, καθώς το εύρος διακύμανσης των τιμών IC₅₀ διακυμάνθηκε από τα 5,38 έως τα 19,95 mg/ml.

4.3. Μέθοδος ABTS

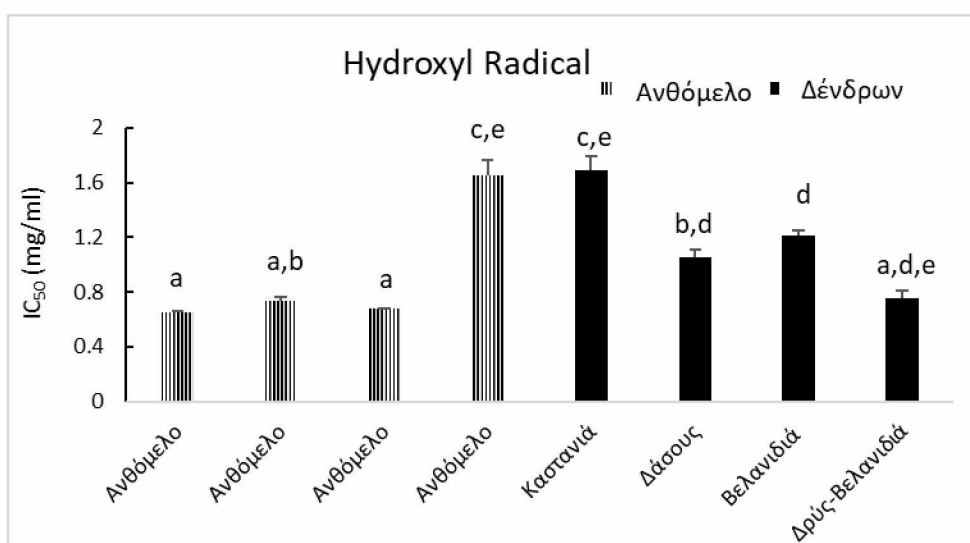


Διάγραμμα 2: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας ABTS. a-c: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Στο Διαγράμμα 2 απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του ABTS από τα 8 μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (6.25, 3.125, 1.56 0.78 και 0.39 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀ τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Δάσους είναι

εκείνο με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε αυτή τη μέθοδο τα μέλια δεν έχουν διαφοροποιηθεί έντονα μεταξύ τους αφού οι τιμές IC_{50} διακυμάνθηκαν από 1 έως 3 mg/ml.

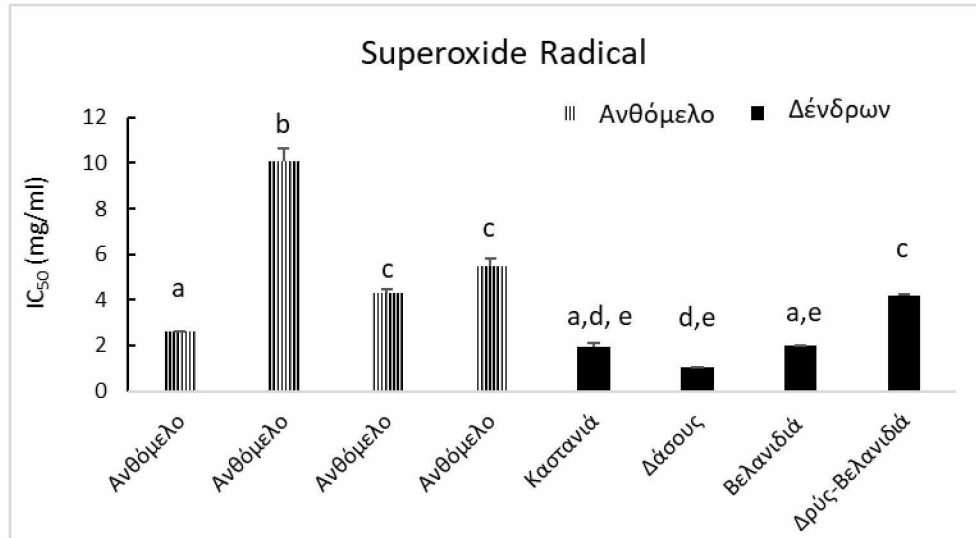
4.4. Μέθοδος Hydroxyl Radical



Διάγραμμα 3: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας OH. a-e: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Στο Διαγράμμα 3 απεικονίζονται οι τιμές IC_{50} που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του OH από τα 8 μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (3.125, 1.56, 0.78, 0.39 και 0.19 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC_{50} τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από αυτό το διάγραμμα προκύπτει ότι τα τρία πρώτα ανθόμελα (αριστερά προς τα δεξιά του διαγράμματος) καθώς και το μέλι από δρυ-βελανιδιά, έχουν τις χαμηλότερες τιμές IC_{50} , άρα και την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Το εύρος των τιμών IC_{50} είναι πιο περιορισμένο συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους, αφού διακυμάνθηκε από 0,65 έως 1,69 mg/ml.

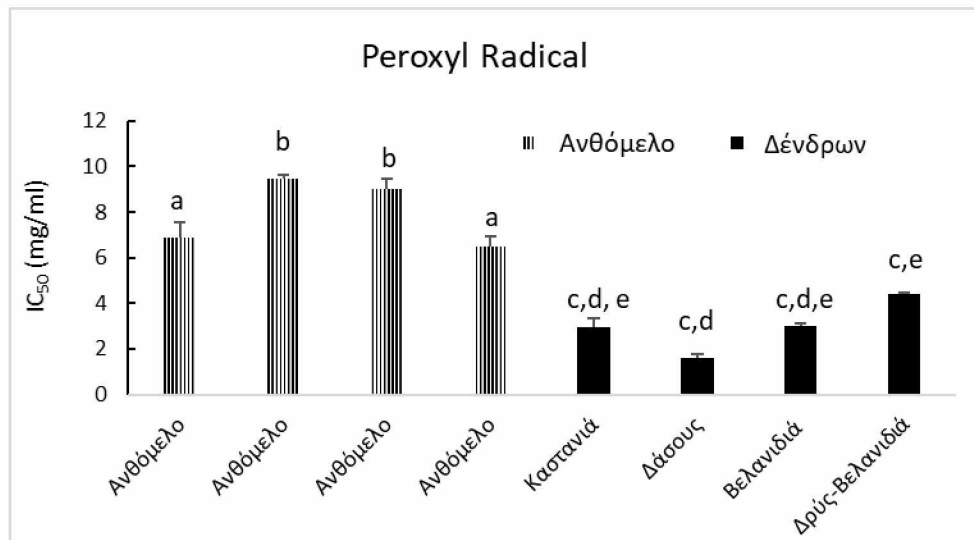
4.5. Μέθοδος Superoxide Radical



Διάγραμμα 4: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας αναστολής της ρίζας O₂. a-e: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (p<0,05).

Στο Διαγράμμα 4 απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του O₂ από τα 8 μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (12.5, 6.25, 3.125, 1.56 και 0.78 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀ τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Δάσους είναι εκείνο με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα χωρίς να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τα δείγματα Καστανιάς. Παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση των δειγμάτων ανάμεσα στις 2 κατηγορίες αλλά και εσωτερικά στη κατηγορία των ανθόμελων, καθώς το εύρος διακύμανσης των τιμών IC₅₀ διακυμάνθηκε από τα 1,015 έως τα 10,10 mg/ml.

4.6. Η επαγόμενη από τις ρίζες Περοξυλίου (ROO•) πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων σε πλασμιδιακό DNA

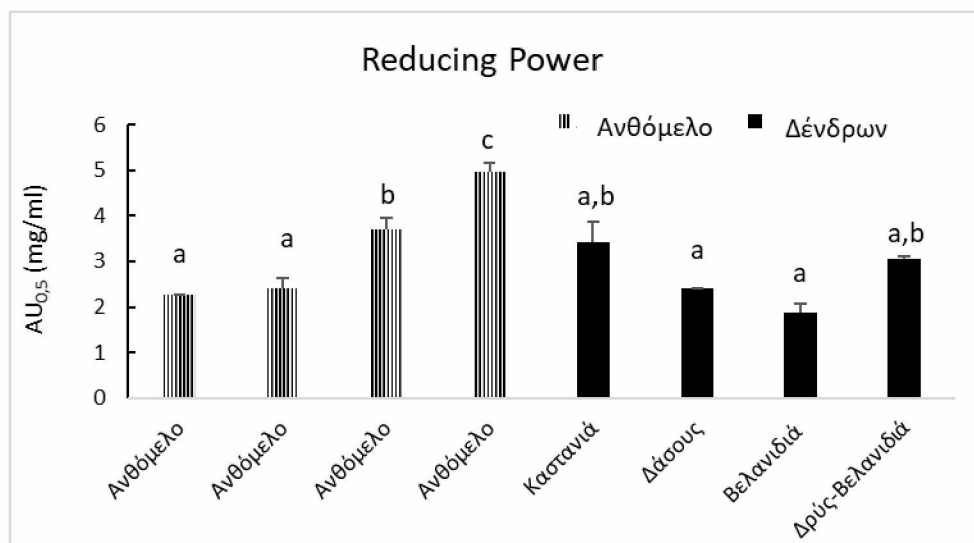


Διάγραμμα 5: Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μελιών μέσω της ικανότητας προστασίας του πλασμιδιακού DNA από την επαγόμενη από ρίζες περοξυλίου πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. α-ε: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Στο Διαγράμμα 5 απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ που αντιστοιχούν στην εξουδετέρωση της ρίζας του ROO από τα 8 μέλια της μελέτης. Η τιμή αυτή προέκυψε από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για τη πειραματική διαδικασία έγινε χρήση 5 συγκεντρώσεων για το κάθε δείγμα (12.5, 6.25, 3.125, 1.56 και 0.78 mg/ml). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω όσο χαμηλότερη η τιμή IC₅₀ τόσο υψηλότερη η αντιοξειδωτική ικανότητα. Από το διάγραμμα προκύπτει ότι το μέλι Δάσους είναι εκείνο με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα χωρίς να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τα δείγματα Καστανιάς και Βελανιδιάς. Παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση των δειγμάτων ανάμεσα στις 2 κατηγορίες αλλά και εσωτερικά στη κατηγορία των ανθόμελων, καθώς το εύρος διακύμανσης των τιμών IC₅₀ είναι από τα 1.6 έως τα 9.48 mg/ml.

4.7. Μέθοδος Reducing Power

Τα αποτελέσματα για τη μέθοδο προσδιορισμού της αναγωγικής ικανότητας έχουν εκφραστεί σε $AU_{0,5}$, στη συγκέντρωση δηλαδή που χρειάζεται το κάθε δείγμα ώστε να έχει απορρόφηση 0,5 στα 700nm. Τα δείγματα με χαμηλή τιμή $AU_{0,5}$ έχουν υψηλότερη αναγωγική ικανότητα. Η διαφορά στο χρώμα στις στήλες του διαγράμματος έχει να κάνει με τη διαφορά των φυτών προέλευσης των μελιών. Οι στήλες με τις κάθετες γραμμές αφορούν μέλια που προέρχονται από μέλισσες που έχουν τραφεί κυρίως από πόες και είναι τα λεγόμενα ανθόμελα. Οι μαύρες στήλες αντιστοιχούν σε μέλια των οποίων οι μέλισσες έχουν τραφεί με άνθη δένδρων. Τα γράμματα που τοποθετήθηκαν πάνω από τη κάθε στήλη προέκυψαν από στατιστική ανάλυση (βλέπε κεφάλαιο 3.8). Διαφορετικό γράμμα δηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



Διάγραμμα 6: Μέτρηση αναγωγικής ικανότητας μελιών μέσω της μεθόδου Reducing Power. a-c: τα εκχυλίσματα με διαφορετικό γράμμα έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα σχετίζεται άμεσα με την αναγωγική δύναμη. Όσο μικρότερο είναι το $AU_{0,5}$ μίας ουσίας τόσο υψηλότερη είναι και η αναγωγική της δύναμη, άρα τόσο μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα θα παρουσιάσει. Στο Διάγραμμα 6 παρατηρούμε ότι την χαμηλότερη τιμή $AU_{0,5}$ παρουσιάζει το μέλι βελανιδιάς, οπότε είναι και το ισχυρότερο χωρίς όμως να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τα υπόλοιπα μέλια της κατηγορίας του. Το ανθόμελο 4

που διαφέρει σημαντικά από όλα τα μέλια του διαγράμματος 6, έχει την υψηλότερη τιμή AU_{0,5} άρα είναι το πιο ασθενές.

4.8. Μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC)

Δείγμα	mg GAE/g μελιού
Ανθόμελο	0.895
Ανθόμελο	0.944
Ανθόμελο	0.861
Ανθόμελο	0.853
Καστανιάς	0.920
Δάσους	1.317
Βελανιδιά	1.318
Δρυς-Βελανιδιά	0.920

Table 5: Αποτελέσματα μετρήσεων Folin-Ciocalteu

Ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των δειγμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα δείγματα μπορεί να χρειάζονται αραίωση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό δείγμα και εκφράζεται ως mg GAE (Gallic Acid Equivalents)/g δείγματος.

Στον Πίνακα 5 παρατηρούμε ότι το μέλι δάσους και το μέλι καστανιάς είναι αυτά που παρουσιάζουν το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Τα υπόλοιπα διακυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα.

5. Συζήτηση

Μέθοδος	Folin-Ciocalteu	DPPH	ABTS	Hydroxyl Radical	Superoxide Radical	Peroxyl Radical	Reducing Power
Μονάδες Δείγμα	mg GAE/g	IC ₅₀ (mg/ml)					AU _{0,5} (mg/ml)
Ανθόμελο	0.895	8.48±0.69	1.45±0.02	0.65±0.005	2.63±0.004	6.86±0.68	2.28±0.005
Ανθόμελο	0.944	13.87±0.63	2.51±0.15	0.73±0.025	10.10±0.51	9.48±0.17	2.40±0.225
Ανθόμελο	0.861	15.04±0.3	1.99±0.1	0.68±0	4.32±0.14	9.02±0.41	3.71±0.245
Ανθόμελο	0.853	19.95±0.16	2.74±0.18	1.65±0.11	5.46±0.35	6.5±0.41	4.97±0.18
Καστανιάς	0.920	5.38±0.05	3.09±0.27	1.69±0.1	1.925±0.15	2.97±0.35	3.43±0.435
Δάσους	1.317	6.52±0.32	1.03±0.014	1.05±0.06	1.015±0.01	1.6±0.17	2.41±0.015
Βελανιδιά	1.318	7.14±0.02	2.97±0.8	1.21±0.035	1.98±0.044	2.98±0.11	1.87±0.195
Δρυς-Βελανιδιά	0.920	9.59±0.28	2.33±0.15	0.755±0.05	4.18±0.05	4.43±0.05	3.05±0.065

Table 6: Συγκενρωτικά αποτελέσματα της μελέτης

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα 8 διαφορετικών μελιών, εκ των οποίων τα 4 ήταν μέλια ανθέων ενώ τα υπόλοιπα ήταν μέλια δένδρων (δρυς-βελανιδιά, δάσους, καστανιάς, βελανιδιάς), και συλλέχθηκαν από την ευρύτερη περιοχή της Πίνδου. Σκοπός της διατριβής είναι να γίνει επέκταση της γνώσης από θεωρητικό και εμπειρικό επίπεδο σε βαθύτερη εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του πολυφαινολικού χαρακτήρα στα μέλια που παράγονται στην περιοχή της Πίνδου.

Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μελιού με τις μεθόδους DPPH, ABTS, Hydroxyl Radical, Superoxide Radical, Peroxyl Radical και Reducing

Power assay. Επιπλέον, για την εκτίμηση του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου έγινε χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC).

Στη μέθοδο που αφορά την εξουδετέρωση της ρίζας DPPH παρατηρήθηκε ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα στο μέλι της καστανιάς, με το μέλι του δάσους και της βελανιδιάς να μην παρουσιάζουν σημαντική διαφορά από εκείνο της καστανιάς. Τα μέλια ανθέων παρουσίασαν υψηλότερες τιμές IC_{50} , γεγονός το οποίο δείχνει ότι η αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι μικρότερη από αυτή των δένδρων. Στη μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS παρατηρείται μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στο μέλι δάσους, ενώ όπως και στη μέθοδο DPPH τα υπόλοιπα μέλια των δένδρων που ελέγχθηκαν δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Σε αυτήν την περίπτωση οι τιμές IC_{50} των μελιών ανθέων δεν διαφέρουν πολύ από τις τιμές του μελιού του δάσους και των υπολοίπων δένδρων.

Στη μέθοδο Hydroxyl Radical παρατηρείται ότι τα πρώτα 3 ανθόμελα καθώς και το μέλι δρυς-βελανιδιά παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές IC_{50} , οπότε τα συγκεκριμένα μέλια είναι αυτά με την υψηλότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζα υδροξυλίου. Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων με τη μέθοδο Superoxide Radical και τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι το δείγμα του μελιού δάσους παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλια της μελέτης. Πιο συγκεκριμένα τα μέλια που προέρχονται από άνθη δένδρων παρουσίασαν συνολικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα μέλια ανθέων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη μέθοδο Peroxyl Radical, η οποία δεν είναι φωτομετρική μέθοδος όπως οι προηγούμενες, αλλά μέθοδος που ανιχνεύει την ικανότητα του δείγματος να προστατεύει το DNA από θραύσματα που έχουν προκληθεί από ρίζες περοξυλίου. Ειδικότερα, το μέλι δάσους είναι εκείνο που παρουσίασε τη χαμηλότερη τιμή IC_{50} και άρα την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Και σε αυτή τη μέθοδο τα μέλια προερχόμενα από δένδρα παρουσίασαν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα συγκριτικά με τα μέλια ανθέων.

Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η αναγωγική ικανότητα των 8 δειγμάτων μελιού μέσω της μεθόδου Reducing Power, από την οποία προέκυψε ότι το μέλι βελανιδιάς, είναι εκείνο με την υψηλότερη αναγωγική ισχύ ενώ το 4^ο ανθόμελο είναι το πιο ασθενές. Τα υπόλοιπα μέλια της μελέτης δε παρουσίασαν κάποια στατιστικώς σημαντική μεταβολή. Η αναγωγική ισχύς συνδέεται με την

αντιοξειδωτική δράση αφού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ενώσεις που έχουν την ικανότητα να ανάγουν το τρισθενή σίδηρο σε δισθενή έχουν και αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος και έχοντας υπόψιν ότι ο πολυφαινολικός χαρακτήρας των μελιών είναι πολύ σημαντικός δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις πολυφαινόλες που περιέχουν, έγινε προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου τους με τη μέθοδο FC. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μέθοδο αυτή, έδειξαν ότι το μέλι του δάσους και της βελανιδιάς είναι εκείνα με το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο και άρα αυτά με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα [65]. Αυτό φαίνεται ότι συμφωνεί με τα αποτελέσματα από την εκπόνηση των υπόλοιπων μεθόδων στην συγκεκριμένη διπλωματική διατριβή, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις τα μέλια που παρουσίασαν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ήταν και αυτά με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο έχει απασχολήσει πλειάδα επιστημόνων παγκοσμίως και έχει γίνει αντικείμενο μελέτης για πληθώρα επιστημονικών ερευνών. Σε έρευνα που έγινε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο από διάφορες ποικιλίες μελιών χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι αναστολής των ριζών DPPH και ABTS και του αντιδραστηρίου FC. Από τη μελέτη αυτή, προέκυψε ότι τις χαμηλότερες τιμές IC_{50} καθώς και το υψηλότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν μέλια που είχαν σαν βιολογική πηγή τη μέντα, κάποια βότανα και το δέντρο ακακία και όχι τα μέλια των ανθέων, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία [13].

Σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε Πανεπιστήμιο της Τουρκίας με σκοπό την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων ποικιλιών μελιού από όλη τη χώρα προέκυψαν εξίσου ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, φάνηκε ότι σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση και το πολυφαινολικό περιεχόμενο μελιών, παίζει το χρώμα τους. Συγκεκριμένα, τα μέλια από καστανιά και ευκάλυπτο που είχαν πιο σκούρο χρώμα, είχαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και πολυφαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με πιο ανοιχτόχρωμα από δενδρολίβανο και πορτοκάλι. Αυτές οι ιδιότητές τους συσχετίστηκαν επίσης σημαντικά και με την αντίστοιχη αναγωγική τους δύναμη [52]. Αυτά τα ευρήματα συμπίπτουν και με την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, αφού σκούρα μέλια, όπως του δάσους και της βελανιδιάς παρουσίασαν συνολικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα πιο

ανοιχτόχρωμα (μέλια ανθέων). Επιπλέον, οι Estevinho et. al. σε μελέτη που έλαβε χώρα στο Πανεπιστήμιο της Μπραγκάντζας της Πορτογαλίας και αφορούσε δείγματα από τοπικά μέλια, σχολίασαν ότι τα σκούρα παρουσιάζουν αναστολή της ρίζας DPPH πάνω από 70%, σε αντίθεση με τα ανοιχτόχρωμα, που η αναστολή τους είναι κάτω από 40% [53]. Το μέλι καστανιάς (όπως και τα υπόλοιπα μέλια της μελέτης που προήλθαν από δένδρα) έχει αρκετά πιο σκούρα απόχρωση συγκριτικά με τα υπόλοιπα.

Μελέτη που ασχολήθηκε με τη διερεύνηση της ικανότητας δειγμάτων μελιού να αναστέλλουν τη ρίζα DPPH απέδειξε ότι ισχυρότερη ικανότητα αναστολής παρουσίασαν μέλια που προέρχονται από δένδρα, με κυριότερο την πεύκη [54]. Ο ισχυρισμός αυτός συμφωνεί με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης αφού στην ίδια μέθοδο τα δείγματα μελιού που προέρχονται από δένδρα παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, αφού η τιμή IC₅₀ τους είναι χαμηλότερη από εκείνη των ανθόμελων. Την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην εν λόγω μέθοδο παρουσίασε το μέλι καστανιάς.

Η εκτίμηση της αναγωγικής ικανότητας ενός προϊόντος γίνεται μέσω της μεθόδου Reducing Power, όπου προσδιορίζεται η ικανότητά του να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή. Από τη μελέτη των Gul et al., μεγαλύτερη ικανότητα αναγωγής εμφάνισαν τα πιο σκούρα μέλια σε σχέση με τα ανοιχτόχρωμα [52]. Σε έτερη μελέτη παρουσιάζεται ότι το δέντρο καστανιά έχει την μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα της μελέτης, όπως το λάιμ, το πεύκο και η ακακία. Παρόμοια εικόνα είχαν και τα μέλια της παρούσας έρευνας, όπου το μέλι καστανιάς δείχνει να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή απαιτώντας μικρότερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα της παρούσας μελέτης [55].

Σε μελέτη που διεξήχθη στο τμήμα Ιατρικής σε Πανεπιστήμιο στο Κέλανταν της Μαλαισίας ελήφθησαν δείγματα μελιών που είχαν ως βιολογική πηγή τροπικά φυτά και δένδρα της νοτιοανατολικής Ασίας (gelam, ένα είδος μυρτιάς, tualang, ένα από τα ψηλότερα τροπικά δένδρα που ανήκει στην οικογένεια Fabaceae και ανανάς) και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Superoxide Radical. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη, παρουσιάζουν ομοιότητες με την παρούσα εργασία. Σύμφωνα με την εν λόγω μελέτη, το μέλι που προέρχεται από το δένδρο tualang παρουσιάζει υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα υπόλοιπα δείγματα μελιών και αυτό είναι μία συνθήκη που ισχύει ίσως λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης σε φλαβονοειδή [56]. Ο ισχυρισμός αυτός συμφωνεί με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης αφού στην ίδια μέθοδο τα

δείγματα μελιού που προέρχονται από δένδρα παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, από εκείνη των ανθόμελων, αφού η τιμή IC₅₀ τους είναι χαμηλότερη.

Σε πρόσφατη μελέτη του 2021 που πραγματοποιήθηκε στη Βοσνία-Ερζεγοβίνη στα τμήματα Χημείας και Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Σαράγιεβο από δείγματα μελιών από όλη τη χώρα εκτιμήθηκε το αντιοξειδωτικό «σκορ» έναντι ριζών υδροξυλίου και περοξυλίου. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα δείγματα των μελιών που συλλέχθηκαν από τα δένδρα του δάσους και τα δένδρα των βουνών παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα υπόλοιπα δείγματα, που έχουν σαν βιολογική πηγή διάφορα φυτά λιβαδιού, καλούνα (heather) και καστανιά [64]. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνάδουν με αυτά της ανωτέρω δημοσίευσης για τις μεθόδους Hydroxyl και Superoxide radical, αφού τα μέλια από δένδρα (καστανιά, βελανιδιά κλπ) είναι αυτά που είχαν τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης αυτών των ριζών, σε σχέση με αυτά των άνθεων.

Τελικώς και με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης καταλήγουμε ότι τα μέλια που προέρχονται από τα δένδρα είναι και τα πιο δραστικά, αυτά δηλαδή με τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Τονίζεται επίσης ότι αυτή η μελέτη τόσων μεθόδων που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα ενός είδους και στην συγκεκριμένη περίπτωση του μελιού, αποτελεί μία ολιστική και πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση του αντιοξειδωτικού προφίλ του μελετώμενου προϊόντος. Εν κατακλείδι, θα μπορούσαν να διεξαχθούν επιπλέον μελέτες που να αφορούν περισσότερες περιοχές από τις οποίες συλλέγονται μέλια, ώστε να διευρυνθεί το γνωστικό επίπεδο, σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, την αναγωγική δύναμη καθώς και το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο των μελιών. Αυτό θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για το μέλι, αφού είναι από τις πιο πλούσιες διατροφικές πηγές για τον άνθρωπο και χρησιμοποιείται κατά κόρον στην καθημερινή διατροφή χιλιάδων ανθρώπων. Παράλληλα θα μπορούσαν να γίνουν περαιτέρω μελέτες σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας και πως αυτές συμπεριφέρονται σε διαφορετικές περιοχές. Όλες αυτές οι πληροφορίες θα μπορούσαν να εμπλουτίσουν τις γνώσεις και να «οπλίσουν» τους επιστήμονες και τους παραγωγούς έτσι ώστε να υπάρξει ένα τελικό προϊόν με μεγαλύτερη προστιθέμενη αξία.

6. Βιβλιογραφία

1. Sultan Ayoub Meo, Saleh Ahmad Al-Asiri, Abdul Latief Mahesar, and Mohammad Javed Ansarid, Role of honey in modern medicine, Published online 2016 Dec 24. Saudi J Biol Sci. 2017 Jul;24(5):975-978
2. Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P. Honey for nutrition and health: a review., J. Am. Coll. Nutr. 2008;27(6):677–689
3. Cony Gauche, Luciano Valdemiro Gonzaga, Ana Carolina Oliveira Costa, Roseane Fett. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. Priscila Missio da Silva. Food Chem. 2016 Apr 1;196:309-23
4. Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. Food Chemistry, 138, 851–856.
5. Honey: its medicinal property and antibacterial activity
Manisha Deb Mandal¹ and Shyamapada Mandal². Asian Pac J Trop Biomed. 2011 Apr; 1(2): 154–160
6. Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Arch Med Res. 2005;36:464–467.
7. French VM, Cooper RA, Molan PC. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative Staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2005;56:228–231.
8. Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. Sarfraz Ahmed,^{1,2} Siti Amrah Sulaiman,³ Atif Amin Baig,⁴ Muhammad Ibrahim,² Sana Liaqat,² Saira Fatima,² Sadia Jabeen,² Nighat Shamim,² and Nor Hayati Othman Published 18 Jan 2018. Oxid Med Cell Longev. 2018 Jan 18;2018:8367846

9. A. Tonks, R. A. Cooper, A. J. Price, P. C. Molan, and K. P. Jones, "Stimulation of TNF- α release in monocytes by honey," *Cytokine*, vol. 14, no. 4, pp. 240–242, 2001.
10. S. Bogdanov, "Honey as nutrient and functional food: a review," *Bee Product Science*, 2011.
11. T. Koenig and J. L. C. Roh, "Healing wounds with honey," *Undergraduate Research Journal for the Human Sciences*, vol. 15, no. 1, 2016.
12. J. Rückriemen, O. Klemm, and T. Henle, "Manuka honey (*Leptospermum Scoparium*) inhibits Jack bean urease activity due to methylglyoxal and dihydroxyacetone," *Food Chemistry*, vol. 230, pp. 540–546, 2017.
13. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. Authors: Dimitrios Stagos Nikolaos Soulitsiotis Christina Tsadila Stamatina Papaeconomou Charalampos Arvanitis Alexandros Ntontos Fani Karkanta Soutana Adamou-Androulaki Konstantinos Petrotos Demetrios A. Spandidos Demetrios Kouretas Dimitris Mossialos. Published online on: May 4, 2018. *Int J Mol Med*. 2018 Aug;42(2):726-734
14. Küpeli Akkol E, Orhan DD, Gürbüz I and Yesilada E: In vivo activity assessment of a 'honey-bee pollen mix' formulation. *Pharm Biol*. 48:253–259. 2010
15. Πανεπιστημιακό σύγγραμμα Συγχρονη Μελισσοκομία Henri Clement
16. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 1999;13(3):295–309
17. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Free Radical Biology and Medicine. 2015.

18. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 1994 Aug;52(8 Pt 1):253–65.
19. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015 Jan;30(1):11–26.
20. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979 Jul;59(3):527–605.
21. Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. *Δραστηκές ρίζες οξυγόνου*, 26(3), 151–194
22. Robinson JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol.* 2008 Aug;130(2):281–97
23. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016 Mar;148:183–93.
24. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev.* 2013 Jan;12(1):376–90.
25. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol.* 2013;231:290–300.
26. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* 2014 Jun;16(2):217–30.
27. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med.* 2018 Aug;124:420–30.

28. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun;86:715–48.
29. Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications, J Vaya, M Aviram, *Current Medicinal Chemistry/Immunology*, Bentham Science publishers, p: 99-117, 2001
30. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer., Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. *ChemicoBiologicalinteractions*, p: 1–40. 2006
31. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. Poljsak, B. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011
32. SIES H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry.* 1993.
33. Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med.* 2015;
34. Buettner GR. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 May;11(4):341–6.
35. Sea K, Sohn SH, Durazo A, Sheng Y, Shaw BF, Cao X, et al. Insights into the role of the unusual disulfide bond in copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 2015;290(4):2405–18.
36. Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol.* 2000;296(1):295–309.
37. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathionedependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(5):3217–66.

38. Buettner GR. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Feb 1;300(2):535-43
39. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004 Mar;134(3):489-92.
40. Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. Vol. 5 AUG, *Frontiers in Pharmacology*. 2014. *Front Pharmacol* . 2014 Aug 26;5:196
41. Kumar AN. Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant an uncertainty. Aruna P, editor. *Arch Med Rev J*. 2015;24(1):19-40.
42. Lattanzio VMTVVMTV, Lattanzio VMTVVMTV, Cardinali A, Amendola V. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Vol. 661, *Phytochemistry*. 2006. 23-67 p.
43. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*. 2015. Volume 18, Part B, October 2015, Pages 820-897
44. Crozier A, Clifford MN. Terpenes, Plant Secondary Metabolites. *Plant Secondary Metabolites Occurrence , Structure and Role in the Human Diet*. 2006.
45. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2002. *Biotechnol Adv* . 2002 May;20(2):101-53
46. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1231-46.

47. Landete JM. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(7):706–21.
48. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(5):270–8.
49. Landete JM. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(10):936–48.
50. Galinski CN, Zwicker JI, Kennedy DR. Revisiting the mechanistic basis of the French Paradox: Red wine inhibits the activity of protein disulfide isomerase in vitro. *Thromb Res.* 2016; *Thromb Res.* . 2016 Jan;137:169-173
51. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2001. *Am J Clin Nutr.* . 2001 Oct;74(4):418-25
52. Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey AzizGülaTubaPehlivanb *Saudi J Biol Sci.* . 2018 Sep;25(6):1056-1065
53. L. Estevinho, A.P. Pereira, L. Moreira, L.G. Dias, E. Pereira Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey *Food Chem. Toxicol.*, 46 (2008), pp. 3774-3779
54. N. Noor, R.A. Sarfraz, S. Ali, M. Shahid Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys *Food Chem.*, 143 (2014), pp. 362-366, 10.1016/j.foodchem.2013.07.084
55. Z. Can, O. Yildiz, H. Sahin, E. Akyuz Turumtay, S. Silici, S. Kolayli An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles *Food Chem.*, 180 (2015), pp. 133-141

56. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. Author links open overlay panel R. Krishna Kishorea Ahmad Sukari Halima M.S. Nurul Syazanaa K.N.S.Sirajudeenb
57. oreinomeli.wordpress.com/tag/φυτά-στους-πρόποδες-της-πίνδου
58. Prediction of Antioxidant Activity of Cherry Fruits from UAS Multispectral Imagery using Machine Learning. Christos Karydas, Miltiadis Iatrou, Dimitrios Kouretas, Anastasia Patouna, George Iatrou, Nikolaos Lazos, Sandra Gewehr, Xanthi Tseni, Fotis Tekos, Zois Zartaloudis, Evangelos Mainos, Spiros Mourelatos. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Feb 14;9(2):156
59. Olive tree blossom polyphenolic extracts exert antioxidant and antimutagenic activities in vitro and in various cell lines. Paraskevi Kouka, Fotios Tekos, Kalliopi Valta, Panagiotis Mavros, Aristidis S Veskoukis, Apostolis Angelis, Alexios-Leandros Skaltsounis, Demetrios Kouretas. *Oncol Rep*. 2019 Dec;42(6):2814-2825
60. *In Vivo* . May-Jun 1999;13(3):295-309. Lipid peroxidation and tissue damage. C Mylonas, D Kouretas
61. *Food Chem Toxicol*. 2020 Nov;145. Interplay between oxidative damage, the redox status, and metabolic biomarkers during long-term fasting. Franziska Grundler, Robin Mesnage, Nikolaos Goutzourelas, Fotios Tekos, Sotiria Makri, Michel Brack, Demetrios Kouretas, Françoise Wilhelmi de Toledo.
62. *Acta Chim Slov*. 2017 Jun;64(2):491-499. The Methodology Applied in DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu Assays Has a Large Influence on the Determined Antioxidant Potential. Helena Abramovič, Blaž Grobin, Nataša Poklar Ulrih, Blaž Cigić
63. *Anticancer Res*. 2020 Apr;40(4):2025-2032. Grape Stem Extracts From Three Native Greek Vine Varieties Exhibit Strong Antioxidant and Antimutagenic Properties. Aristidis S Veskoukis, Eleni Vassi, Konstantinos Poulas, Manolis Kokkinakis, Eftihia Asprodinis, Serkos Haroutounian, Demetrios Kouretas.
64. Hydrophilic antioxidant scores against hydroxyl and peroxy radicals in honey samples from Bosnia and Herzegovina. Ismet Tahirović, Dženita Helbet, Adisa Gaštan, Nermin

Buza, Muamer Dizdar, Anela Topčagić, Jasmin Toromanović, Amira Čopra-Janićijević, Harun Kurtagić. 15 March 2017. CMBEBIH 2017 pp 429-434 DOI: 10.1007/978-981-10-4166-2_66

65. Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M., & Amir, R. (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9559-9570.