



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

«Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων ελληνικού μελιού»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

ΠΑΠΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021

«Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων ελληνικού μελιού»

«Honey antioxidant capacity of Greek honey samples»

Τριμελής Επιτροπή:

- **Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (*Επιβλέπων*).
- **Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Δημήτριος Μόσιαλος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Στις ανιψιές μου, Χαρά & Αγγελική.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα καθηγητή αυτής της εργασίας, κ. Δημήτριο Στάγκο για την κατανόησή και τη βοήθειά του καθώς και τη διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τους κ. Δημήτριο Κουρέτα και Δημήτριο Μόσιαλο, μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Μαρία Κούρτη για την άμεση βοήθεια της κυρίως κατά την διεξαγωγή του πειράματος αυτής της εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ ειλικρινά όλους τους φίλους και τους συμφοιτητές μου παλιούς και νέους για την υποστήριξη και κατανόηση τους.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου για την απεριόριστη συμπαράσταση και στήριξη τους καθώς και την οικονομική υποστήριξη όλα τα χρόνια της φοίτησης μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Ελεύθερες ρίζες	10
1.1.1 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.....	10
1.2 Αντιοξειδωτικά.....	11
1.2.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	12
1.2.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	13
1.3 Οξειδωτικό στρες	15
1.4 Μέλι.....	16
1.4.1 Σχηματισμός μελιού	16
1.4.2 Σύσταση και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιού	17
1.4.3 Συστατικά μελιού	18
1.4.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες μελιού	19
1.4.5 Κυριότερα είδη μελιού	21
1.4.6 Διατροφική αξία μελιού	23
1.4.7 Ευεργετικές δράσεις μελιού στον άνθρωπο	23
1.5 Σκοπός.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Εκχυλίσματα.....	26
2.2 Αντιδραστήρια.....	27
2.3 Μέθοδοι Εκτίμησης Αντιοξειδωτικής Ικανότητας.....	27
2.3.1 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•	27
2.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ^{•+}	29
2.4 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	32
2.5 Στατιστική Ανάλυση	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα DPPH•	35
3.2. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μέσω της αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS ^{•+}	45
3.3. Εκτίμηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin Ciocalteu.....	56

3.4. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών των μεθόδων DPPH•, ABTS•+ και FOLIN.	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη των αντιοξειδωτικών μορίων παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που αλληλεπιδρούν και εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών. Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που απαντώνται σε τροφές φυτικής κυρίως προέλευσης. Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ελληνικών δειγμάτων μελιού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 18 δείγματα μελιού και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH• και ABTS^{•+}. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον προσδιορισμό του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων. Αναλυτικότερα, το δείγμα μελιού 7 (Βελανιδιά, Εύβοια) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης τόσο με την ελεύθερη ρίζα DPPH• όσο και με την ελεύθερη ρίζα ABTS^{•+} και ταυτόχρονα παρουσίασε το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Από την άλλη πλευρά, το μέλι 13 (Θυμάρι, Γκίωνα, Δελφοί) παρουσίασε τη μικρότερη δράση απέναντι στις ελεύθερες ρίζες DPPH• και ABTS^{•+} και το μικρότερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Σύμφωνα με τη παρούσα μελέτη, η αντιοξειδωτική δράση των μελιών και η φαινολική περιεκτικότητα μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη φυτική προέλευση, τη γεωγραφική προέλευση, την υγρασία, τη θερμοκρασία, το κλίμα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Λέξεις-κλειδιά: μέλι, ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά, πολυφαινολικό περιεχόμενο.

ABSTRACT

Studies on antioxidant molecules have been of great interest in recent years. Antioxidants are molecules that interact and eliminate free radicals. The production of free radicals results in the appearance of oxidative stress. Oxidative stress relates with the appearance of various degenerative diseases. Furthermore, antioxidants are molecules that can be found mainly in plant originated alimentation. In this framework, in the present study an attempt was made to assess the antioxidant capacity of Greek honey samples. Specifically, 18 honey samples were studied and the antioxidant capacity of the extracts was tested by the methods DPPH• and ABTS•+. In addition, experiments were carried out to determine the total polyphenolic content of the samples. In detail, the honey sample 7 (Oak, Euboea) showed the highest ability to interact with both the DPPH• and ABTS•+ free radicals and at the same time showed the highest polyphenolic content. On the other side, honey 13 (Thume, Giona, Delphi) showed the lowest activity against DPPH- and ABTS•+ free radicals and the lowest polyphenolic content. According to the present study, the antioxidant activity of honeys and the phenolic content may vary depending on plant origin, geographical origin, humidity, temperature, climate and environmental conditions.

Keywords: honey, free radicals, antioxidants , polyphenolic content.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα καλείται ένα άτομο ή ένα μόριο, το οποίο φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα (Gilbert, 2000, Halliwell & Gutteridge, 1989).

Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους άλλα και με άλλα μόρια που δεν είναι ρίζες. Όταν μια ελεύθερη ρίζα αντιδρά με μια άλλη ελεύθερη ρίζα, δηλαδή όταν αντιδρούν μεταξύ τους, πραγματοποιείται παραγωγή μιας μη ρίζας. Από την άλλη πλευρά, όταν μια ελεύθερη ρίζα αντιδρά με μια μη ρίζα, παραδείγματος χάρη βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες) πραγματοποιείται παραγωγή νέων ριζών, αυτές με τη σειρά τους μπορούν να αντιδράσουν με άλλες ρίζες ή μόρια και η διαδικασία αυτή να συνεχίζεται (Halliwell & Gutteridge, 1990, Cammac, 1987, Wilson, 1978). Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιφέρει δυσμενείς επιδράσεις στον οργανισμό (Cheeseman & Slater, 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες ως μόρια χαρακτηρίζονται ασταθή και πολύ δραστικά αφού προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Keles et. al, 2001). Ο χρόνος ζωής τους είναι πολύ μικρός (Δημητριάδου, 2017) Επιπλέον, η παραγωγή τους γίνεται από μεταφορά ηλεκτρονίου, ενεργεία που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater, 1993).

1.1.1 Σχηματισμός ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν παραπροϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κύτταρου και παράγονται από διάφορες εσωτερικές λειτουργίες του σώματος που καλούνται ενδοκυτταρικές πηγές. Επιπλέον, παράγονται όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα τοξικότητας που καλούνται εξωκυτταρικές πηγές. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια και κατά επ' έκταση σε κυτταρικές λειτουργίες.

Παραδείγματα ελεύθερων ριζών που απαντώνται στο οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH^\bullet), του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet), του αλκοξυλίου (RO^\bullet), του υδροπεροξυλίου (HO_2^\bullet), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet) και οι θειούχες ρίζες (RS^\bullet).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δραστικές μορφές οξυγόνου. Με τον όρο αυτό καλούνται οι ενώσεις 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 & Slater, 1993, Gutteridge, 1995). Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα παράγωγα του οξυγόνου καθώς και οι ρίζες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου.

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ ($HOBr$)
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	ονήρες Οξυγόνο (1O_2)

1.2 Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό καλείται οποιαδήποτε ένωση που απαντώνται σε μικρότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνει και είναι σε θέση να εμποδίζει ή να επιβραδύνει σημαντικά την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell, 2001). Ο ρόλος τους στον οργανισμό είναι η αποφυγή της βλάβης του κυττάρου από τις ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Γιαννακοπούλου, 2009). Η προέλευση τους είναι τόσο ενδογενούς, από τον ίδιο τον οργανισμό, όσο και εξωγενούς, κατά κύριο λόγο από τη διατροφή (Marketal, 1998).

Η δράση των αντιοξειδωτικών εντοπίζεται στον περιορισμό σχηματισμού ελεύθερων ριζών καθώς και στον εμποδισμό οξείδωσης ευαίσθητων βιολογικών μορίων από ελεύθερες ρίζες (Scalbert et. al, 2005). Δηλαδή, τα αντιοξειδωτικά δίνουν το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο στις ελεύθερες ρίζες και με αυτό τον τρόπο εμποδίζουν τη δράση τους (Halliwell B, 2001).

Τα αντιοξειδωτικά κατατάσσονται στα ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Η δράση τους πραγματοποιείται με τους ακόλουθους τρόπους (Σαμαράς, 2018):

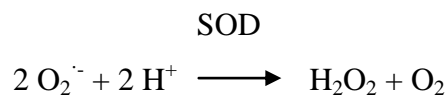
1. Παρεμποδίζουν το σχηματισμό ριζών.
2. Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια.
3. Επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

1.2.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι αυτά τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικές μορφές μέσω δέσμευσης ελεύθερων ριζών ή μείωση της παραγωγής τους (Lubrano & Balzan, 2015). Τα σημαντικότερα ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT) η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) (Halliwell & Gutteridge 1998).

Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

Η δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) ανακαλύφθηκε από τους McCord και Fridovich (McCord & Fridovichin, 1969). Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση υπάρχει σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 και οξυγόνο, σύμφωνα με τη παρακάτω αντίδραση.



Υπάρχει σε τρεις μορφές, την κυτταροπλασματική που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), τη μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό της κέντρο (MnSOD) και την εξοκυτταρική (Halliwell & Gutteridge, 1998, Michiels et. al., 1994).

Η παραγωγή του $O_2^{\cdot -}$ γίνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυικά κύτταρα (Powers & Lennon 2000). Η SOD χαρακτηρίζεται ως ένζυμο της πρώτης γραμμής άμυνας απέναντι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Michiels et. al., 1994).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 , σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

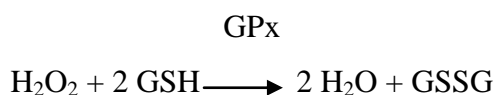


Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδοσώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα.. Τα υπεροξειδοσώματα χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την αποβολή τοξικών ενώσεων με αποτέλεσμα την παραγωγή H_2O_2 (Antunes et. al.,

2002). Επίσης, εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ σε μεγάλη συγκέντρωση (Chance et. al., 1986, Masters et. al., 1986).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) μετατρέπει του H₂O₂ σε H₂O και O₂ χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et. al., 2002).



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η γλουταθειόνη υπάρχει στην ανηγμένη μορφή (GSH) και στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) στα κύτταρα (Meister & Anderson, 1983). Η GSSG μετά το σχηματισμό της από την GPx ανάγεται σε GSH μέσω της δράσης του ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Αύξηση της ενδοκυτταρικής GSSG οφείλεται στην αποικοδόμηση του H₂O₂ από την GPx. Επίσης, μια μικρή αύξηση στην οξείδωση της GSH μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της GSSG (Cotgreave et al., 1988).

1.2.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Είναι ένα ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό και συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτικές βλάβες (Scholz RW et. al, 1989). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη μορφή (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH) και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή κατέχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες άφου συμμετέχει σε αντιδράσεις που ειπώθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998). Αξίζει να αναφερθεί ότι ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται σαν δείκτης παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες (Harris & Hansen, 2012).

Επιπλέον, η γλουταθειόνη συμμετέχει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών του κυττάρου (βιταμίνη C, βιταμίνη E), συμβάλλει με αυτό τον τρόπο στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών (Παπαγεωργίου, 2005). Ένα επιπρόσθετο χαρακτηριστικό της ένωσης αυτής, είναι οι αναγωγικές της ιδιότητες. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της

γλουταθειόνης, είναι ότι χρησιμοποιείται από πολλά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης. Η κύρια δράση της εντοπίζεται στη διάσπαση και αποβολή από το οργανισμό πολλών τοξικών ουσιών που εισέρχονται στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, εμποδίζει την οξείδωση των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες και λειτουργεί σαν προστάτης των κύτταρων από βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν οι ελεύθερες ρίζες.

Παραγωγή της γλουταθειόνης μπορεί να πραγματοποιηθεί ενδογενή στον οργανισμό αλλά ταυτόχρονα και μέσω διατροφή μέσα από τα αμινοξέα. Ωστόσο μόνο το ήπαρ συμμετέχει σημαντικά στη de novo σύνθεση της.

Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη E ανήκει στις λιποδιαλυτές βιταμίνες και αποτελείται από τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική και άφθονη μορφή (Fuchs, 2003). Συναντάται στις μεμβράνες και συμβάλλει στην ακεραιότητα αυτών και στη σταθερότητα των κυττάρων. Ταυτόχρονα προστατεύει από την καταστροφή των μεμβρανών από την οξείδωση και υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες (Groppe et. al., 2008). Επίσης, προστατεύει από την οξείδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C ανήκει στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες και αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό στοιχείο για τον οργανισμό αφού μπορεί να εξουδετερώσει άμεσα τις ελεύθερες ρίζες (Palmer et. al., 2003).

Η βιταμίνη C είναι δότης ηλεκτρονίων δηλαδή δίνει ηλεκτρόνια σε ένζυμα και οξειδωτικές ενώσεις με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες.

B-καροτίνη

Η β-καροτίνη μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A και αποτελεί λιποδιαλυτό μόριο. Υπάρχει ο ισχυρισμός ότι και αυτή μπορεί να αναστείλει τη δράση των ελεύθερων ριζών και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Επιπλέον, παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος ενός οργανισμού και αλληλεπιδρά με άλλες βιταμίνες και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά την έντονη σωματική άσκηση αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Το ουρικό οξύ προστατεύει τους μύες από την οξείδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (Hellsten et. al., 1996). Κάποιες

μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κομμάτι της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et. al., 1987).

Συνένζυμο Q₁₀

Το Συνένζυμο Q₁₀ είναι μόριο απαραίτητο για τη σύνθεση ATP (Linnane et al., 2002). Επίσης, κατέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου και ταυτόχρονα βοηθά στην αναγέννηση των βιταμινών C και E (Witt et. al., 1992; Crane, 2001).

Σελήνιο

Το σελήνιο συμπεριλαμβάνεται στα ιχνοστοιχεία και βοηθά στην πρόσληψη ασθενειών. Επιπρόσθετα, λειτουργεί σαν συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.3 Οξειδωτικό στρες

Κάτω από φυσιολογικές διατηρείται ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού ελεύθερων ριζών και της εξουδετέρωσής τους. Αυτή η ισορροπία επιτυγχάνεται μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών που κατέχει ο οργανισμός. Αντίθετα, εάν προκύψει ανισορροπία μεταξύ της ποσότητας των ελεύθερων ριζών και αντιμετώπισης αυτών από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, οδηγείται ο οργανισμός στο φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop 2015). Το οξειδωτικό στρες οδηγεί στη δημιουργία άνισης σχέσης μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, η οποία μπορεί να επιφέρει επιβλαβείς κυτταρικές αλλαγές και να οδηγήσει στην απόπτωση ή νέκρωση του κυττάρου.

Η εμφάνιση του οξειδωτικού στρες μπορεί να συμβεί από:

1. Μεγάλη παραγωγή ελεύθερων ριζών. Ειδικότερα αυτό μπορεί να συμβεί όταν ο οργανισμός έρθει σε επαφή με τοξικές ουσίες, οι οποίες μέσα από το μεταβολισμό τους οδηγούν στη παραγωγή ελεύθερων ριζών.
2. Μικρή δράση αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Δηλαδή αυτό μπορεί να συμβεί όταν λόγω τοξικών παραγόντων ή μεταλλάξεων, ο οργανισμός οδηγείται στην μη καλή λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών και το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες έχουν κατηγορηθεί ως πιθανή αιτία πολλών ασθενειών (Halliwell, 2001).

1.4 Μέλι

Ανάλογα με την προέλευση τα κυριότερα είδη μελιού είναι τα εξής δύο:

1. μέλι ανθέων ή μέλι νέκταρος: παράγεται από το νέκταρ των φυτών. Παραδείγματα τέτοιου μελιού αποτελούν κυρίως τα μέλια θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλίανθου, καστανιάς.
2. μέλι μελιτώματος: παράγεται εκκρίματα εντόμων απομυζούντων φυτά που βρίσκονται πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών ή εκκρίσεις προερχόμενες από ζώντα μέρη των φυτών. Κύρια παραδείγματα είναι το μέλι ελάτης και πεύκου.

Το μέλι αποτελεί ένα από τα θρεπτικά και υγιεινά τρόφιμα για τον άνθρωπο αφού δίνει ενέργεια στους μυς και διαύγεια στο μυαλό. Το μέλι έχει χρήση ως δυναμωτικό λόγω της γλυκόζης που περιέχει και έχει επίσης, ευεργετική επίδραση στην καρδιά, στο συκώτι και στο πεπτικό σύστημα του ανθρώπου. Επιπλέον έχει υψηλή αντιβακτηριακή δράση λόγω του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της χαμηλής υγρασίας που περιέχει (Γούναρη, 2004).

1.4.1 Σχηματισμός μελιού

Οι μέλισσες μετατρέπουν τα διάφορα σάκχαρα σε μέλι μέσω της διαδικασίας της παλινδρόμησης, η οποία επιλαμβάνεται συνεχεία μέχρι να χωνευτεί μερικώς. Δηλαδή, οι μέλισσες κάνουν ταυτόχρονα την παλινδρόμηση και τη πέψη. Ακόμα και μετά την τελευταία παλινδρόμηση, το υδατικό διάλυμα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Για αυτό το λόγο, η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι την εξάτμιση του μεγαλύτερου μέρους του νερού μέσω ενζυματικής επεξεργασίας. Έπειτα, τα φυτικά σάκχαρα αφυδατώνονται με προσθήκη ένζυμων όπου το μέλι τροποποιείται και επηρεάζεται η χημική σύνθεση και το pH και εμποδίζεται η ζύμωση του. Ινβερτάσες και πεπτικά οξέα υδρολύουν σακχαρόζη για να παραχθούν γλυκόζη και φρουκτόζη που είναι μονοσακχαρίτες. Η ινβερτάση είναι ένα ένζυμο το οποίο παράγεται από το σώμα του εντόμου.

Το μέλι αποτελεί τη τροφή των μελισσών. Σε κρύο καιρό ή όταν δεν υπάρχουν φρέσκες πηγές τροφής, οι μέλισσες χρησιμοποιούν το αποθηκευμένο μέλι τους ως πηγή ενέργειας (Hopper, 2010).

Ο άνθρωπος εκμεταλλεύεται τα έντομα αυτά, για αυτό χρησιμοποιεί τεχνητές κυψέλες ώστε να φωλιάζουν σμήνη και να παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες μελιού.

Μέσα σε μια κυψέλη υπάρχουν τρία είδη μελισσών:

1. Η βασίλισσα των μελισσών.
2. Μεταβλητός αριθμός αρσενικών μελισσών (κηφήνες), που χρειάζεται ώστε να γονιμοποιηθούν οι νέες βασίλισσες, οι οποίοι είναι περίπου 20.000 έως 40.000 ανά κυψέλη (Whitmire, 2007).
3. Εργάτριες μέλισσες, οι οποίες χρειάζονται ώστε να αυξηθούν οι προνύμφες και να συλλέγουν το νέκταρ που θα γίνει μέλι στην κυψέλη. Οι εργάτριες επίσης, βγαίνουν από τη κυψέλη για να συλλέγουν σάκχαρα από πλούσια σε νέκταρ άνθη και έπειτα επιστρέφουν στη κυψέλη.

Η μετατροπή του νέκταρ σε μέλι ξεκινά μέσα στον πρόλοβο του εντόμου με την πρόσθεση ενζύμων από τους αδένες υποφαρυγγικούς και σιελογόνους. Οι υποφαρυγγικοί αδένες βρίσκονται στο επάνω μέρος του κεφαλιού της μέλισσας. Οι υποφαρυγγικοί αδένες είναι δυο λεπτοί και μακροί αγωγοί με πολλές διακλαδώσεις, οι οποίοι είναι ανεπτυγμένοι στις νεαρές εργάτριες μέλισσες ώστε να παράγουν το βασιλικό πολτό. Ενώ στις εργάτριες μέλισσες που έχουν μεγαλύτερη ηλικία, είναι μικρότεροι και παράγουν το ένζυμο ινβερτάση. Το ένζυμο ινβερτάση είναι απαραίτητο για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι και το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης, που μετατρέπει τη γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ.

Η χημική μετατροπή του φυτικού χυμού σε μέλι πραγματοποιείται από την αποδόμηση του διζαχαρίτη σουκρόζη (η κοινή ζάχαρη) στα άμεσα αφομοιώσιμα μονοσάκχαρα της γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ανασύνθεση δι- και τριζαχαριτών είναι ποσοτικά πολύ περιορισμένη. Οι αρωματικές, διάφορα τερπένια, καθώς και οι χρωστικές ουσίες του φυτικού χυμού δεν μεταβολίζονται. Επίσης, γίνεται εμπλουτισμός του μελιού με το άρωμα των οργανικών οξέων από τη διάσπαση της γλυκόζης. Επιπλέον, εμπλουτισμός του μελιού γίνεται και με ένζυμα από τους αδένες της εργάτριας μέλισσας οι οποίοι μεταβολίζουν τα σάκχαρα. Τα διάφορα μεταλλικά στοιχεία του μελιού είναι ίδια με εκείνα που περιέχονται στον πρωταρχικό φυτικό χυμό (White, 1979).

1.4.2 Σύσταση και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιού

Το σύνολο των φυσικοχημικών, οργανοληπτικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών ορίζουν μια συγκεκριμένη κατηγορία αμιγούς μελιού. Ως αμιγές μέλι καλείται εκείνο που με βάση τα χαρακτηριστικά του κατατάσσεται σε μία κατηγορία μελιού συγκεκριμένης φυτικής προέλευσης. Για την ταυτοποίηση του μελιού χρησιμοποιούνται τα συστατικά του μελιού, τα οποία κατατάσσονται σε δύο

κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα μικροσκοπικά και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν την ταυτότητα του προϊόντος βάσει των νομοθετημένων ποιοτικών κριτηρίων, παραδείγματος χάρι τα σάκχαρα, τα ένζυμα, η HMF, η αγωγιμότητα, το φάσμα των γυρεόκοκκων και άλλα. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι σε πολύ μικρές ποσότητες, παραδείγματος χάρι φλαβονοειδή, αμινοξέα. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τη χλωρίδα της περιοχής και δίνουν διάφορες πληροφορίες για τη γεωγραφική προέλευση του προϊόντος (Θρασυβούλου και συνεργάτες, 2002).

1.4.3 Συστατικά μελιού

Σάκχαρα

Τα σάκχαρα του μελιού είναι μονοσακχαρίτες (φρουκτόζη και γλυκόζη), δισακχαρίτες (μαλτόζη, σακχαρόζη, ισομαλτόζη) και τρισακχαρίτες (μαλτοτριόζη) (Kamal et. al., 2011). Τα κυριότερα σάκχαρα του μελιού είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Τα δυο αυτά σάκχαρα αποτελούν περίπου το 75% των σακχάρων, οι δισακχαρίτες από την άλλη πλευρά αποτελούν το 10-15%. Ανάλογα με τη βοτανική και με τη γεωγραφική προέλευση που έχει το παραγόμενο μέλι, διαφέρει και η σύνθεση των σακχάρων του μελιού. Επίσης, η σύνθεση των σακχάρων του μελιού επηρεάζεται από την αποθήκευση και την επεξεργασία του (Escuredo et. al., 2014, Topuk et. al., 2013). Επιπλέον, η αποθήκευση και η θέρμανση του μελιού για μεγάλη χρονική διάρκεια έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνθεση κάποιων σακχάρων και τη δημιουργία ανεπιθύμητων ενώσεων και κατά επέκταση την ποιοτική υποβάθμιση του μελιού.

Οργανικά οξέα

Συμφώνα με μελέτες, το μέλι κατέχει μικρή σχετικά οξύτητα, η οποία οφείλεται σε οργανικά οξέα που περιέχονται σε ποσοστό 0.57% (Karabagias et. al., 2014). Η ηλεκτρική του αγωγιμότητα και το pH του μελιού οφείλεται στα οξέα αυτά (Mato et. al., 2006). Το pH του μελιού κυμαίνεται μεταξύ 3,3 - 5,9 (Thrasynvoulou & Manikis, 1995).

Πρωτεΐνες και Αμινοξέα

Στο μέλι και στη γύρη το πιο άφθονο αμινοξύ είναι η προλίνη, ενώ εμπεριέχονται και άλλα όπως η τυροσίνη, η λυσίνη, η βαλίνη, η λευκίνη, το γλουταμικό οξύ κ.ά (Hermosin et. al., 2003; Rebane et. al., 2010). Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στο μέλι εξαρτάται από το είδος των μελισσών που το παράγουν.

Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μία χημικά ετερογενής ομάδα με 10.000 περίπου ενώσεις. Στο μέλι, οι χημικές ενώσεις αυτές μπορούν να χωριστούν σε μη φλαβονοειδή, παραδείγματος χάρη τα φαινολικά οξέα, και φλαβονοειδή, παραδείγματος χάρη φλαβονόλες, φλαβόνες, ανθοκυανιδίνες κ.α. (Andersen, 2006).

Ενζυμα

Στο μέλι, τα βασικότερα ενζυμα είναι η ιμπερτάση, διαστάση και η καταλάση. Η ιμπερτάση προκύπτει από τη διάσπαση της σουκρόζης ενώ η διαστάση από τη διάσπαση του αμύλου. Τα δυο αυτά ένζυμα προέρχονται από τις μέλισσες ενώ η καταλάση έχει φυτική προέλευση. Επίσης, μικρό ποσοστό της διαστάσης προέρχεται από τα φυτά. Η σημασία της διαστάσης στις αναλύσεις του μελιού. Η διαστάση είναι πολύ θερμοευαίσθητη και έχει χρήση ως δείκτης για τη θερμική επεξεργασία του μελιού (Crane, 1990).

Μέταλλα και ιχνοστοιχεία, τέφρα

Μετά από καύση, το ανόργανο υπόλειμμα του μελιού, που καλείται τέφρα, κυμαίνεται μεταξύ 0,02 - 1% και αποτελείται από ιχνοστοιχεία και μέταλλα όπως κάλιο, θείο, χλώριο κ.ά (Crane, 1990).

Γυρεόκοκκοι

Στο μέλι εμπεριέχεται σημαντικός αριθμός γυρεόκοκκων. Η προέλευση αυτών είναι φυτική, η πρώτη ύλη δηλαδή που συλλέγουν οι μέλισσες ώστε να παραχθεί το μέλι και από τον άνεμο. Η χημική σύνθεση των γυρεόκοκκων εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες και οι γυρεόκοκκοι αποτελούν τη κυριότερη πηγή φαινολικών ενώσεων του μελιού (Escuredo et. al., 2008, Saric et. al., 2013, Velasquez et. al., 2017).

1.4.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες μελιού

Οι φυσικές ιδιότητες του μελιού διαφέρουν, ανάλογα δηλαδή με την περιεκτικότητα του σε νερό, τη θερμοκρασία, τον τύπο της χλωρίδας από όπου παράγεται και το ποσοστό των σακχάρων που περιέχει. Σε ένα μέλι που είναι φρέσκο εμπεριέχονται περισσότερα σάκχαρα από νερό, είναι δυνατό να διαλυθεί θερμοκρασίες περιβάλλοντος και έχει μορφή ενός υπέρ-κορεσμένο υγρού. Το μέλι σε θερμοκρασία δωματίου έχει τη μορφή ενός υπερψυγμένου υγρού και η γλυκόζη που εμπεριέχεται καθιζάνει σε στερεά κοκκία. Έτσι, σχηματίζεται ένα ημι-στερεό

διάλυμα που περιέχει κρυστάλλους γλυκόζης που έχουν καθιζάνει σε ένα διάλυμα φρουκτόζης καθώς και άλλα συστατικά.

Το σημείο τήξεως του μελιού είναι μεταξύ 40 και 50 °C. Ωστόσο σημαντικό ρόλο παίζει η σύσταση του. Κάτω από αυτή τη θερμοκρασία, το μέλι μπορεί να είναι σε μία μετασταθή κατάσταση. Δηλαδή δεν θα κρυσταλλωθεί μέχρι να προστεθεί ένας κρύσταλλος γλυκόζης είτε είναι σε μια ευκίνητη κατάσταση δηλαδή ένα κορεσμένο διάλυμα που περιέχει σάκχαρα να μπορούν να κρυσταλλωθούν αυθόρμητα. Το ποσοστό της κρυσταλλοποίησης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Σημαντικότερος αυτών είναι η αναλογία των δυο κύριων σακχάρων, δηλαδή φρουκτόζη σε γλυκόζη. Το μέλι που εμπεριέχει μεγάλη ποσότητα γλυκόζης, θα κρυσταλλωθεί πολύ γρήγορα. Αντίθετα, το μέλι που εμπεριέχει μικρή ποσότητα γλυκόζης, όπως καστανιάς, δεν κρυσταλλώνεται άμεσα. Επίσης, διάφορα είδη μελιού μπορεί να παράγουν λίγους και μεγάλους κρυστάλλους, ενώ άλλα είδη μπορεί να παράγουν μικρούς και πολλούς κρυστάλλους (Tomasik, 2004).

Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό επηρεάζει τη κρυστάλλωση. Μια μεγάλη ποσότητα σε νερό θα αναστέλλει την κρυστάλλωση. Ταυτόχρονα, η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα κρυστάλλωσης. Στο μέλι φαίνεται πιο γρήγορη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες από 13 μέχρι 17 °C. Επίσης, στο μέλι σχηματίζονται κρυστάλλινοι πυρήνες ευκολότερα όταν το μέλι ανακινείται ή αναδεύεται παρά αν το μέλι είναι σε ήρεμη κατάσταση. Η πυρήνωση των μικροσκοπικών κρυστάλλων είναι πιο μεγάλη σε θερμοκρασίες από 5 μέχρι 8 °C. Κάτω από 5 °C, το μέλι δεν θα κρυσταλλωθεί και η αρχική υφή και γεύση μπορεί να διατηρηθεί (Kántor, 1999).

Ιξώδες

Το ιξώδες του μελιού επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και την περιεκτικότητα σε νερό. Όσο υψηλότερη είναι η υγρασία, τόσο πιο ρευστό είναι το μέλι. Εκτός από την περιεκτικότητα σε νερό, η σύνθεση του μελιού έχει χαμηλή επίδραση στο ιξώδες, με την εξαίρεση κάποια είδη μελιού.

Αγωγιμότητα

Στο μέλι εμπεριέχονται ηλεκτρολύτες, οι οποίοι έχουν τη μορφή των μετάλλων και των οξέων και έχει διάφορους βαθμούς ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Οι μετρήσεις της ηλεκτρικής αγωγιμότητας πραγματοποιούνται για τον προσδιορισμό της ποιότητας του μελιού και συγκεκριμένα τη περιεκτικότητας σε τέφρα (Bogdanov, 2008).

Το μέλι μπορεί και να απορροφά την υγρασία του αέρα. Η σχετική υγρασία του αέρα επηρεάζει την ποσότητα του νερού που θα απορροφηθεί από το μέλι. Το μέλι εμπεριέχει ζύμες και η αποθήκευση του πρέπει να γίνεται σε σφραγισμένα δοχεία ώστε να μην πραγματοποιηθεί ζύμωση, η οποία συχνά ξεκινά όταν η υγρασία του μελιού ανεβαίνει πάνω από 25%.

Θερμικά χαρακτηριστικά

Στην περίπτωση όπου το μέλι θερμανθεί επαρκώς, θα καραμελωθεί, όπως συμβαίνει σε όλα τα σάκχαρα. Το μέλι όμως περιέχει φρουκτόζη, η οποία καραμελώνεται σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Belitz et al., 2004). Η καραμελοποίηση διαφέρει ανάλογα με τη σύνθεση του μελιού και η θερμοκρασία έναρξης της καραμελοποίησης βρίσκεται μεταξύ 70 έως 110 °C. Στο μέλι εμπεριέχονται οξέα που έχουν δράση ως καταλύτες, μειώνοντας έτσι τη θερμοκρασία καραμελοποίησης.

Περιεκτικότητα σε οξέα

Το pH του μελιού κυμαίνεται μεταξύ 3,4 έως 6,1. Στο μέλι εμπεριχόνται πολλά είδη οξέων, οργανικά και αμινοξέα. Οι διάφοροι τύποι και τα ποσά τους φέρουν διαφορές ανάλογα με το είδος του μελιού. Αυτά τα οξέα μπορεί να είναι αρωματικές ή αλειφατικές ενώσεις.

Στο μέλι μπορεί να εμπεριέχονται έως και 18 από τα 20 αμινοξέα. Όμως, η ποσότητα των αμινοξέων είναι πολύ μικρή στο μέλι και βρίσκονται σε ποσοστό 0,05-0,1% της σύνθεσης. Το κύριο αμινοξύ που περιέχεται είναι η προλίνη. Τα αμινοξέα προέρχονται κυρίως από τα σώματα των μελισσών.

Στο μέλι εμπεριέχονται κυρίως οργανικά οξέα περιλαμβάνουν το σύνολο των οξέων στο μέλι και βρίσκονται σε ποσοστό 0,17 έως 1,17% του μίγματος. Το γλυκονικό οξύ είναι το πιο γνωστό και σχηματίζεται από τη δράση του ενζύμου, οξειδάση της γλυκόζης. Επίσης, άλλα οργανικά οξέα είναι το οξικό, μυρμηκικό, βουτυρικό, γαλακτικό, κιτρικό, πυρογλουταμικό, μηλικό, προπιονικό, καπρονικό, βαλεριανικό, ηλεκτρικό και παλμιτικό και άλλα (Wilkins & Yinrong, 1995).

1.4.5 Κυριότερα είδη μελιού

Παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των βασικότερων ειδών μελιών (Θρασυβούλου και συνεργάτες, 2002).

Μέλι Πεύκου

Παράγεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου *Marchalina hellenica* που είναι παράσιτο του πεύκου και κυρίως εμφανίζεται στη Χαλκιδική, Θάσο, Εύβοια, Σκιάθο, Σκόπελο. Τα χαρακτηριστικά του μελιού είναι το υψηλό pH, η υψηλή συγκέντρωση τέφρας και η χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα προκαλεί αργό ρυθμό κρυστάλλωσης του μελιού αυτού. (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

Μέλι ελάτης

Σε περιοχές στην Ευρυτανία, νότια του Ολύμπου, στο Περούλι και όπου υπάρχει το είδος ελάτης, *Abies cephalonica*, ενώ η ευρωπαϊκή ελάτη, *Abies alba* βρίσκεται σε ολόκληρη την Ευρώπη. Το μέλι ελάτης έχει χαρακτηριστική εμφάνιση, καλή γεύση και το χρώμα του διαφέρει ανάλογα με την προέλευση του. Επίσης, το μέλι αυτό δεν κρυσταλλώνει εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

Θυμαρίσιο μέλι

Πρόκειται για μέλι πολύ καλής ποιότητας και έχει γεύση ευχάριστη άλλα πολλές φορές δίνει την αίσθηση καυσίματος στον λάρυγγα εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε φρουκτόζη. Το μέλι αυτό κρυσταλλώνει σε διάστημα 6 έως 18 μηνών και το χρώμα του είναι ανοιχτό καφέ (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

Μέλι καστανιάς

Προέρχεται από το νέκταρ και τις μελιτώδεις εκκρίσεις της καστανιάς, *Castanea Sativa*. Το φυτό αυτό κάνει την εμφάνιση του στις ορεινές περιοχές της Ελλάδας. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις παράγονται από την αφίδα *Myzocallis castanicola* και ξεκινούν από τον Μάιο και έως τον Ιούλιο. Το μέλι αυτό παρουσιάζει υψηλή τιμή pH, τέφρας και αγωγιμότητας. Επίσης, τα χαρακτηριστικά μελιού το κατατάσσουν στα ανθόμελα. Το χρώμα του μπορεί να είναι από ανοιχτό έως σκούρο καφέ ή και προς το μαύρο εάν πρόκειται για μελίτωμα. Το βασικό χαρακτηριστικό του μελιού αυτού είναι η έντονη, πικρή, δυνατή γεύση του (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

Μέλι ερείκης

Είναι γνωστή η φθινοπωρινή ερείκη ή σουσούρα, *Erica verticillata* και η ανοιξιάτικη ερείκη, *Erica arborea*. Το μέλι της φθινοπωρινής ερείκης έχει υψηλή υγρασία και θρεπτική αξία. Επίσης κατέχει υψηλή περιεκτικότητα σε ζαχαρομύκητες για αυτό και μπορεί να ξινίσει εύκολα. Το μέλι αυτό κρυσταλλώνει γρήγορα από 1 έως 3 μήνες

επειδή έχει υψηλή περιεκτικότητά του σε γλυκόζη. Το χρώμα του είναι κοκκινωπό ενώ η γεύση του είναι ελαφρώς πικρή. Το χρώμα από το μέλι της ανοιξιάτικης ερείκης είναι πιο ανοιχτό σε σύγκριση με αυτό της φθινοπωρινής ενώ έχει και διαφορετική γεύση (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

Μέλι κουμαριάς

Το βασικότερο χαρακτηριστικό του είναι η πολύ πικρή γεύση του και για αυτό έχει και χαμηλή εμπορική αξία. Είναι κατάλληλο για διαβητικούς τύπου Β και για δίαιτες εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη και των χαμηλών θερμίδων που εμπεριέχονται στο μέλι αυτό. Το μέλι αυτό κρυσταλλώνει γρήγορα (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

Μέλι εσπεριδοειδών

Το μέλι αυτό έχει πολύ καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ξεχωρίζει από χαμηλή περιεκτικότητα στο ένζυμο διασάση και από υψηλή ταχύτητα κρυστάλλωσης (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67).

1.4.6 Διατροφική αξία μελιού

Το μέλι κατέχει υψηλή ενεργειακή, μεγάλη θρεπτική αξία και απορροφάται άμεσα από τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, στο μέλι εμπεριέχονται περισσότερες από 180 διαφορετικές ουσίες που το καθιστούν πολύτιμη τροφή. Τα σάκχαρα σε ένα μέλι αντιπροσωπεύουν το 70-80% και είναι κυρίως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Το μέλι επίσης, εμπεριέχει νερό οργανικά οξέα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, συμπλέγματα πρωτεϊνών, μεταλλικά στοιχεία σε μικρές ποσότητες όπως ασβέστιο, κάλιο, μαγνήσιο, κ.ά., ένζυμα, βιταμίνες όπως Β₂, Β₆, C, D, E, , φολικό οξύ κ.α.), φυσικές αρωματικές ουσίες, παντοθενικό οξύ κ.α. Τα ανόργανα στοιχεία του μελιού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και συμμετέχουν σε πολλά και διάφορα ενζυμικά συστήματα.

Η συνύπαρξη σημαντικών επιμέρους θρεπτικών συστατικών του μελιού σε συνάρτηση με την επίδραση του στον ανθρώπινο οργανισμό συνιστούν αντικείμενο μελέτης για πολλές έρευνες (Miguel et. al., 2017).

1.4.7 Ευεργετικές δράσεις μελιού στον άνθρωπο

Αντικαρκινική Δράση

Πολλές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* φανέρωσαν τις θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού για την πρόληψη την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου του

καρκίνου. Συγκεκριμένα, έλαβαν χώρα δοκιμές σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου όπως του προστάτη, του μαστού, του τραχήλου, του πνεύμονα, των νεφρών και της ουροδόχου κύστης από άνθη διαφόρων ποικιλιών τα οποία παρουσίασαν τη αντικαρκινική και θεραπευτική δράση. Το μέλι πιθανώς να σταματά την ανάπτυξη του καρκίνου γιατί ενδεχομένως να παρεμποδίζει τα τρία στάδια της καρκινογένεσης δηλαδή την έναρξη, εξάπλωση και εξέλιξη.

Οι επιδράσεις αυτές διαφέρουν από το είδος του μελιού καθώς και από τον τύπο του καρκινικού κυττάρου. Τέλος αναφέρεται ότι μια ποσότητα φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων είχαν αντικαρκινικές ιδιότητες, που φανερώνει ότι το μέλι ενδεχομένως να κατέχει αντικαρκινικές ιδιότητες (Miguel et. al., 2017).

Αντιοξειδωτική Δράση

Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού εξαρτάται από τη προέλευση του καθώς και ενδεχομένως τη διαφορετική περιεκτικότητα των φυτών σε ενζυμικές δραστηριότητες, πολυφαινόλες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Επίσης, έχει αναφερθεί στην αντιοξειδωτική δράση του μελιού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο πολλά συστατικά του, όπως το ασκορβικό οξύ, η καταλάση, τα οργανικά οξέα, τα προϊόντα της αντίδρασης του Maillard, οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα φαινολικά οξέα και τέλος τα φλαβονοειδή.

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα σκουρόχρωμα μέλια έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τα ανοιχτόχρωμα (Σάρδαλου και συνεργάτες, 2002). Επιπρόσθετα, άλλες μελέτες φανέρωσαν ότι τα πίκρα μέλια, και κυρίως το μέλι καστανιάς είναι πιο πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ενώσεις σε σύγκριση με τα γλυκά μέλια (Otmami et. al., 2019, Gul et. al., 2018).

Το μέλι χαρακτηρίζεται ως ένα πολύπλοκο προϊόν που έχει μεγάλη μεταβλητότητα στις μετρήσεις και είναι δύσκολη απόκτηση αντιοξειδωτικών δεικτών. Τα φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή είναι σε σημαντικό βαθμό υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού (Nagai et. al., 2001).

Αντιμικροβιακή Δράση

Το μέλι χρησιμοποιούνταν για θεραπεία πληγών και παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος (Majno G, 1975, Zumla A, 1989). Το μέλι κατέχει ένα ευρύ φάσμα δράσης κατά παθογόνων βακτηρίων και μικροοργανισμών που προσβάλλουν τα τρόφιμα και τον άνθρωπο (Kwakman, 2008). Την ίδια στιγμή, το μέλι βρίσκει χρήση ως εναλλακτική θεραπεία αφού έχει ισχυρή *in vitro* δράση του μελιού έναντι βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Cooper, 2002) και είναι

αποτελεσματικό σε μολυσμένες πληγές που δεν θεραπεύτηκαν με άλλο τρόπο (Efem S., 1988).

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού οφείλεται στο υπεροξειδίο του υδρογόνου και στην παρουσία άλλων διαφόρων παραγόντων όπως η ντιφενσίνη. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται όταν το μέλι περιέχει ένα ένζυμο που αποκαλείται οξειδάση της γλυκόζης και η οποία διασπά τη γλυκόζη παράγοντας μεταξύ των άλλων και υπεροξειδίο του υδρογόνου (Κουτελιδάκης, 2015). Τέλος, διάφορα συστατικά του μελιού όπως φαινολικές ενώσεις, αρωματικά οξέα και πρωτεΐνες βοηθούν στη αντιμικροβιακή δράση του (Weston, 1999).

1.5 Σκοπός

Στη παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας από δείγματα ελληνικών μελιών καθώς και του πολυφαινολικού τους περιεχομένου.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας από μέλια, διαφορετικής προέλευσης, μέσω αλληλεπίδρασης με τις ελεύθερες ρίζες DPPH• και ABTS^{•+}. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την εκτίμηση του πολυφαινολικού περιεχομένου των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin Ciocalteu.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εκχυλίσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 18 εκχυλίσματα μελιού, τα οποία παρουσιάζονται στην παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) και το μέλι Manuka από τη Νέα Ζηλανδία ως μέλι αναφοράς. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα ήταν το νερό.

Πίνακας 2: Δείγματα εκχυλισμάτων μελιού.

Κωδικός	Προέλευση Μελιού	Περιοχή Παραγωγής Μελιού	Έτος Παραγωγής Μελιού
2	Κουμαριά	Άγιο Όρος	2018
3	Σούσουρα	Άγιο Όρος	2018
4	Κάστανο	Άγιο Όρος	2018
5	Πολυανθικό	Όλυμπος	2017
6	Πολυανθικό	Όλυμπος	2019
7	Βελανιδιά	Εύβοια	2019
8	Κουμαριά	Νότιο Πήλιο	2019
10	Θυμάρι – Πεύκο	Γκιώνα, Δελφοί	2017
11	Πεύκο	Γκιώνα, Δελφοί	2017
12	Πεύκο	Γκιώνα, Δελφοί	2018
13	Θυμάρι	Γκιώνα, Δελφοί	
14	Γλυκάνισος	Εύβοια	2018
15	Πορτοκαλιά	Φιλοθέη Άρτας	2019
16	Ερρείκη	Προκόπι Ευβοίας	2019
17	Αρωματικά φυτά	Βελεστίνο Μαγνησίας	2019
18	Πεύκο	Προκόπι Ευβοίας	2019
19	Κουμαριά, Μαγνησίας	Βενέτα Μαγνησίας	2019
20	Καστανιά	Ζαγορά Πηλίου	2019
MANUKA		Νέα Ζηλανδία	

2.2 Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν τα παρακάτω προϊόντα:

- DPPH (1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο)
- ABTS (2,2-αζινοδις-3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ)
- Μεθανόλη (CH₃OH)
- H₂O₂ (υπεροξειδίο του Υδρογόνου)
- HRP (ένζυμο περοξειδάση)
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Άνυδρο ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃).

2.3 Μέθοδοι Εκτίμησης Αντιοξειδωτικής Ικανότητας

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο in vitro μέθοδοι.

2.3.1 Εκτίμηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας μέσω Αλληλεπίδρασης με τη Ρίζα DPPH•

Αρχή της μεθόδου

Αποτελεί μια από τις ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδους για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων (Brand-Williams et. al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και βασίζεται 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 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). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο. Η μεταβολή αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (25,4 ml μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 20mg ρίζας DPPH[•]). Έπειτα, ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων 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, όπως φαίνεται παρακάτω στο πίνακα (Πίνακα 3). Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Εξαιτίας της πιθανής απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας στα 517 nm γίνεται μέτρηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας σε μεθανόλη εις τριπλούν στα 517 nm (Πίνακας 4) . Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν και πραγματοποιούνται τουλάχιστον δύο πειράματα για κάθε εκχύλισμα. Τέλος, το διάλυμα της ρίζας DPPH[•] σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 3: Η σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων και οι αντίστοιχες ποσότητες τους.

	Τυφλό	Control	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
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 4: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας σε μεθανόλη.

	Τυφλό	Control	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
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:

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

Όπου:

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). 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 εκχυλισμάτων.

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

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller (Miller & Rice - Evans, 1995), βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και βασίζεται 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 δραστηκής ρίζας, του κατιόντος ABTS^{•+}. 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 μία ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+}, 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 (Prior et. al., 2005; Miller et. al, 1995).

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά γίνεται προετοιμασία των διαλυμάτων και ετοιμασία των διαφόρων συγκεντρώσεων της ουσίας που εξετάζεται.

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μ l) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10,97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H₂O.

Διάλυμα H₂O₂ (30 μ M): Για τελική συγκέντρωση H₂O₂ 30 μ M σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μ l) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μ M. Από το stock διάλυμα H₂O₂ 30% 8,8 M αραιώνουμε με H₂O₂, ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μ M.

Διάλυμα HRP (6 μ M): 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 και διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 μ l 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 5). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν και πραγματοποιούνται τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε εκχύλισμα. Το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H₂O₂, HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Εξαιτίας της πιθανής απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας στα 730 nm γίνεται μέτρηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας παρουσίας ABTS και H₂O₂ εις διπλούν στα 730 nm (Πίνακας 6).

Πίνακας 5: Η σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων και οι αντίστοιχες ποσότητες τους.

	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							
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl

Πίνακας 6: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας.

	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	1mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

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

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

Όπου:

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730 nm

A_s: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730 nm

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). 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 εκχυλισμάτων.

2.4 Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών (total polyphenolic content, TPC) των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

Το ολικό περιεχόμενο πολυφαινολών των εκχυλισμάτων εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση. 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) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 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 αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

Πειραματική διαδικασία

Η κάθε διαφορετική συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας εξετάζεται εις τριπλούν και πραγματοποιούνται τουλάχιστον δυο πειράματα συμφωνά με το παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7). Εξαιτίας της πιθανής απορρόφησης της εξεταζόμενης ουσίας στα 765 nm γίνεται μέτρηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας χωρίς την παρουσία Folin εις διπλούν στα 765 nm (Πίνακας 8). Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 3 min.

Πίνακας 7: Η σειρά προσθήκης αντιδραστηρίων και οι αντίστοιχες ποσότητες τους.

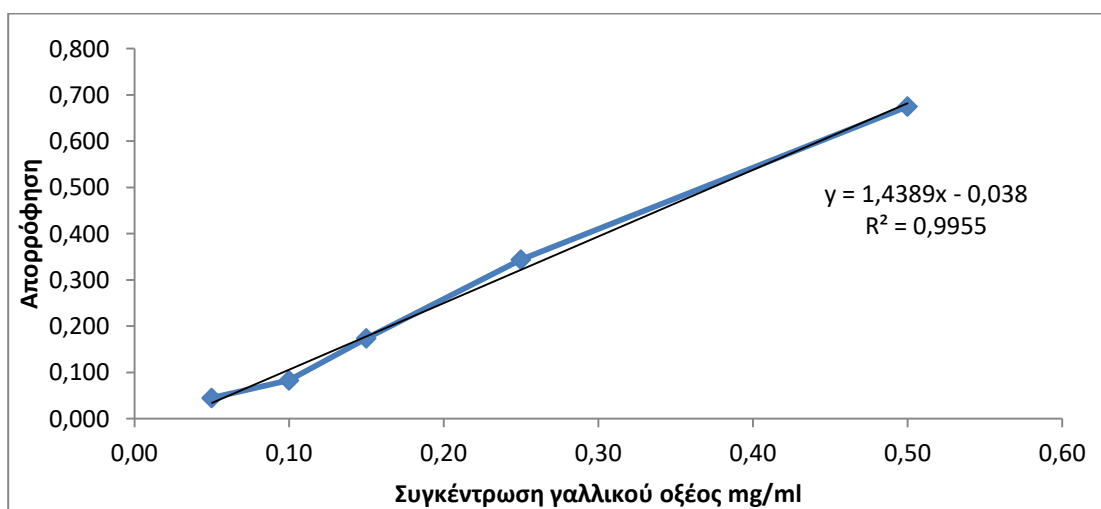
	Black	C₁	C₂
H₂O	1,02 μl	1ml	1ml
Folin	100 μl	100 μl	100 μl
Δείγμα	-	20 μl	20 μl

Πίνακας 8: Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης της ουσίας.

	C ₁	C ₂
H₂O	1.1 μl	1,1μl
Folin	-	-
Δείγμα	20 μl	20μl

Έπειτα, προσθέτουμε τα επόμενα διαλύματα σε όλα τα δείγματα. Τα διαλύματα που προσθέτονται είναι 280 μl Na₂CO₃ (25% W/v) και 600 μl απιονισμένο νερό και ακολούθησε ανάδευση. Μετά ακολουθείται μια ώρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τέλος, η απορρόφηση μετράται στα 765 nm (Priftis et. al., 2015).

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 0,05, 0,1, 0,15, 0,25 ,0,5, mg/ml γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση $y = 14389x + 0,038$ με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman $r = 0,9955$. Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

2.5 Στατιστική Ανάλυση

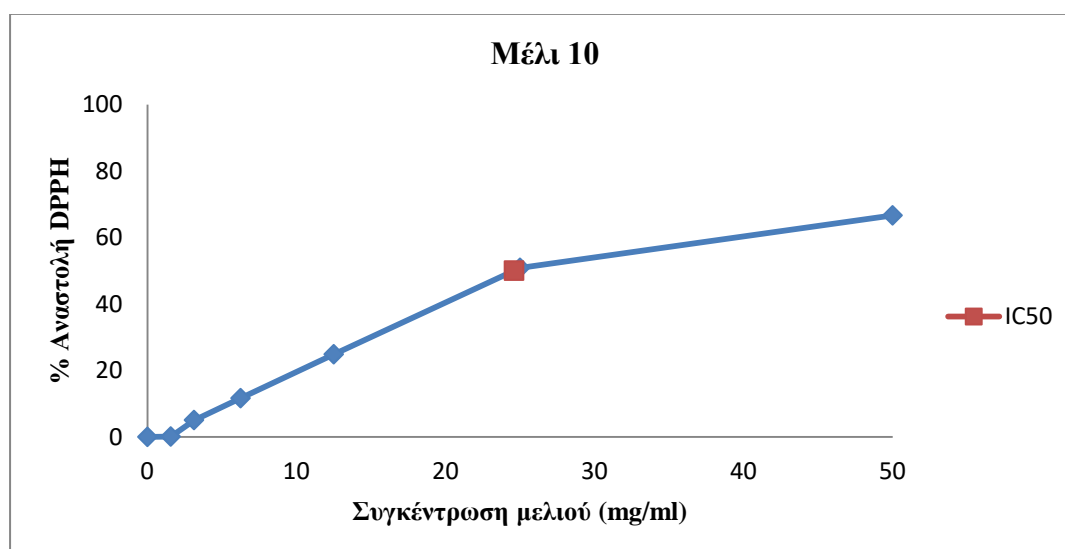
Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0).

Οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών των μεθόδων DPPH•, ABTS•+ και FOLIN έγιναν με τη μέθοδο Spearman στο πρόγραμμα SPSS 13.0.

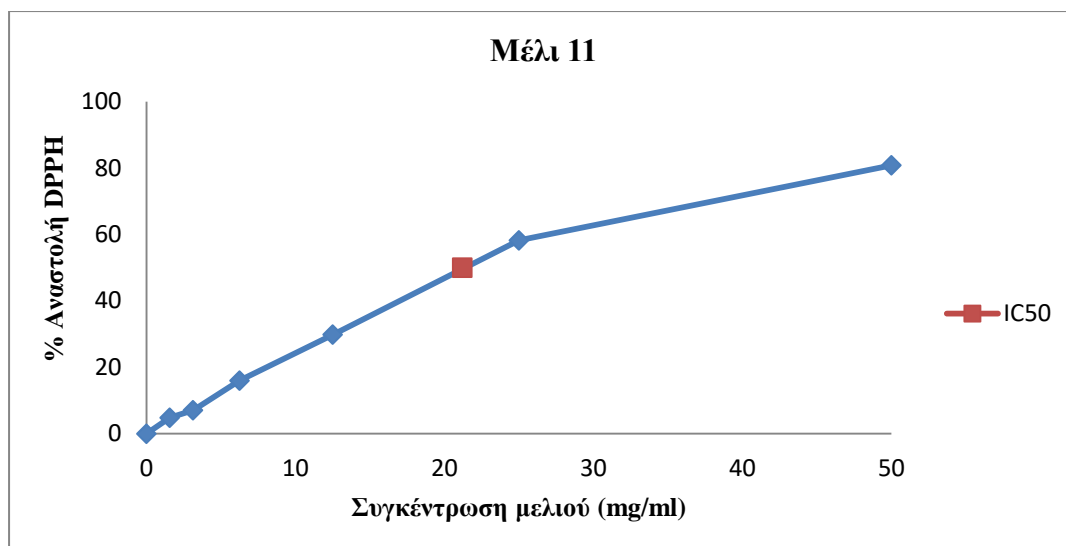
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

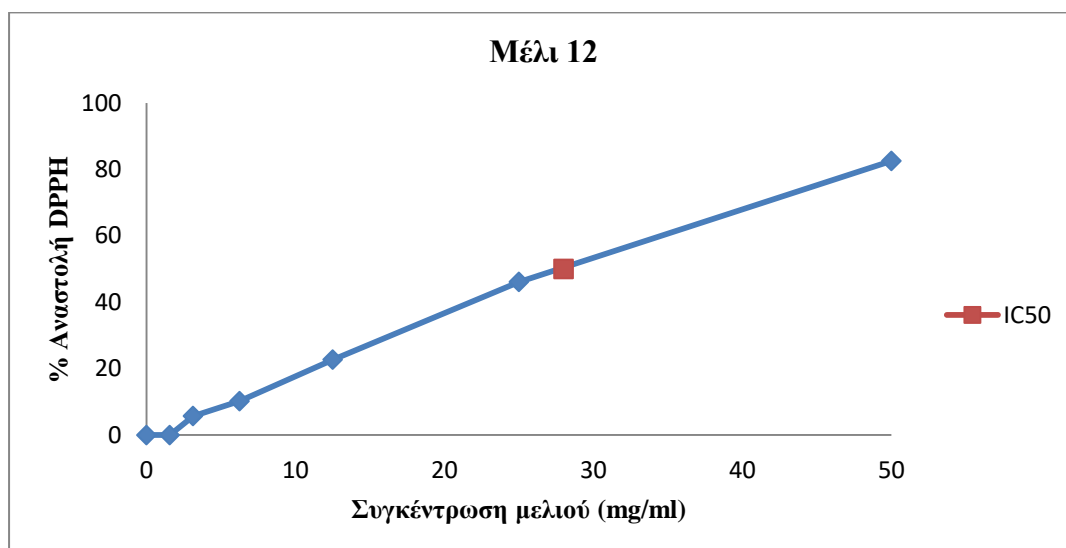
Συνολικά μελετήθηκαν 18 δείγματα μελιού και το μέλι αναφοράς, το μέλι Manuka. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού που ερευνήθηκαν, κυμάνθηκαν από 1,56 έως 200 mg/ml. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμάνθηκε από 5,3 mg/ml έως 139 mg/ml. Το πιο ισχυρό δείγμα από αυτά που μελετηθήκαν, ήταν το μέλι 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας) και το πιο ασθενές ήταν το μέλι 17 (Αρωματικά φυτά, Βελεστίνο Μαγνησίας). Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την % αναστολή της ρίζας DPPH• από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν (Σχήμα 2 ,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).



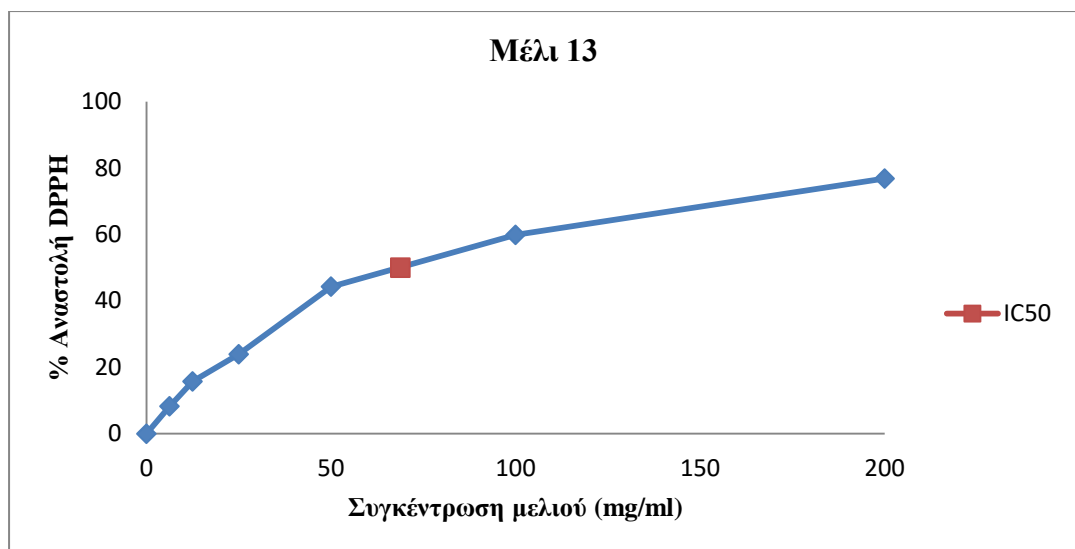
Σχήμα 2: Η % αναστολή της ρίζας DPPH• από το μέλι 10 (Θυμάρι – Πεύκο, Γκιώνα, 2017).



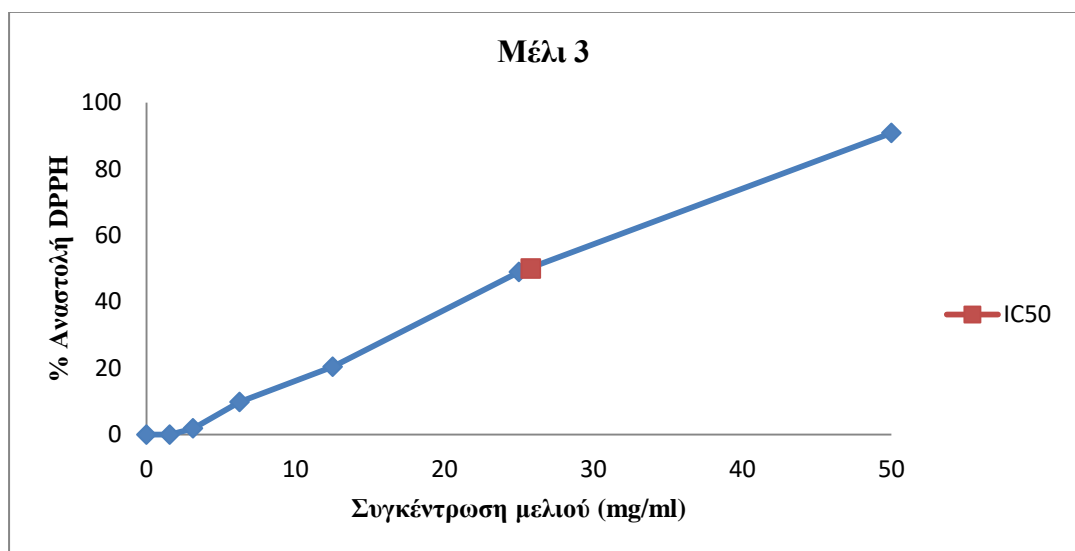
Σχήμα 3: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 11 (Πεύκο, Γκιώνα, 2017).



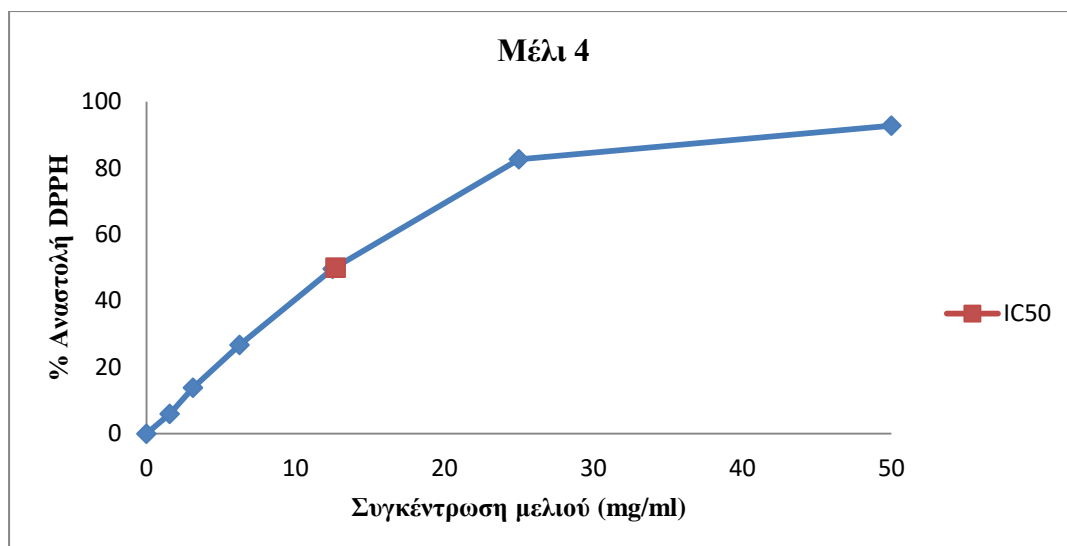
Σχήμα 4: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 12 (Πεύκο, Γκιώνα, 2018).



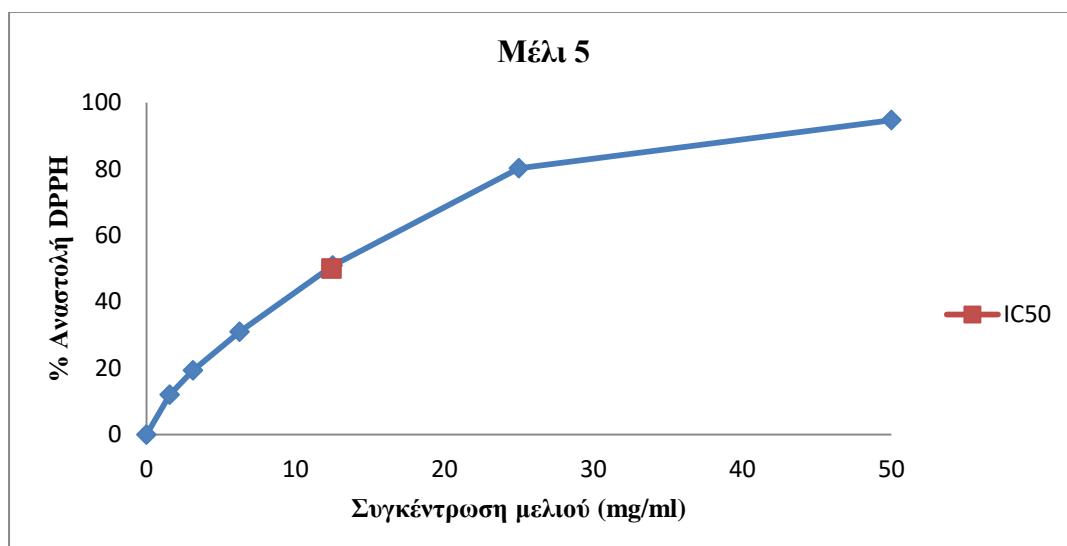
Σχήμα 5: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 13 (Θυμάρι, Γκιώνα)



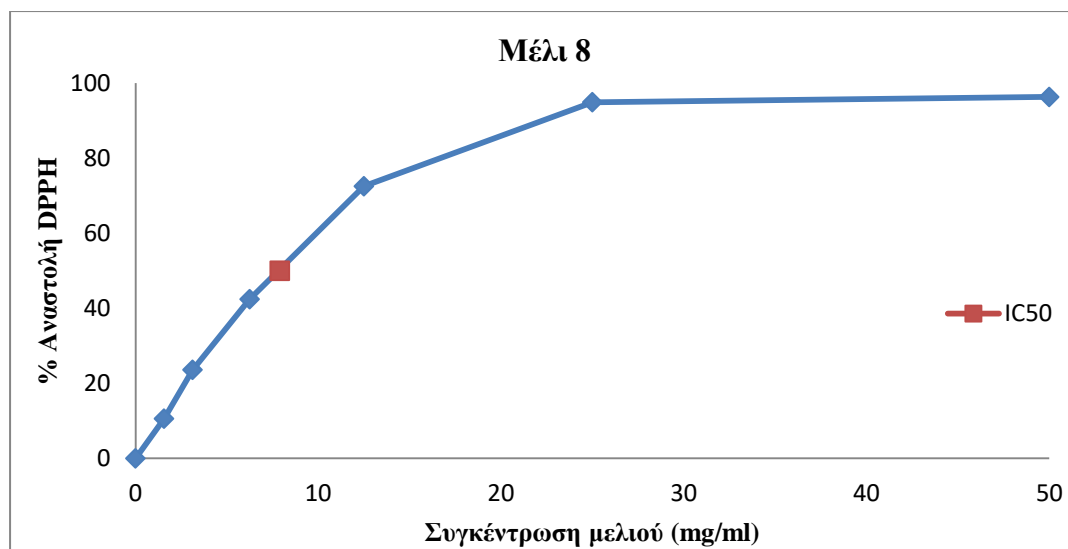
Σχήμα 6: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 3 (Σούσουρα, Άγιο Όρος 2018).



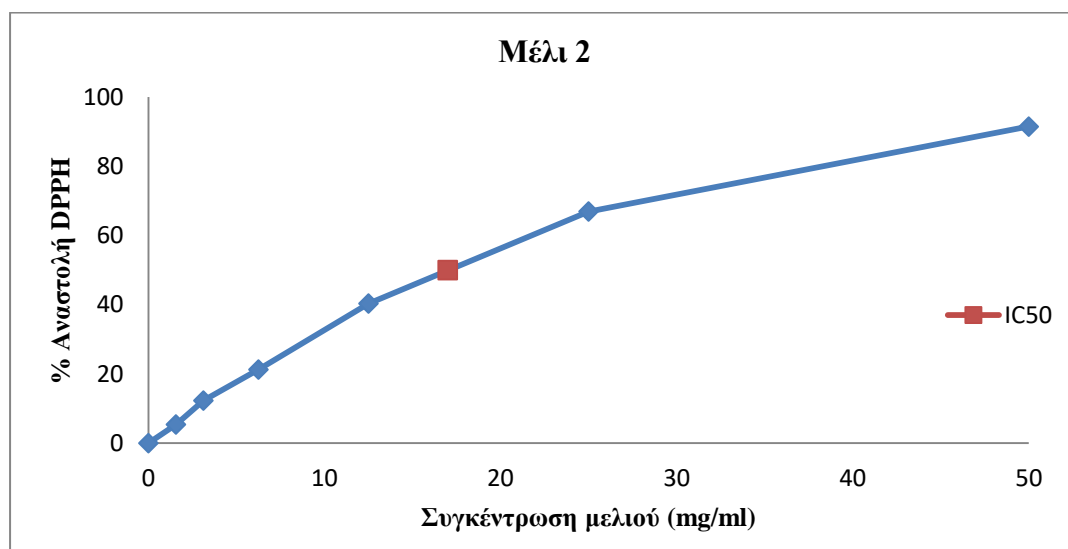
Σχήμα 7: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 4 (Κάστανο, Άγιο Όρος 2018).



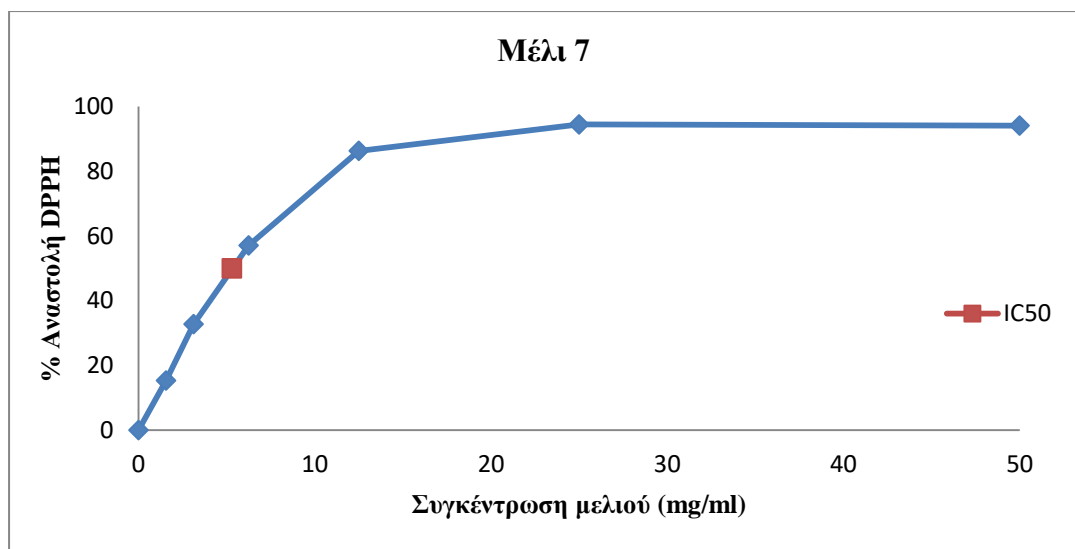
Σχήμα 8: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος 2017).



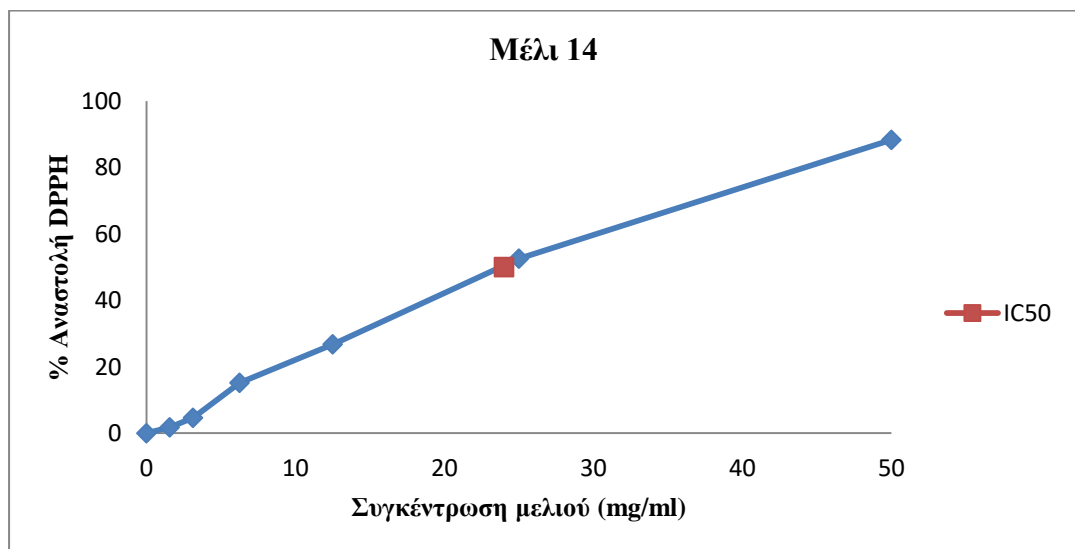
Σχήμα 9: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 8 (Κουμαριά, Νότιο Πήλιο).



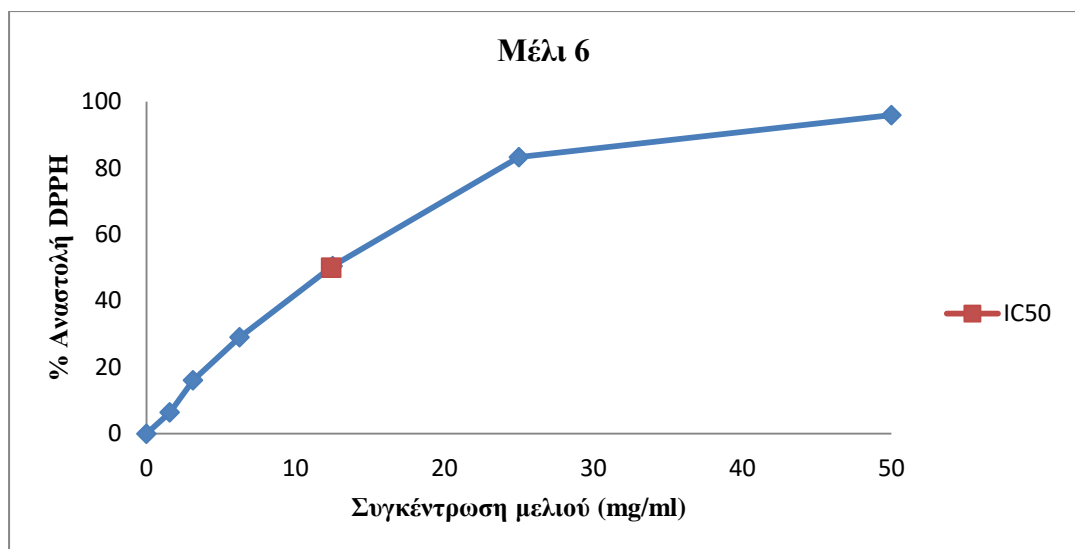
Σχήμα 10: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 2 (Κουμαριά, Άγιο Όρος 2018).



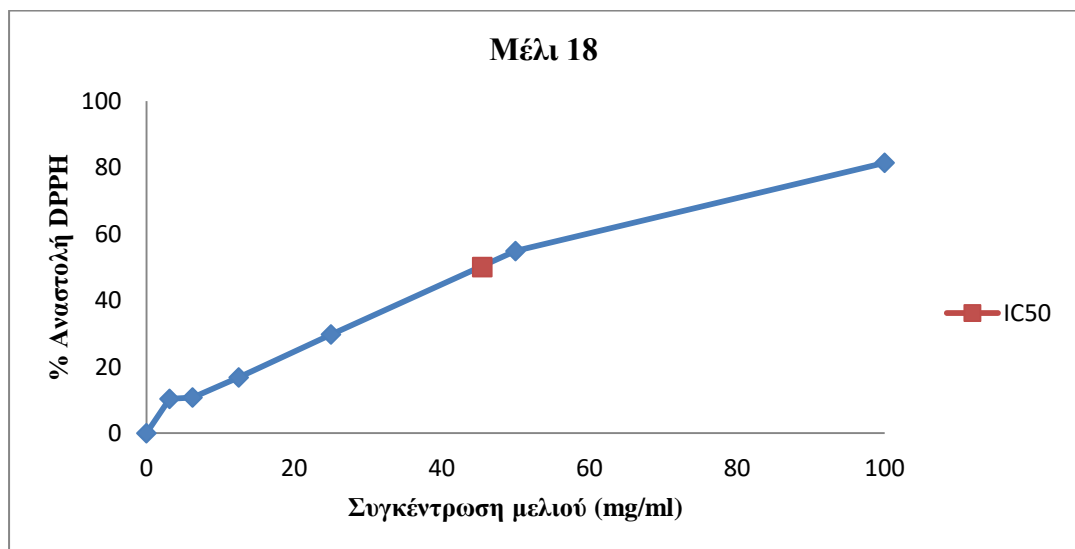
Σχήμα 11: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας).



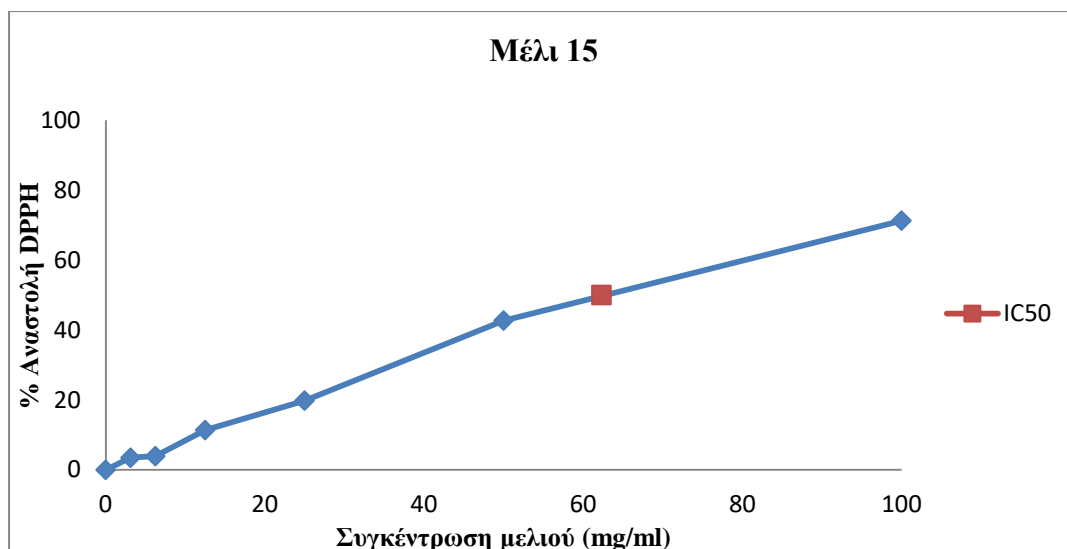
Σχήμα 12: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 14 (Γλυκάνισος, Ευβοίας, 2018).



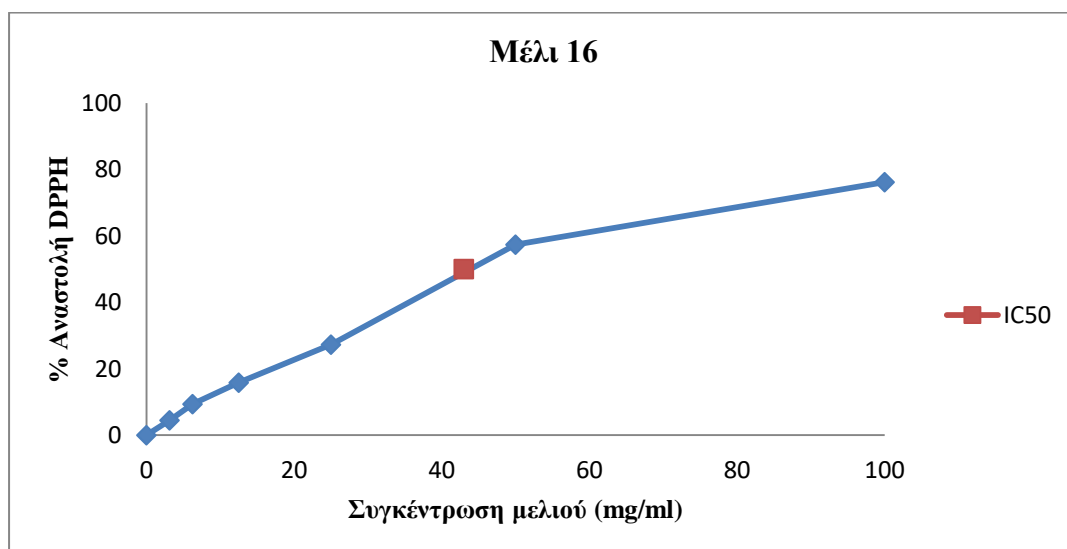
Σχήμα 13: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 6 (Πολυανθικό, Όλυμπος).



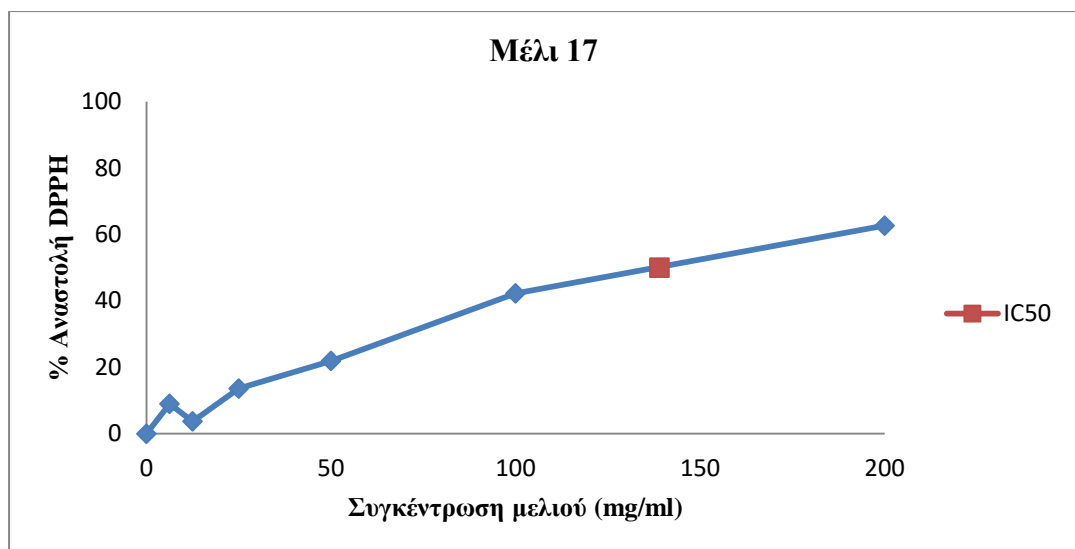
Σχήμα 14: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας).



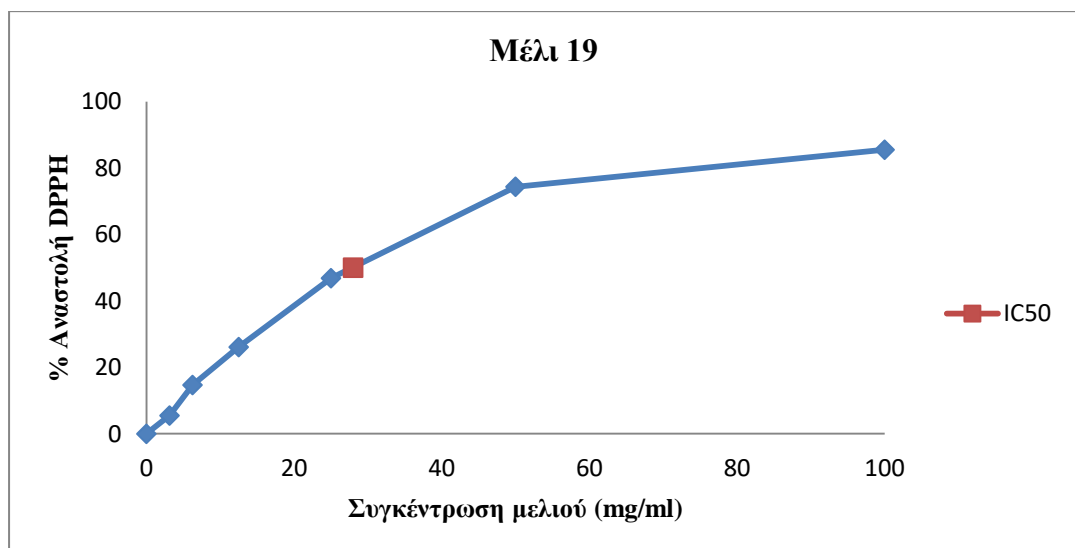
Σχήμα 15: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 15 (Πορτοκαλιά, Φιλοθέη Άρτας).



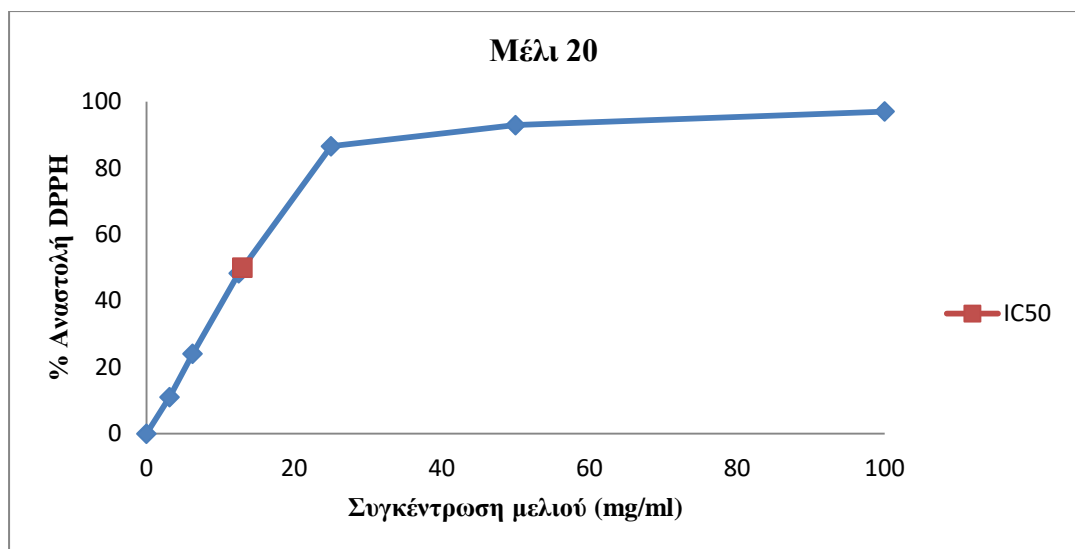
Σχήμα 16: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 16 (Ερρείκη, Προκόπι Ευβοίας).



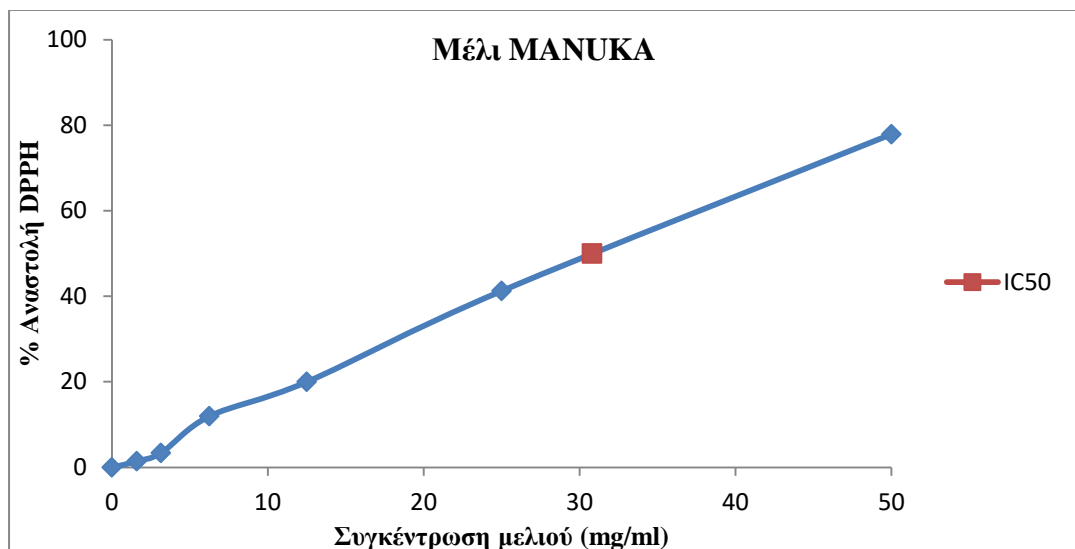
Σχήμα 17: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 17 (Αρωματικά φυτά, Βελεστίνο Μαγνησίας).



Σχήμα 18: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 19 (Κουμαριά, Βενέτα Μαγνησίας).

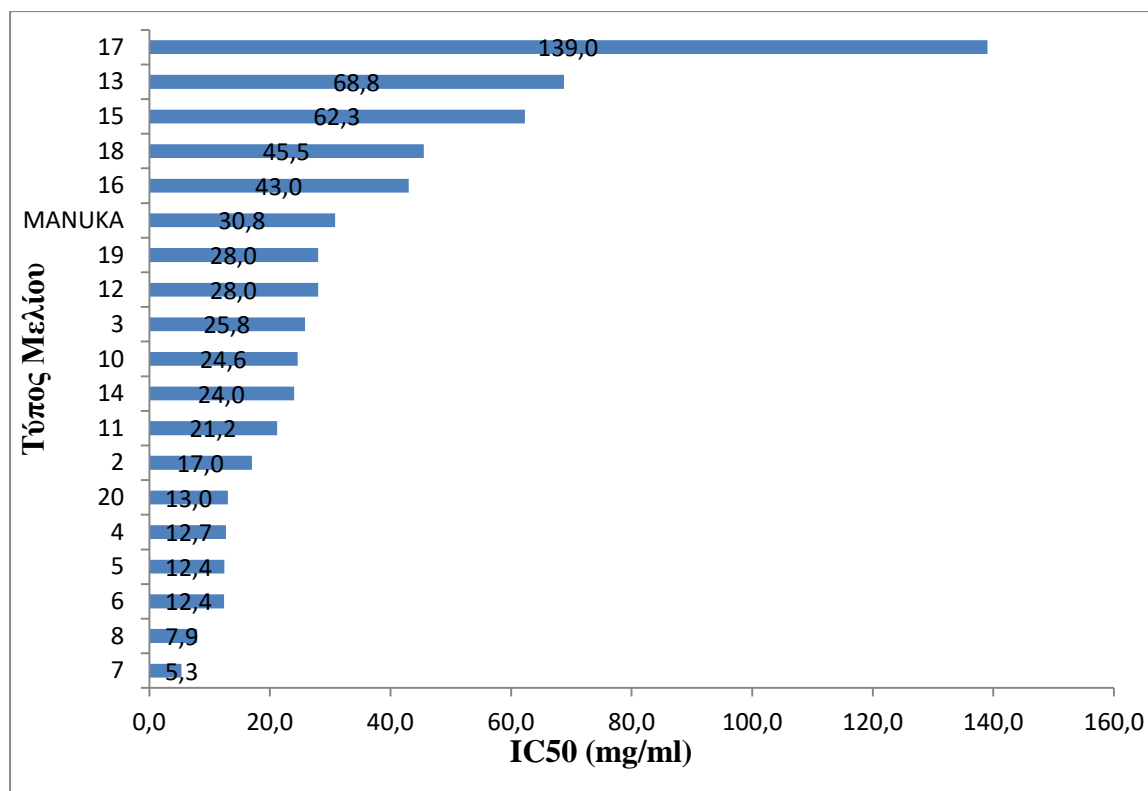


Σχήμα 19: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι 20 (Καστανιά, Ζαγορά Πηλίου).



Σχήμα 20: Η % αναστολή της ρίζας DPPH' από το μέλι αναφοράς, το μέλι Manuka.

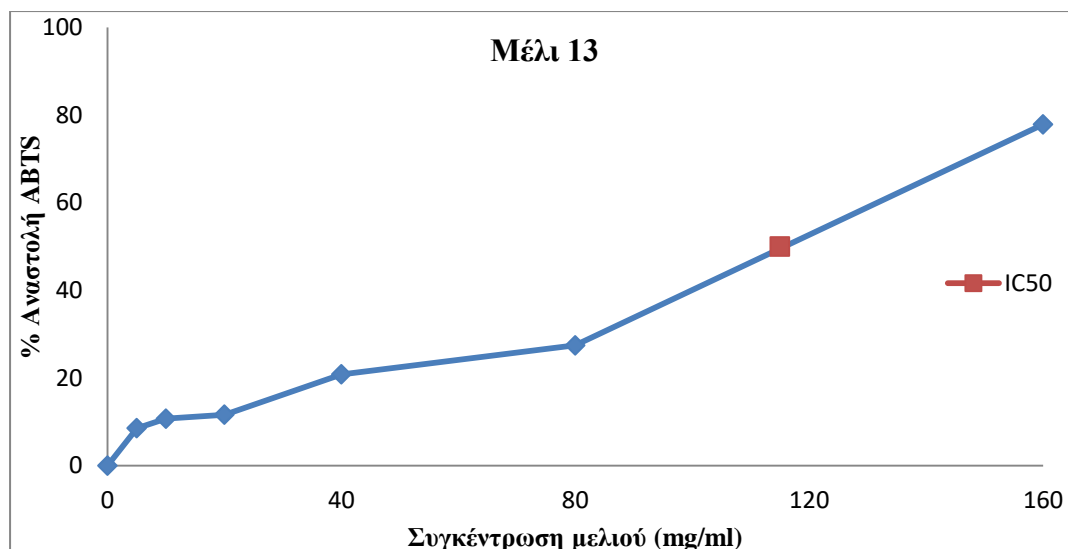
Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι τιμές των IC_{50} συνολικά για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν (Σχήμα 21) με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•.



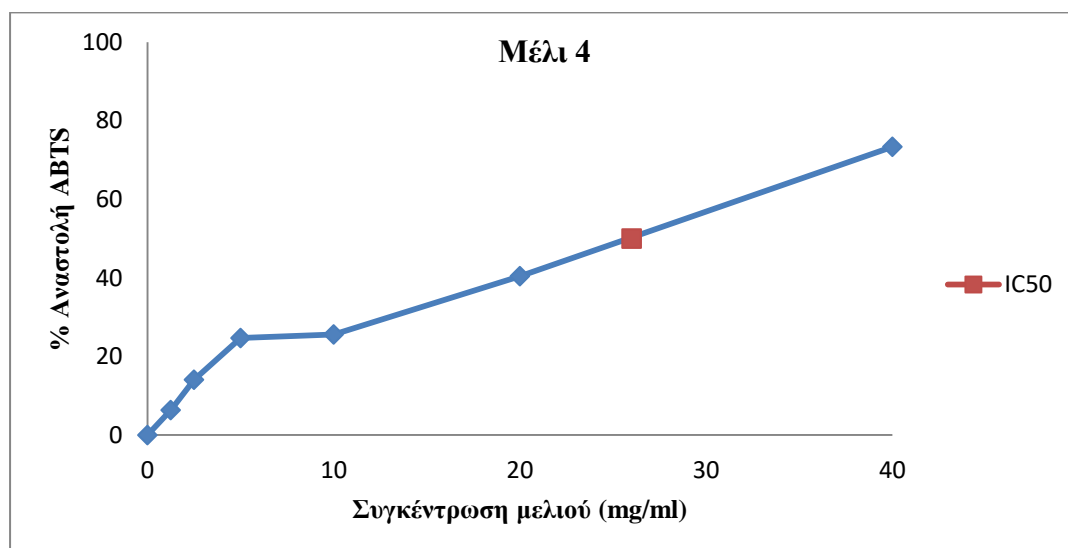
Σχήμα 21: Οι τιμές των IC₅₀ όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•.

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

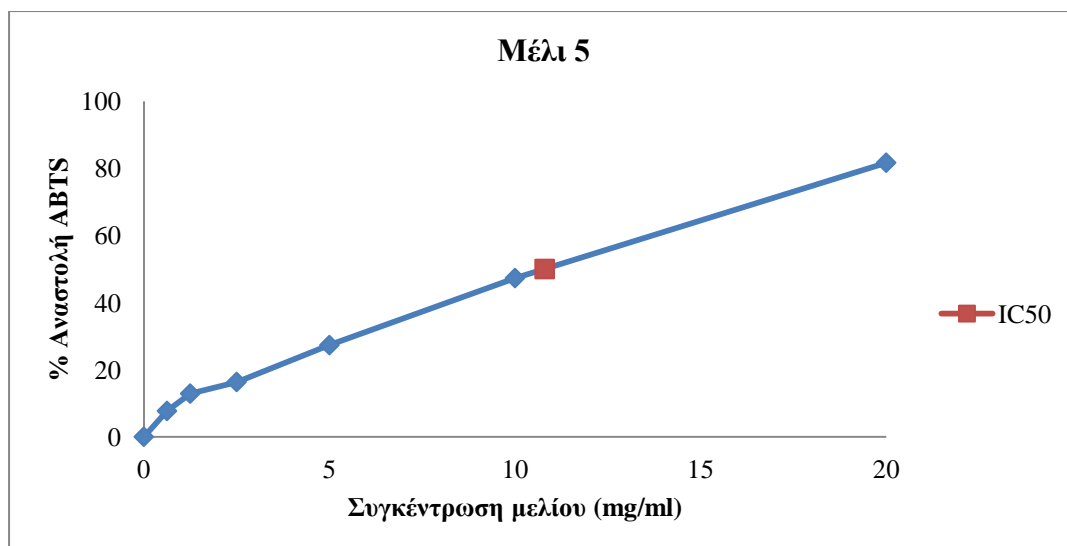
Συνολικά μελετήθηκαν 18 δείγματα μελιού και το μέλι αναφοράς, το μέλι Manuka. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μελιού που ερευνήθηκαν, κυμάνθηκαν από 0,31 έως 200 mg/ml. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμάνθηκε από 7,3 mg/ml έως 171 mg/ml. Το πιο ισχυρό δείγμα από αυτά που μελετηθήκαν, ήταν το μέλι 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας) και το πιο ασθενές ήταν το μέλι 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας). Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν την % αναστολή της ρίζας ABTS•+ από τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν (Σχήμα 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40).



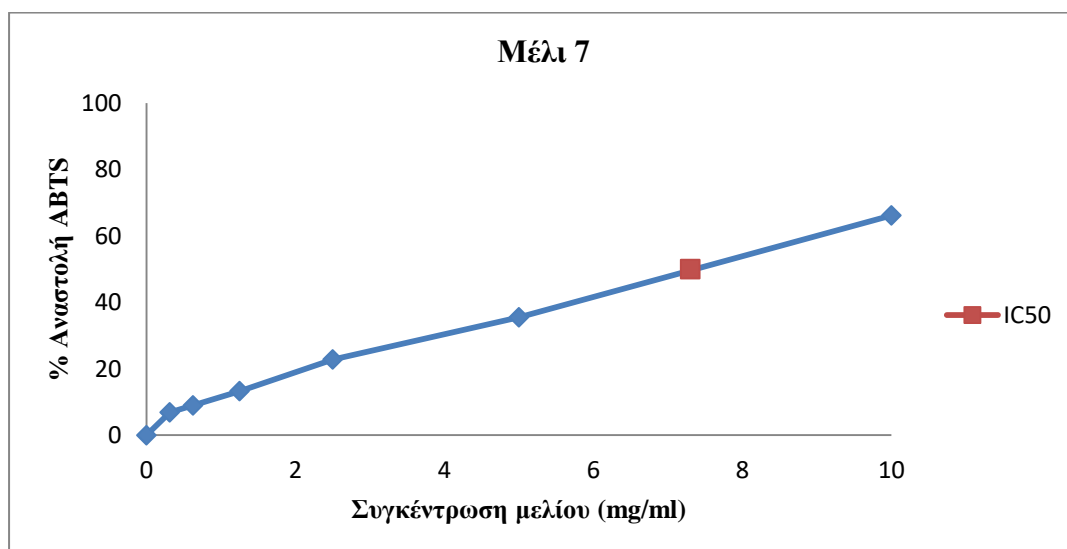
Σχήμα 22: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 13 (Θυμάρι, Γκιώνα).



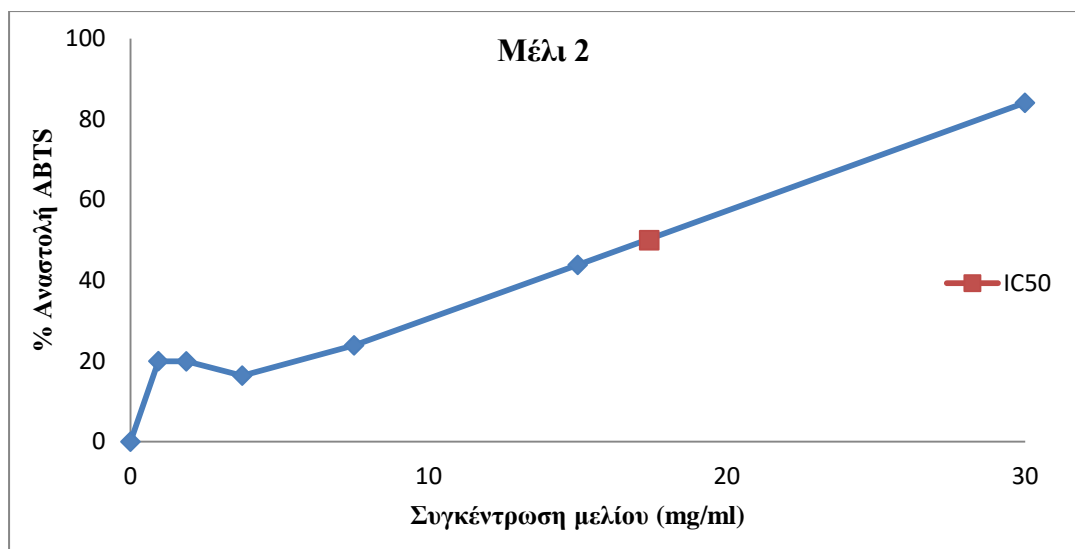
Σχήμα 23: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 4 (Κάστανο, Άγιο Όρος).



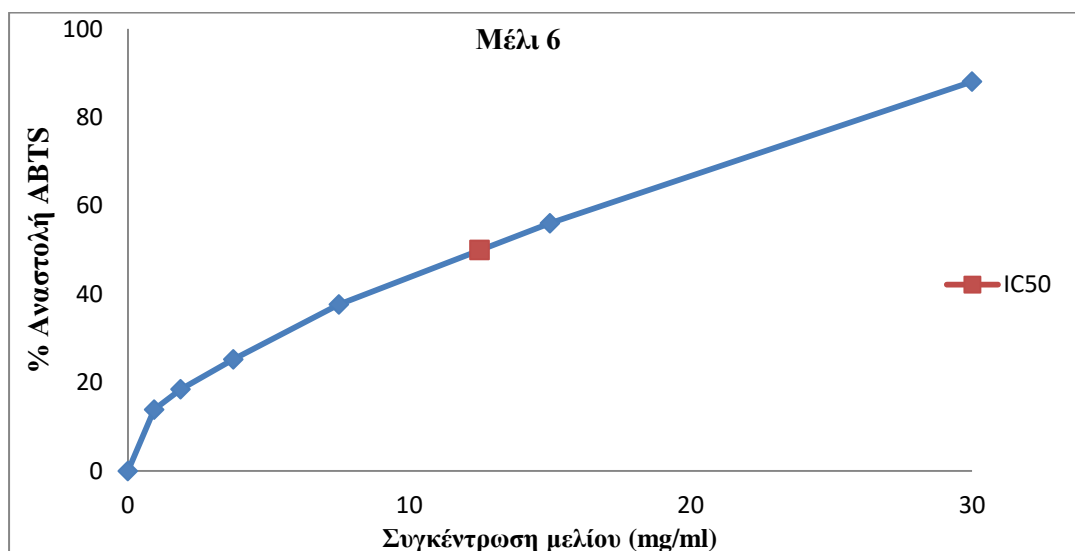
Σχήμα 24: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος, 2005).



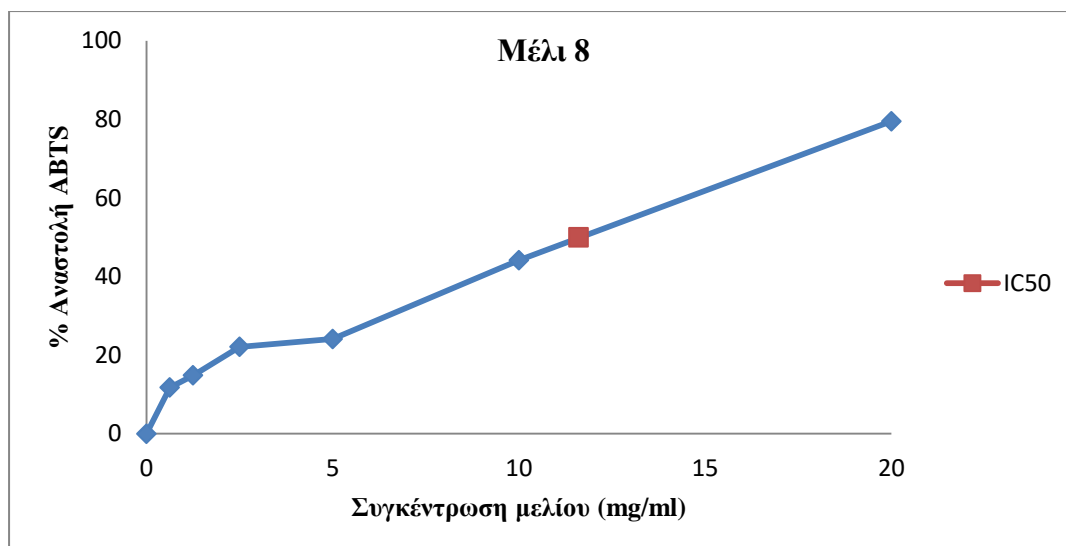
Σχήμα 25: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας).



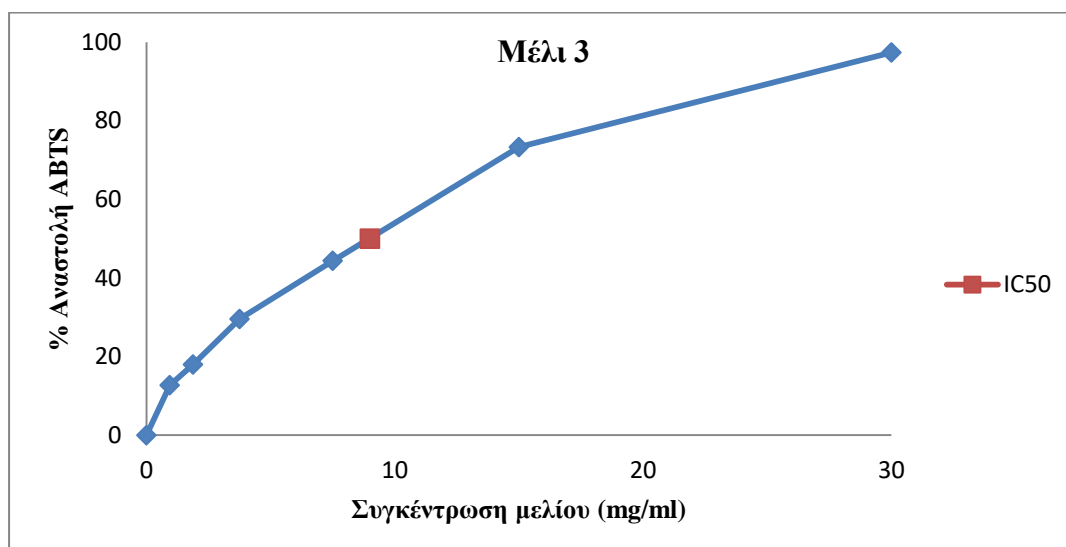
Σχήμα 26: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 2 (Κουμαριά, Άγιο Όρος, 2018).



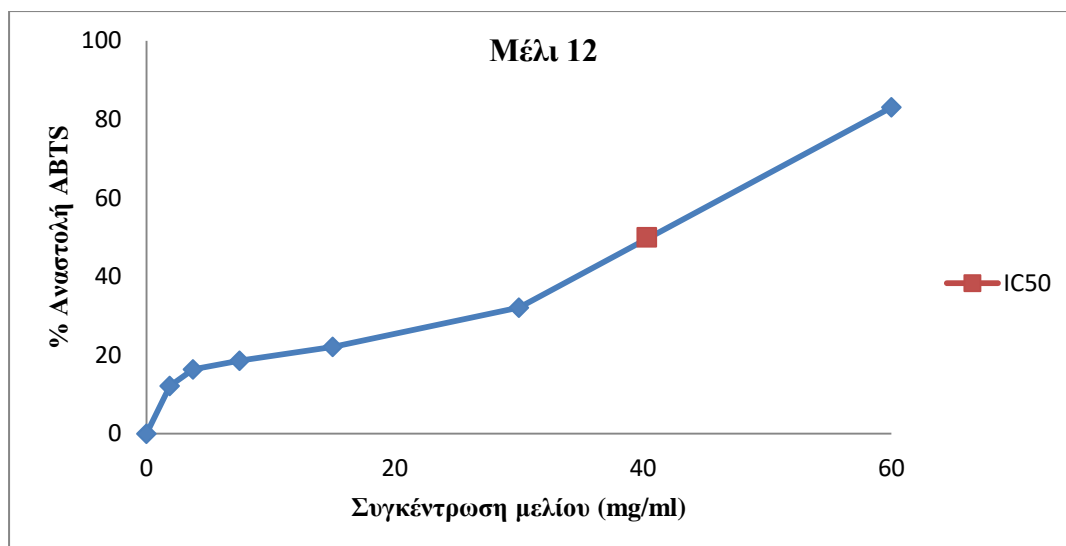
Σχήμα 27: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 6 (Πολυανθικό, Όλυμπος).



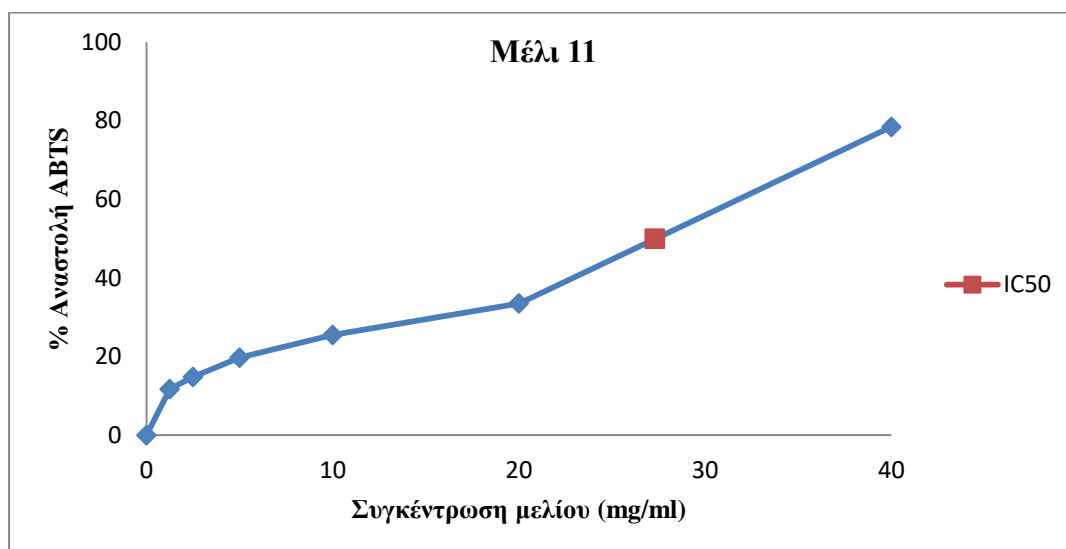
Σχήμα 28: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 8 (Κουμαριά, Νότιο Πήλιο).



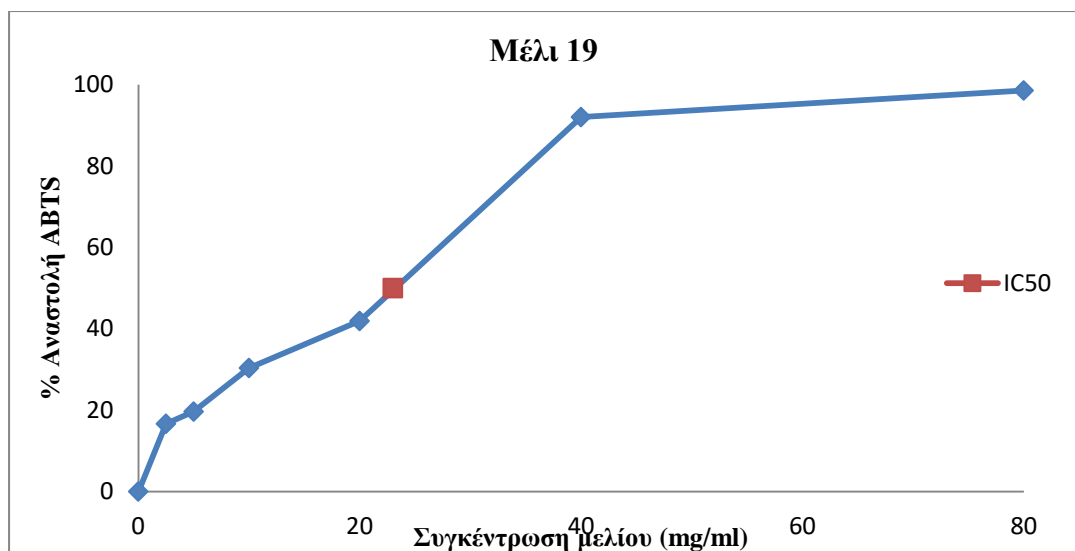
Σχήμα 29: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 3 (Σούσουρο, Άγιο Όρος, 2018).



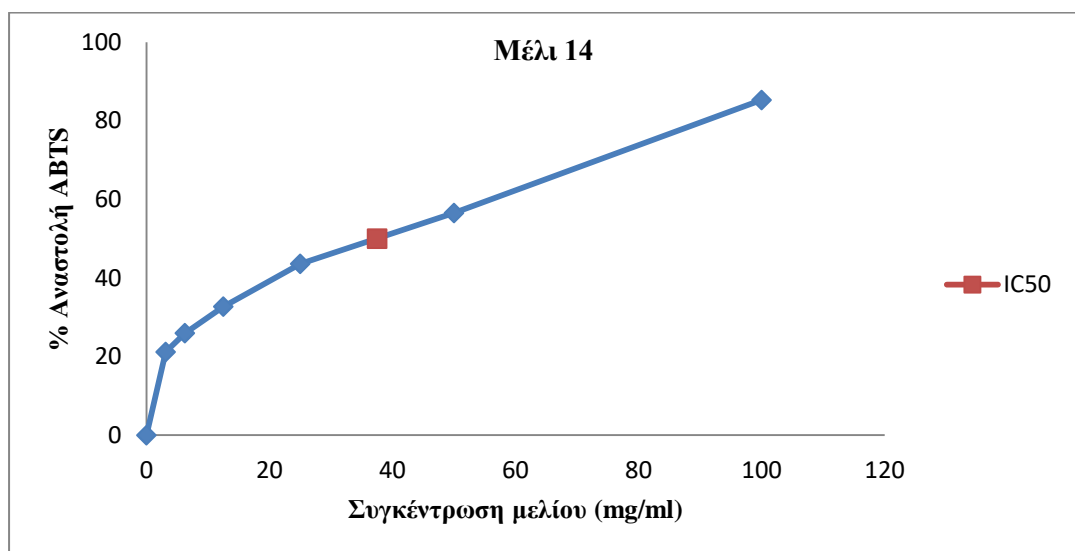
Σχήμα 30: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 12 (Πεύκο, Γκιώνα, 2018).



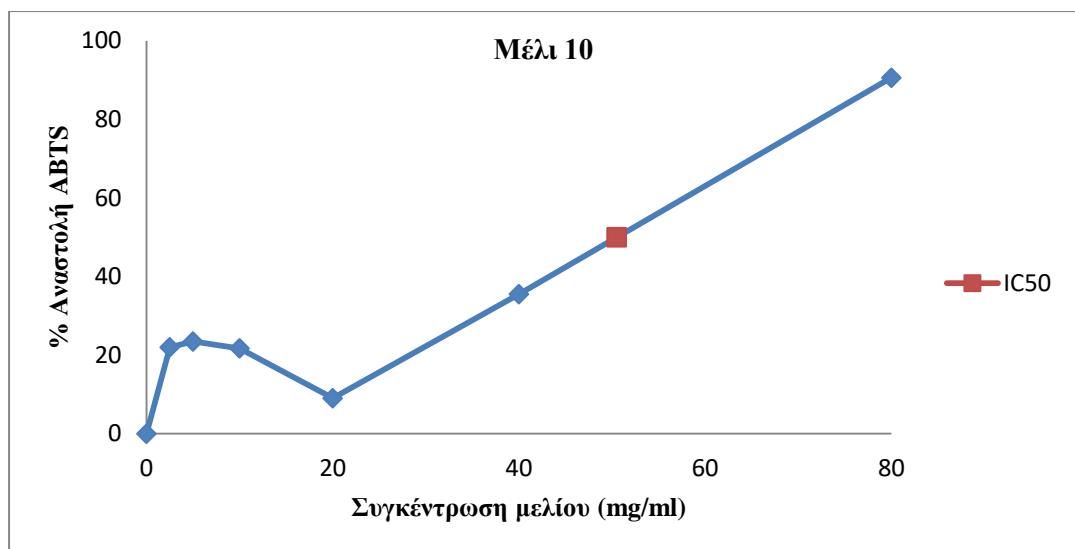
Σχήμα 31: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 11 (Πεύκο, Γκιώνα, 2017).



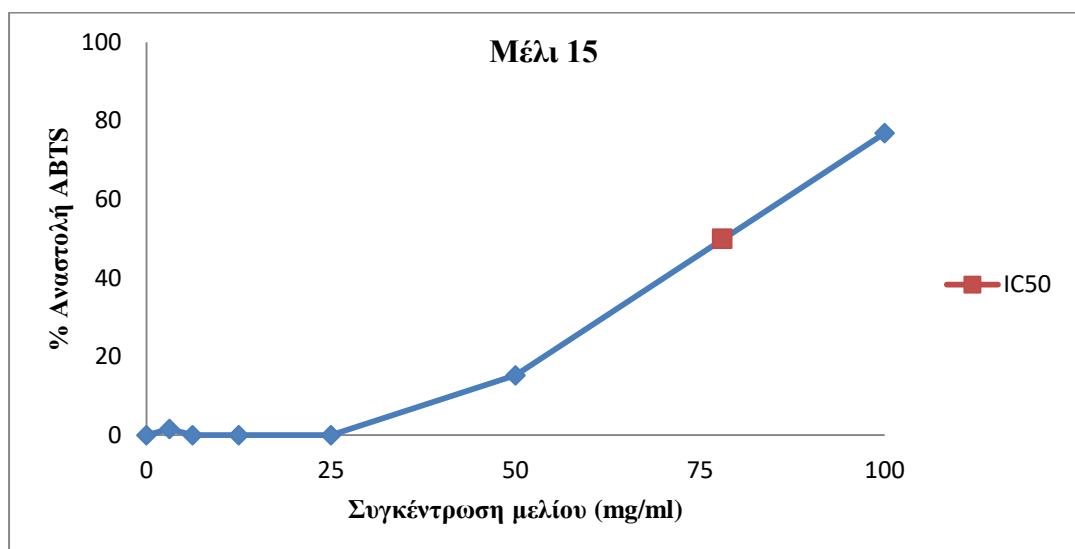
Σχήμα 32: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 19 (Κουμαριά, Βενέτα Μαγνησίας).



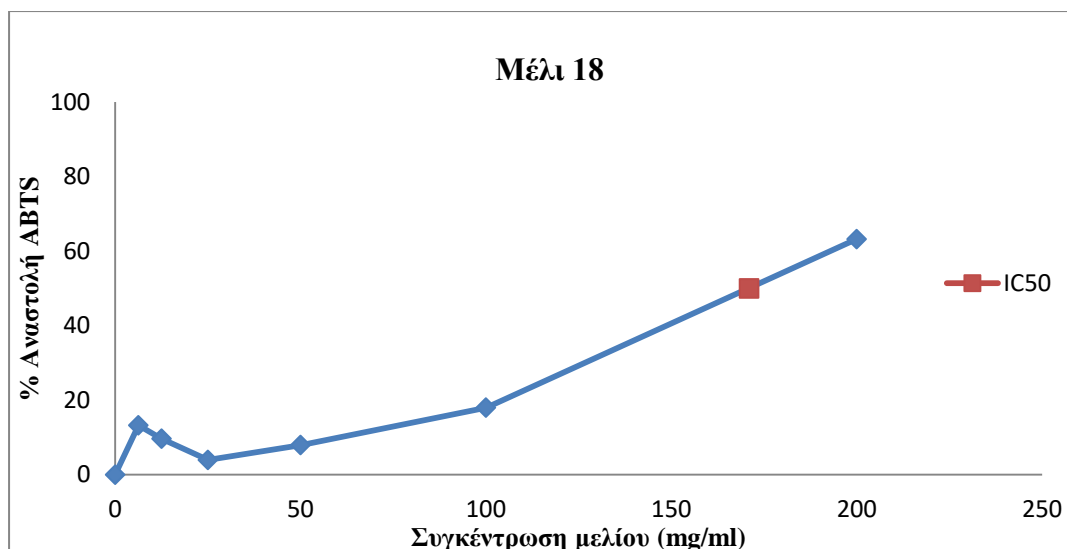
Σχήμα 33: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 14 (Γλυκάνισος, Ευβοίας, 2018)).



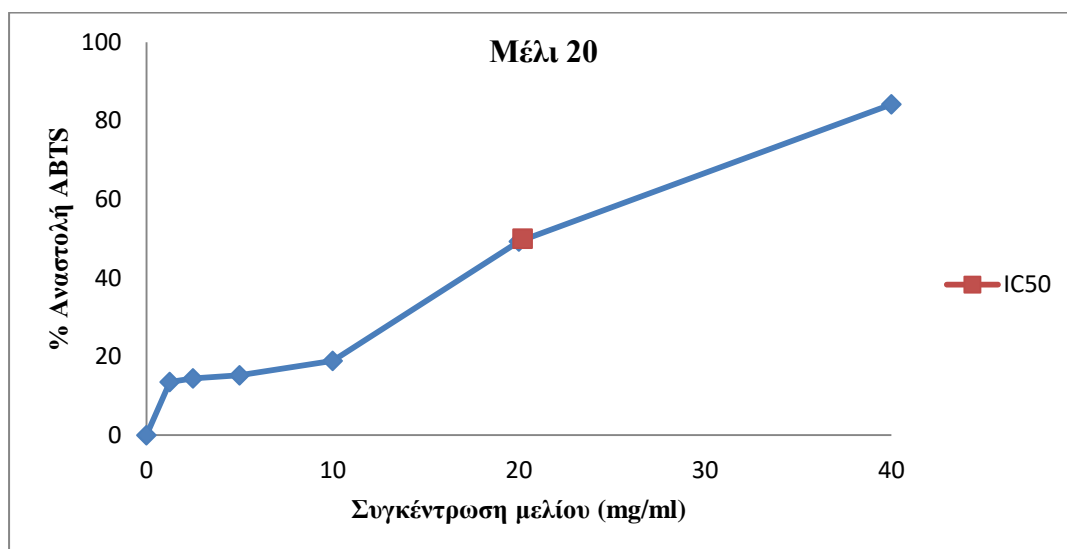
Σχήμα 34: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 10 (Θυμάρι – Πεύκο, Γκιώνα, 2017).



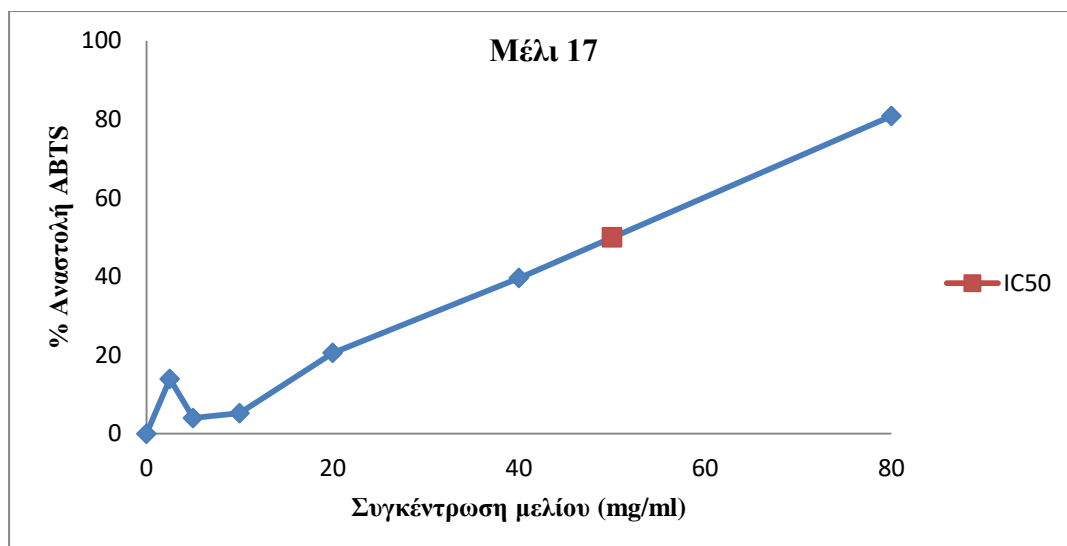
Σχήμα 35: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 15 (Πορτοκαλιά, Φιλοθέη Άρτας).



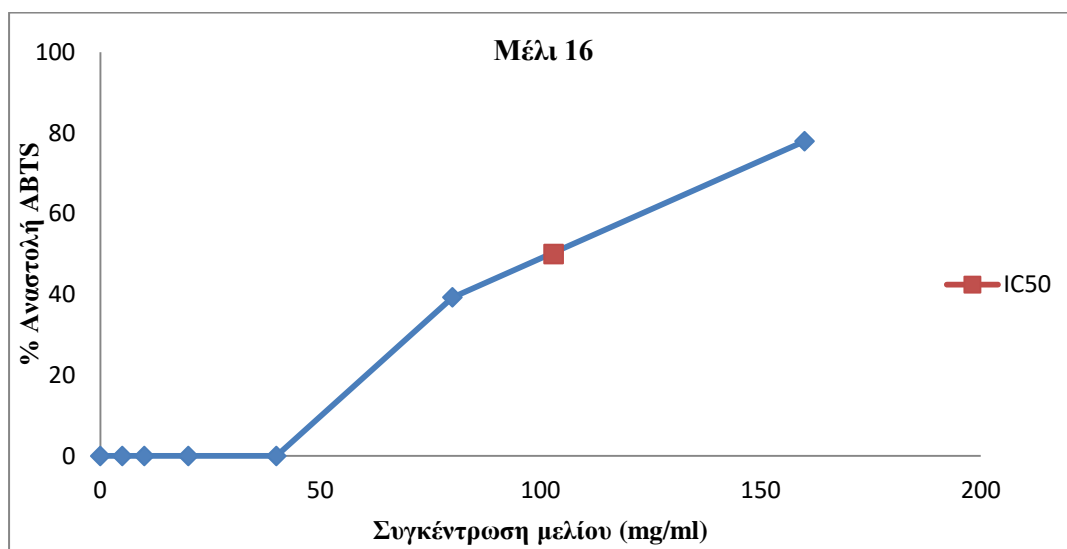
Σχήμα 36: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας).



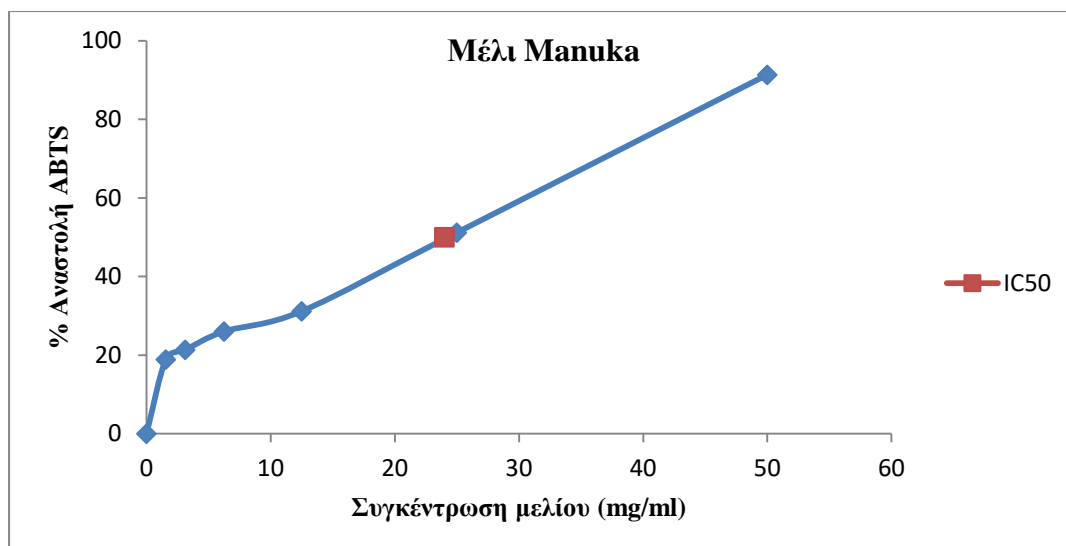
Σχήμα 37: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 20 (Καστανιά, Ζαγορά Μαγνησίας).



Σχήμα 38: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 17 (Αρωματικά Φυτά, Βελεστίνo).

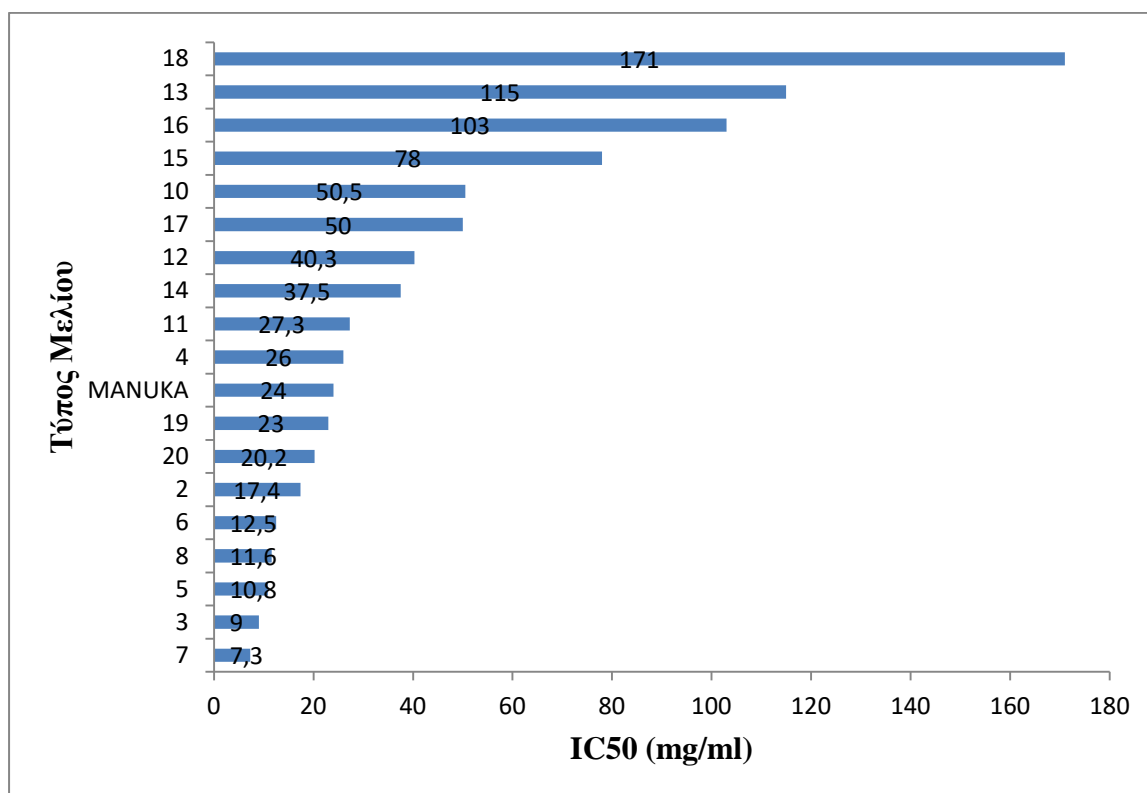


Σχήμα 39: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι 16 (Ερείκη, Προκόπι Ευβοίας).



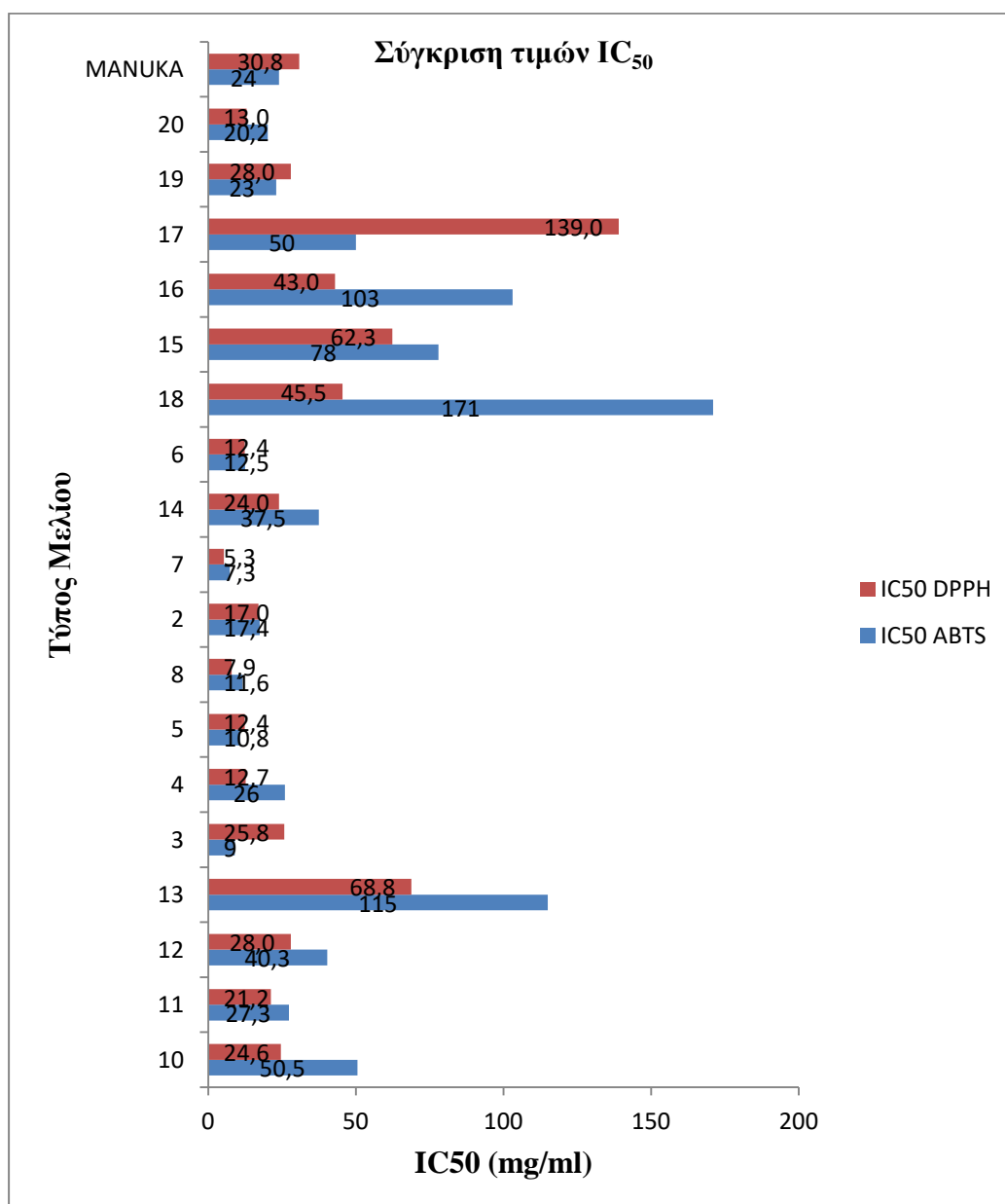
Σχήμα 40: Η % αναστολή της ρίζας ABTS^{•+} από το μέλι αναφοράς, το μέλι Manuka.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι τιμές των IC₅₀ συνολικά για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν (Σχήμα 41) με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}



Σχήμα 41: Οι τιμές των IC₅₀ όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH•.

Επίσης, παρουσιάζονται οι τιμές των IC₅₀ συνολικά για όλα τα δείγματα μελιού που μελετήθηκαν (Σχήμα 42) με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• καθώς και με τη ρίζα ABTS^{•+}.

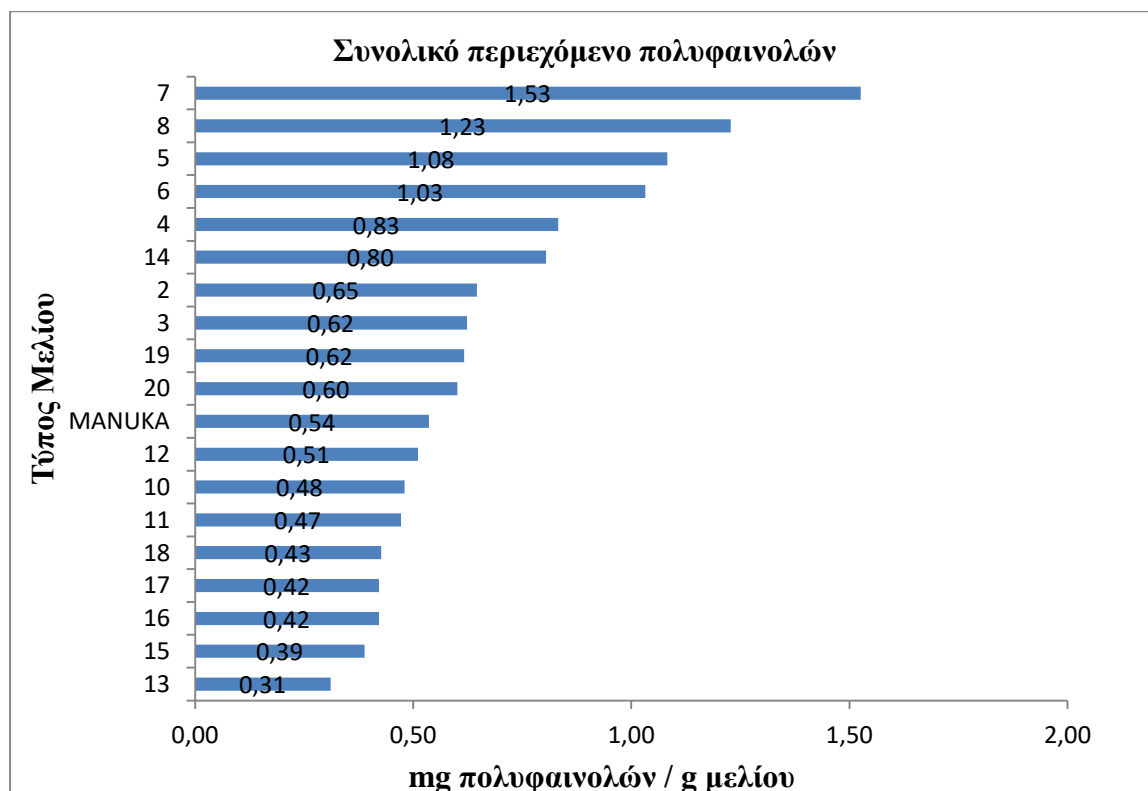


Σχήμα 42: Οι τιμές των IC₅₀ όλων των δειγμάτων που μελετήθηκαν με τη μέθοδο της αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH• και με τη ρίζα ABTS^{•+}.

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

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται το πολυφαινολικό περιεχόμενο όλων των δειγμάτων μελιών που μελετήθηκαν στη παρούσα μελέτη. Το εύρος των τιμών

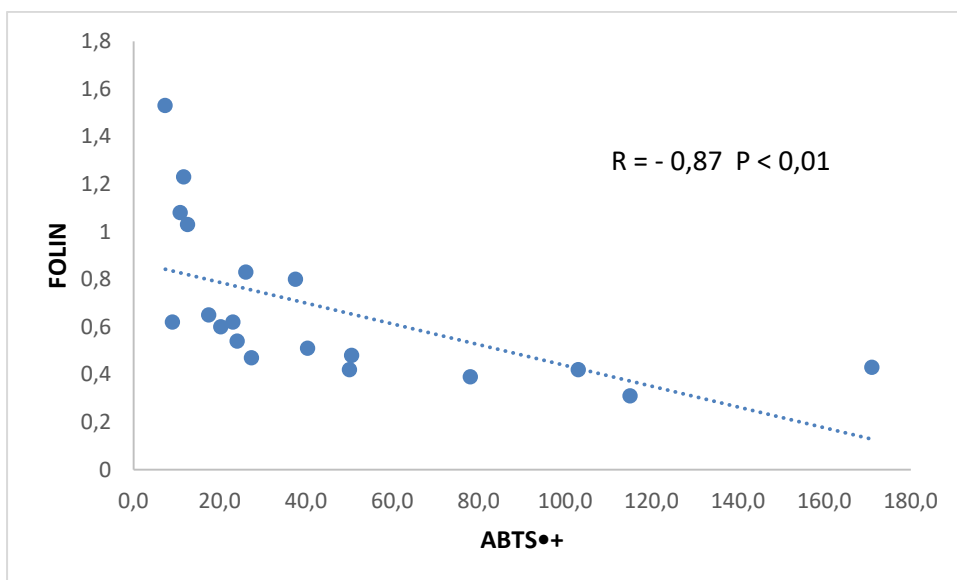
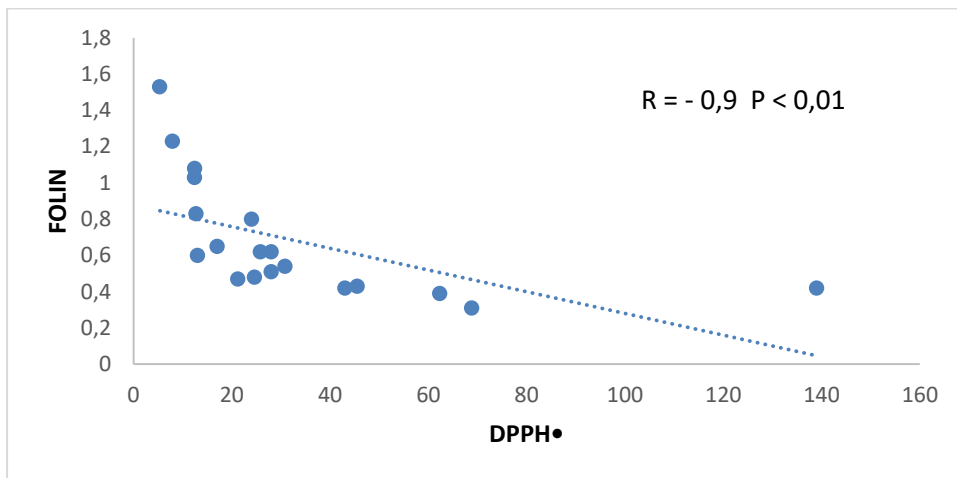
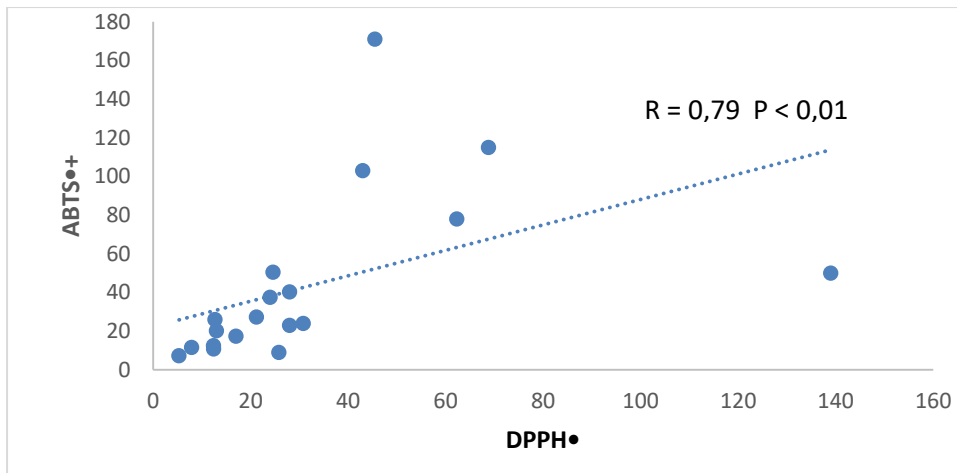
του συνολικού περιεχομένου των πολυφαινολών κυμάνθηκε από 0,31 έως 1,53 mg πολυφαινολών / g μελιού (Σχήμα 43).



Σχήμα 43: Συγκριτικές τιμές πολυφαινολικής σύστασης από όλα τα δείγματα μελιού.

3.4. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών των μεθόδων DPPH•, ABTS•+ και FOLIN.

Η ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman έδειξε μεγάλη συσχέτιση και στατιστικά σημαντική μεταξύ των μεθόδων DPPH• και ABTS•+ ($R = 0,79$, $p < 0,01$) (Σχήμα 44). Επίσης μεγάλη συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των μεθόδων DPPH• και FOLIN ($R = -0,9$, $p < 0,01$) καθώς και των μεθόδων ABTS•+ και FOLIN ($R = -0,87$, $p < 0,05$).



Σχήμα 44: Συσχετίσεις μεταξύ των τιμών των μεθόδων DPPH•, ABTS•+ και FOLIN.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται στα κύτταρα λόγω της παραγωγής ελεύθερων ριζών. Από την παραγωγή ελεύθερων ριζών προκαλούνται μεταλλάξεις στο DNA, καρκινογένεση και άλλες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως οι καρδιοπάθειες, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και η πρόωρη γήρανση (Wiseman, 1995). Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και τα πολυφαινολικά συστατικά που εμπεριέχονται (Torres et al, 2002, Stagos et. al., 2018, Alkan et. al., 2020).

Το μέλι είναι ένα γνωστό φυσικό προϊόν που εκτός από τις πολλές θρεπτικές ιδιότητες που κατέχει, έχει και αντιοξειδωτική δράση. Τα συστατικά του μελιού που είναι υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, ένζυμα, βιταμίνες καθώς και μικρή ποσότητα μακροστοιχείων (χαλκό και σίδηρος) (Meda, 2005, Erlund, 2004). Αναφέρεται επίσης, ότι η αντιοξειδωτική δράση του μελιού δεν οφείλεται σε μεμονωμένα συστατικά του αλλά στη δράση πολλών διαφόρων συστατικών που εμπεριέχει (Gheldof, 2000, Erejuwa, 2012).

Στη παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας από ελληνικά δείγματα μελιού. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας από μέλια, διαφορετικής προέλευσης, μέσω αλληλεπίδραση με την ελεύθερης ρίζας DPPH• και στη συνέχεια με την ελεύθερη ρίζα ABTS^{•+}.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα παρουσιάζουν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης τόσο με τη ρίζα DPPH• όσο και με τη ρίζα ABTS^{•+}.

Οι τιμές IC₅₀, είναι οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων τιμές οποίες εξουδετερώνεται το 50% των ελεύθερων ριζών, είναι ενδεικτικές της ικανότητας αναστολής κάθε εξεταζόμενου εκχυλίσματος. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζει το εκάστοτε δείγμα (Stagos et. al., 2018).

Αναλυτικότερα, τα δείγματα μελιού που εξεταστήκαν στη παρούσα εργασία εμφάνισαν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση εξουδετερώνοντας την ελεύθερη ρίζα DPPH•. Οι τιμές IC₅₀, με αυτή τη μέθοδο, κυμάνθηκαν από 5,3 mg/ml (δείγμα μελιού 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας)) έως 139,0 mg/ml (δείγμα μελιού 17, Αρωματικά

φυτά, Βελεστίνο, Μαγνησίας). Το μέλι αναφοράς MANUKA παρουσίασε IC₅₀ ίσο με 30,8 mg/ml. Όπως φαίνεται στο σχήμα 21, τα περισσότερα δείγματα παρουσίασαν υψηλότερη τιμή IC₅₀ σε σύγκριση με το μέλι αναφοράς MANUKA.

Από όλα τα εκχυλίσματα που εξεταστήκαν, μεγαλύτερη δράση εμφάνισαν τα δείγματα 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας), 8 (Κουμαριά, Νότιο Πήλιο), 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος, 2018) και 6 (Πολυανθικό, Όλυμπος). Οι τιμές IC₅₀, που εμφάνισαν τα δείγματα 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας) και 8 (Κουμαριά, Νότιο Πήλιο), είναι 5,3 mg/ml και 7,9 mg/ml αντίστοιχα ενώ τα δείγματα 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος, 2018) και 6 (Πολυανθικό, Όλυμπος) εμφάνισαν ίση τιμή IC₅₀ που ισούται με 12,4 mg/ml. Αντίθετα, η μικρότερη δράση έναντι της ρίζας DPPH• εμφανίστηκε από τα δείγματα 17 (Αρωματικά Φυτά, Βελεστίνο), 13 (Θυμάρι, Γκιώνα) και 16 (Ερείκη, Προκόπι Ευβοίας). Οι αντίστοιχες τιμές IC₅₀ των παραπάνω δειγμάτων ισούνται με 139 mg/ml, 68,8 mg/ml, 62,3 mg/ml.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων μελιού έναντι της ελεύθερης ρίζας ABTS^{•+}. Οι τιμές IC₅₀, με αυτή τη μέθοδο, κυμάνθηκαν από 7,3 mg/ml (δείγμα μελιού 7, Βελανιδιά, Ευβοίας) έως 171,0 mg/ml (δείγμα μελιού 18, Πεύκο, Προκόπι – Ευβοίας). Το μέλι αναφοράς MANUKA παρουσίασε IC₅₀ ίσο με 24 mg/ml. Όπως φαίνεται στο σχήμα 41, το μέλι αναφοράς MANUKA παρουσιάζει μέτρια αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η μεγαλύτερη δράση εμφάνισαν τα δείγματα 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας), 3 (Άγιο Όρος, Σούσουρο) και 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος, 2018). Αντίστοιχα οι τιμές IC₅₀ που εμφάνισαν τα παραπάνω δείγματα ισούνται με 7,3 mg/ml, 9 mg/ml και 10,8 mg/ml. Αντίθετα, η μικρότερη δράση εμφανίστηκε από τα δείγματα 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας), 13 (Θυμάρι, Γκιώνα) και 16 (Ερείκη, Προκόπι Ευβοίας). Αντίστοιχα οι τιμές IC₅₀ που εμφάνισαν τα παραπάνω δείγματα ισούνται με 171 mg/ml, 115 mg/ml και 103 mg/ml. Η τιμή του μελιού αναφοράς, μέλι Manuka, ισούται με 24 mg/ml.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το δείγμα 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας) έδειξε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ελεύθερων ριζών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη. Επίσης, το ίδιο ικανοποιητικό αποτέλεσμα έδειξε και το δείγμα 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος, 2018). Από την άλλη πλευρά, το μέλι 13 (Θυμάρι, Γκιώνα) παρουσίασε τη μικρότερη δράση απέναντι στις ελεύθερες ρίζες DPPH• και ABTS^{•+}.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε το πολυφαινολικό περιεχόμενο των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων λόγω του ότι η αντιοξειδωτική δράση του μελιού

οφείλεται κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που περιέχουν. Οι τιμές που αφορούν το συνολικό περιεχόμενο πολυφαινολών κυμάνθηκαν από 0,31 mg πολυφαινολών / g μελιού έως 1,53 mg πολυφαινολών / g μελιού. Το μέλι αναφοράς MANUKA παρουσίασε ικανοποιητική περιεκτικότητα πολυφαινολών, ίση με 0,54 mg πολυφαινολών / g μελιού.

Τα δείγματα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ήταν το δείγμα 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας), 8 (Κουμαριά, Νότιο Πήλιο) και 5 (Πολυανθικό, Όλυμπος, 2018) με τιμές 1,53 mg πολυφαινολών / g μελιού, 1,25 mg πολυφαινολών / g μελιού και 1,08 mg πολυφαινολών / g μελιού αντίστοιχα. Τα δείγματα, από την άλλη πλευρά, που εμφάνισαν τη μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ήταν το δείγμα 13 (Θυμάρι, Γκιώνα), 15 (Πορτοκαλιά, Φιλοθέη Άρτας) με τιμές 0,31 mg πολυφαινολών / g μελιού και 0,39 mg πολυφαινολών / g μελιού αντίστοιχα καθώς και το δείγμα 16 (Ερείκη, Προκόπι Ευβοίας) και 17 (Αρωματικά Φυτά, Βελεστίνο) που έδειξαν την ίδια περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, ίση με 0,42 mg πολυφαινολών / g μελιού.

Συμφώνα με τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το μέλι αναφοράς MANUKA είναι ένα μέλι το οποίο παρουσίασε μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα, τόσο με τη μέθοδο DPPH• και ABTS^{•+}, σε σύγκριση με τα ελληνικά μέλια που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η μελέτη των Stagos et. al. (Stagos et. al., 2018).

Στη παρούσα εργασία, τα δείγματα παρουσίασαν μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των δύο αντιοξειδωτικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό σημαίνει ότι στα περισσότερα δείγματα πιθανώς οι ίδιες ουσίες εξουδετερώνουν τόσο τη ρίζα DPPH όσο και τη ρίζα ABTS. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί, ότι σε κάποια δείγματα όπως στο δείγμα 17 (Αρωματικά Φυτά, Βελεστίνο) και 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας) παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στις τιμές IC₅₀ που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους. Αναλυτικά, η τιμή IC₅₀ από το μέλι 17 (Αρωματικά Φυτά, Βελεστίνο) ήταν 139 mg/ml και από το μέλι 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας) ήταν 45,5 έναντι της ρίζας DPPH•. Ενώ η τιμή IC₅₀ από το μέλι 17 (Αρωματικά Φυτά, Βελεστίνο) ήταν 50 mg/ml και από το μέλι 18 (Πεύκο, Προκόπι Ευβοίας) ήταν 171 έναντι της ρίζας ABTS^{•+}.

Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική αλληλεπίδραση των μελιών έναντι των ελεύθερων ριζών DPPH• και ABTS^{•+}. Συμφώνα με τους Floegel et. al. (Floegel et. al., 2011), τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά ανταποκρίνονται καλύτερα με τη μέθοδο

ABTS^{•+} σε σχέση με τη μέθοδο DPPH[•]. Συγκεκριμένα, στη μέθοδο DPPH[•], ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι η μεθανόλη και άρα αναμένεται να παρουσιάσουν δράση κυρίως μη πολικές ενώσεις. Από την άλλη, στη μέθοδο ABTS^{•+}, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το νερό. Έτσι αναμένεται να παρουσιάσουν δράση κυρίως υδρόφιλες ενώσεις. (Kreatsouli et. al. , 2019, Stagos et. al 2018).

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί, ότι στην παρούσα εργασία τα δείγματα μελιού παρουσίασαν σημαντική και μεγάλη διακύμανση όσο αφορά το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο αυτών. Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία οι τιμές του πολυφαινολικού περιεχομένου κυμάνθηκαν από 0,31 mg πολυφαινολών / g μελιού έως 1,53 mg πολυφαινολών / g μελιού. Ενώ στη μελέτη των Stagos et. al., οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,55 mg πολυφαινολών / g μελιού έως 0,92 mg πολυφαινολών / g μελιού (Stagos et. al., 2018).

Επίσης, στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε πολύ καλή συσχέτιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων μελιού και του συνολικού πολυφαινολικού περιεχομένου αυτών. Αυτό δείχνει ότι στα συγκεκριμένα δείγματα μελιού οι πολυφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική τους δράση. Ήτα χαρακτηριστικό ότι το δείγμα μελιού 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας) το οποίο παρουσίασε τόσο υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα όσο και το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Ενώ, το δείγμα μελιού 13 (Θυμάρι, Γκιώνα) παρουσίασε μικρή αντιοξειδωτική δράση και στις δυο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν και ταυτόχρονα κατέχει μικρό πολυφαινολικό περιεχόμενο.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το δείγμα μελιού 7 (Βελανιδιά, Ευβοίας) παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης τόσο με την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] όσο και με την ελεύθερη ρίζα ABTS^{•+} και ταυτόχρονα παρουσίασε το μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Γεγονός που πιθανόν δείχνει σχέση μεταξύ του πολυφαινολικού περιεχομένου που εμπεριέχεται στο συγκεκριμένο μέλι και της αλληλεπίδρασης του με τις ελεύθερες ρίζες. Είναι αξιοσημείωτο ότι σύμφωνα με τη μελέτη των Dudonne et. al. (2009), μεταξύ 30 επιλεγμένων φυτών που αναλύθηκαν, η βελανιδιά αποδείχτηκε να κατέχει υψηλές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Γενικότερα, η βελανιδιά είναι σημαντική πιθανή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών (Dudonne et. al., 2009).

Παρατηρήθηκε επιπρόσθετα σε αυτή τη εργασία ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού επηρεάζεται από τη φυτική προέλευση και ίσως παίζει σημαντικό ρόλο και η γεωγραφική θέση όπου παράγεται το μέλι. Συγκεκριμένα, το

μέλι 8 (Κουμαριά, Νότιο Πήλιο) και το μέλι 19 (Κουμαριά, Βένετο Μαγνησίας) παρουσίασαν διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα παρόλο που η φυτική προέλευση του μελιού είναι ίδια και διαφέρουν στη γεωγραφική θέση παραγωγής τους.

Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα μελιού 11 (Πεύκο, Γκιώνα, 2017) και 12 (Πεύκο, Γκιώνα, 2018), τα οποία ενώ έχουν την ίδια φυτική και γεωγραφική προέλευση, παρουσιάζουν διαφορετική αντιοξειδωτική δράση. Γεγονός που φανερώνει ότι στην αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μελιού παίζουν ρόλο και οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν και επηρεάζεται η χημική σύσταση του φυτού και επομένως του μελιού. Η μελέτη των Alkan et. al., αναφέρει ότι η αντιοξειδωτική δράση των μελιών και η φαινολική περιεκτικότητα μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη φυτική προέλευση, τη γεωγραφική προέλευση, την υγρασία, τη θερμοκρασία, το κλίμα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Alkan et. al., 2020). Το παραπάνω έρχεται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα αυτής της εργασίας.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα ελληνικά δείγματα μελιού έχουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση που πολλές φορές είναι ανώτερη του διεθνώς αναγνωρισμένου μελιού Manuka. Επίσης, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα έχουν διάφοροι παράγοντες όπως η φυτική προέλευση του μελιού καθώς και οι εδαφοκλιματολογικές συνθήκες. Γενικότερα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την υψηλή ποιότητα ελληνικών δειγμάτων μελιού και καθιστούν αναγκαίες περαιτέρω μελέτες, ώστε να αναδειχτούν αυτά τα ανώτερα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά προσδίδοντάς τους επιπλέον προστιθέμενη αξία

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση

- Alkan S., Akgun M., Erturk O., Ayvaz M., Baskan C. (2020) Properties of Honey and Pollen Samples Obtained from Different *Rhododendron* Species Collected from Black Sea Region of Turkey, Journal of Agricultural Science.
- Andersen O., Markham K. (2006). Flavonoids chemistry, biochemistry and applications; In Separation and quantification of flavonoids, Taylor & Francis: New York.
- Antunes F., Derick H., Cadenas E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. Free Rad Biol Med 33: 1260-7
- Belitz H. D., Grosch W., Scieberle P. (2004). Food Chemistry. Springer Science & Business Media.
- Bogdanov S. (2008). Storage, Crystallisation and Liquefaction of Honey. Bee Product Science, pp. 1-5.
- Brand- Williams W.; Cuvelier M.E. & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wiss und-Technology, 28: 25.
- Cammack P.L., Edie R.N., Edmunds L.H . (1987). Bar calcification of the mitral anulus. A risk factor in mitral valve operations. Jr. J Thorac Cardiovasc. 94(3):399-404.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 59: 527-605.
- Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry: Ends free radicals in medicine, British Medical bulletin, vol 49, 481-93.
- Cooper R.A., Halas E., Molan P.C. (2002). The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. J Burn Care Rehabil. Nov-Dec;23(6):366-70.
- Cotgreave I.A., Moldeus P., Orrenius S. (1988). Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. Annu Rev Pharmacol Toxicol 28: 189-212.
- Crane E. (1990). The traditional hive products: honey and beeswax. Bees and Beekeeping, Ed. By E. Crane. Chapter 13: pp. 388-389.
- Crane F. (2001). Biochemical Functions of Coenzyme Q10. Journal of the American college of Nutrition 20(6): 591 – 598.

- Dudonne S., Vitrac X., Coutiere P., Woillez M., Merillon J. (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays, *Journal Of Agriculture and Food Chemistry* 57:5,1768-1774.
- Efem S. E. (1988). Clinical observations on the wound healing properties of honey. *Br. J. Surg.*, 75, 679-681.
- Erejuwa O.O., S.A. Sulaiman, and M. S. Wahab. (2012). Honey: a novel antioxidant,” *Molecules*, vol. 17, no. 4, pp. 4400–4423.
- Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, *Nutrition Research*, vol. 24, no. 10, pp. 851–874.
- Eschriche I., Visquert M., Carot M., Domenech E., Fito P. (2008). Effect of Honey Thermal Conditions on Hydroxymethylfurfural Content Prior to Pasteurization. *Food Sci Tech Int*, pp. 029–035.
- Escuredo O., Dobre I., Fernández-González M., Seijo M. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, pp. 84–90.
- Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S., Chun O. (2011) Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *Journal of Food Composition and Analysis* 24:7(1043-1048).
- Fuchs L. (2003). Assessing Intervention Responsiveness: Conceptual and Technical Issues. *Learning Disabilities*, 172 – 186.
- Gheldof N., X. Wang, and N. J. Engeseth. (2000). 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.
- Gheldof N., X. Wang, and N. J. Engeseth. (2002). 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.
- Gilbert D.L. (200). Fifty years of radical ideas, *Ann NY Acad Sci*, 899:1.
- Gropper S., Smith J., Groff J. (2008). Διατροφή & Μεταβολισμός. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Gul A. and Pehlivan T., (2018). Antioxidant activities of some monofloral honey types produced across Turkey. *Saudi journal of Biological Sciences*, pp.1-10.

- Gutteridge J.M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41(12 Pt 2):1819-28.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview”, in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme* bgy 186.
- Halliwell B. (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
- Halliwell B. (2001). Free Radicals and other reactive species in Disease, National University of Singapore.
- Halliwell B. (2007) Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiov Res* 73: 341-347.
- Halliwell B., Gutteridge M.C. (1998) Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications Third Edition.
- Harris C., Hansen J.M. (2012) Oxidative Stress, Thiols and Redox Profiles. *Methods in Molecular Biology*, 889, 325 – 346.
- Hellsten Y., Apple S., Sjödin B. (1996). Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81, 1484 – 1487.
- Hermosín I., Chicón R., Cabezudo M. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, pp. 263–268.
- Hooper T. (2010). *Guide to bees & honey: the world’s best selling guide to beekeeping.*
- Kamal M., Klein P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, pp. 17–21.
- Kántor Z.; Pitsi G.; Thoen J. Glass (1999). Transition Temperature of Honey as a Function of Water Content as Determined by Differential Scanning Calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2327 – 2330.
- Karabagias I., Vavoura V., Nikolaou C., Badeka V., Kontakos S., Kontominas G. (2014). Floral authentication of Greek unifloral honeys based on the combination of phenolic compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Research International*, pp. 753–760.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in

multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143.

- Kreatsouli K , Fousteri Z, Zampakas K , Kerasioti E, Veskoukis A.S, Mantas C. Gkoutosidis P, Ladas D, Petrotos K, Kouretas D and Stagos D. A Polyphenolic Extract from Olive Mill Wastewaters Encapsulated in Whey Protein and Maltodextrin Exerts Antioxidant Activity in Endothelial Cells. *Antioxidants* (2019), 8, 280.
- Kwakman P.H., Van den Akker J.P., Güçlü A, Aslami H., Binnekade J.M., de Boer L., Boszhard L., Paulus F., Middelhoek P, te Velde A.A., Vandenbroucke-Grauls C.M., Schultz M.J., Zaat S.A.. (2008). Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. *Clin Infect Dis.* 1;46(11):1677-82. doi: 10.1086/587892.
- Linnane W., Zhang C., Yarovaya N., Kopsidas G., Kovalenko S., Papakostopoulos P., Eastwood H., Graves S., Richardson M. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci.*
- Lubrano V. & Balzan S. (2015). Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World Journal of Experimental Medicine:* 5(4): 218-224.
- Majno G. (1975). *The Healing Hand. Man and Wound in the Ancient World.* Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, 571.
- Masters C., Pegg M., Cranc D. (1986). On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70: 113-120.
- Mato I., Huidobro J., Simal-Lozano J., Sancho M. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1541–1550.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2-14: 6049-6055.
- Meda A., C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, and O. G. Nacoulma. (2005). 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.
- Meister A., Anderson M.E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-60.

- Michiels C., Raes V., Toussaint O., Remacle J. 1994 Importance of Seglutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 17: 235-248.
- Miguel M., Antunes M. Faleiro M. (2017). Honey as a Complementary Medicine. *Integr Med Insights*.
- Miller, N.; Diplock., A.T. & Rice-Evans, C. (1995). Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice in storage. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1794.
- Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. (2001). Antioxidative activitiew of some commercially honeys, royal jelly and propolus, *Food Chemistry* 75(2): 237 – 240.
- Otmani I., Abdennour C., Dridi A., Kahalerras L. and Halima-Salem A., (2019). Characteristics of the bitter and sweet honey from Algeria Mediterranean coast. *Veterinary World*, pp. 551-557.
- Palmer S., Tubbs I., Whybrow W. (2003). Health coaching to facilitate the promotion of healthy behaviour and achievement of health-related goals. *International Journal of Health Promotion and Education*, 41, 3, 91-93.
- Pisoschi A. & Pop A. (2015) The role of antioxidants an the chemistry og oxidative stress: A rewineu. *Eur. J. Med Chem.* 5; 97: 55 – 74.
- Powers SK, Lennon SL. (2002). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58: 1025-33.
- Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D. A., Tsatsakis, A. M., ... Kouretas, D. (2015). Com arison of antio idant activit etween green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 7293–7302.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-302
- Rebane R., Herodes K. (2010). A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta*, pp. 79–84.

- Saric G., Markociv K., Vukicevic D., Lez E., Hruskar M. and Vahcic N. (2013). Changes of Antioxidant Activity in Honey after Heat Treatment. *Czech J. Food Sci*, pp. 601–606.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 287–306.
- Scholz, R.W. Graham K.S. Gumpricht E. Reddy C.C. (1989). «Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation». *Ann NY Acad Sci* 570: 514–7.
- Stagkos D., Soultisiotis N., Tsadila C., Papaconomou, Arvanitis C., Ntontos A., Karkanta F., Adamou S., Petropoulos K., Spandidos D., Koyretas D., Mossialos D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International Journal of Molecular Medicina* 42: 726 – 734.
- Thrasyvoulou, A. and Manikis, I. (1995). Some physicochemical and microscopic characteristics of Greek unifloral honeys. *Apidologie*, pp. 441-452.
- Tomasik P. (2004). Chemical and Functional properties of food. Cap 6. Helena Rybak – Chmielewska p. 77.
- Tornuk F., Karaman S., Ozturk I., Toker O., Tastemur B., Sagdic O., Dogan M., Kayacier A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, pp. 124–131.
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R. (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem.* 50: 7548–7555
- Velasquez P., Rodriguez K., Retamal M., Giordano A., Valenzuela L. and Montenegro G. (2017). Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multi-floral bee pollen. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, pp. 306 – 314.
- Wayner M., Burton W., Ingold U., Barclay C., Locke J. (1987): The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy trapping

antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 7408 ± 419.

- Weston CE, Feibelman MB, Wu K, Simon EE. (1999). Effect of oxidant stress on growth factor stimulation of proliferation in cultured human proximal tubule cells. *Kidney Int.* Oct;56(4):1274-6. Review.
- White, J.W. (1979). Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Vol. 62, pp. 509-514.
- Whitmire K., Eam B., Benning N., Whitton L. (2007). Direct interferon-gamma signaling dramatically enhances CD4+ and CD8+ T cell memory. *J Immunol.* 179(2):1190-7.
- Wilkins A. & Yinrong L. (1995). Extractives from New Zealand Honeys. 5. Aliphatic Dicarboxylic Acids in New Zealand Rewarewa (*Knigthea excelsa*) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 12, 3021 – 3025.
- Wilson RL. (1978). Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In *biochemical mechanism of liver injuries*”, New York Academic Press: 123-224.
- Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B. (1995). DNA damage and cancer: measurement and mechanism, *Cancer Lett.* 93:113–120.
- Witt E., Reznick A., Viguie C., Starke – Reed P., Packer L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.*
- Zumla A., & Lulat A. (1989). Honey-a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82, 384-385.

Ελληνόγλωσση

- Γιανακοπούλου E. (2009). Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, Κληνική σημασία. Athens Medical Society, Athens.
- Γούναρη, Σ., (2004). Η ωφελιμότητα των προϊόντων της μέλισσας στον άνθρωπο. Πρακτικά του 2ου Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα 21- 23 Μαΐου 2004, σελ. 29-36.
- Δημητριάδου X. (2017). Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης με in vitro μεθόδους και κυτταρομετρία ροής σε εκχυλίσματα φυτών των οικογενειών

Passifloraceae, Cactaceae, Rosaceae. Πτυχιακή Διατριβή. Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

- Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος Δ., Καραμπουρνιώτη Σ., Δήμου Μ., (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού. Α. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. Πρακτικά του 1ου Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα.
- Κοσκινάς Α. (2019) Προσδιορισμός in vitro της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων ευρωπαϊκής καστανιάς (*Castanea sativa*). Πτυχιακή Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κουτελιδάκης Α. (2015). ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Ο ρόλος τους στην προαγωγή της Υγείας. Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
- Παπαγεωργίου Φ. (2005). Βιοχημεία ελευθερών ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξείδωση. University Studio Press.
- Σαμαράς Β. (2018). Αποτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης σε τοπικά κρασιά με συνδυασμό μοριακών τεχνικών. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Σάρδαλου Γ., Μενκίσογλου-Σπυρούδη Ο., Διαμαντίδης Γ. και Θρασυβούλου Α., (2002). Αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση διαφόρων ελληνικών μελιών. Πρακτικά του 1ου Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου 2002.
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Πληροφορίες για τη Μελισσοκομία. Διαθέσιμο on-line: <http://www.minagric.gr/greek/2.8.5.html>.