

Πανεπιστήμιο Αιγαίου

Σχολή Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής

Συγκριτική αξιολόγηση in vitro βιοδραστικότητας δειγμάτων μελιού Λήμνου



Πτυχιακή Μελέτη των

Ζώτου Ευτυχία

Μαροπούλου Αναΐδα

Τριμελής Επιτροπή

1. Καραντώνης Χαράλαμπος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Επιβλέπων)
2. Κουτελιδάκης Αντώνιος (Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος)
3. Νασοπούλου Κωνσταντίνα (Επίκουρη Καθηγήτρια, Μέλος)

Συγκριτική αξιολόγηση in vitro βιοδραστικότητας δειγμάτων μελιού Λήμνου

Επιβλέπον καθηγητής

Χαράλαμπος Καραντώνης

Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων

Πρόεδρος Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής

Τριμελής επιτροπή

1. Καραντώνης Χαράλαμπος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Επιβλέπων)
2. Κουτελιδάκης Αντώνιος (Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος)
3. Νασοπούλου Κωνσταντίνα (Επίκουρη Καθηγήτρια, Μέλος)

Περίληψη

Το μέλι είναι ένα φυσικό γλυκαντικό, που περιέχει χημικά και ένζυμα, τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών και ουσιαστικά είναι απαραίτητα για την προαγωγή της υγείας του ανθρώπου. Τέτοιου είδους συστατικά είναι η α-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ, η β-καροτίνη, η υπεροξειδάση, η καταλάση, διάφορα φλαβονοειδή και φαινολικές ουσίες. Επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν την προστατευτική δράση των μικροθρεπτικών συστατικών του μελιού, ιδιαίτερα των φαινολικών ενώσεων που περιέχει, έναντι ορισμένων χρόνιων νοσημάτων.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του μελιού της Λήμνου. Για την περάτωση της μελέτης αυτής συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές ποικιλίες μελιού, μια από την περιοχή Γομάτι, μία από Σκανδάλη και μία ανάμειξη από μέλι διαφόρων περιοχών του νησιού.

Αρχικά, τα τρία διαφορετικά δείγματα από μέλι Λήμνου, αναλύθηκαν για το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, μέσω φασματοφωτομέτρησης.

Έπειτα, έγινε εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τριών δειγμάτων μέσω της δοκιμασίας DPPH. Εν συνεχεία εκτιμήθηκε η *in vitro* αντιαθηρογόνο δράση, μέσω μέτρησης της αναστολής της οξείδωσης πλάσματος αίματος ανθρώπου που προκαλείται από ιόντα Cu^{+2} .

Επιπρόσθετα, σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP) ελέγχθηκε η αντιθρομβωτική δράση των δειγμάτων, μέσω μέτρησης της αναστολής του θρομβωτικού λιποειδικού παράγοντα, του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF). Τέλος, μελετήθηκε η ύπαρξη φλαβονοειδών και έγινε χρήση της Δοκιμασίας Μικρο-εκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού DLLME, προκυμένου αυτά να παραληφθούν.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, αποδείχθηκε ότι τα εκχυλίσματα και των τριών δειγμάτων μελιού Λήμνου εμφάνισαν αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντιαθηρογόνο δράση.

Abstract

Honey is a natural sweetener that contains substances, which act as antioxidants through the mechanism of free radicals, and are essential for the advancement of human health. Such agents are α -tocopherol, ascorbic acid, β -carotene, peroxidase, catalase, various flavonoid and phenolic substances. Epidemiological studies demonstrate the protective effect of the micronutrient components of honey, especially the phenolic compounds they contain, against certain chronic diseases.

The purpose of this diplomatic study is to study the antioxidant action of Lemnos honey. Three different varieties of honey were used to complete the study, from the Gomati region, one of the Scandali region and a mixture of honeys from various regions of the island.

First of all, the three different samples of honey from Lemnos were analyzed for their total phenolic compound using the Folin-Ciocalteu method, by spectrophotometry.

Then, the antioxidant capacity of the three samples was assessed by means of the DPPH test. In vitro anti-atherogenic activity was then assessed by measuring the inhibition of Cu^{+2} -mediated human plasma oxidation

Additionally, the Platelet-Rich human Platelets (PRP) tested the antithrombotic activity of the samples by measuring the inhibition of thrombotic lipid factor, Platelet Activating Factor (PAF). Finally, the study for the presence of flavonoids and the use of the Dispersive Liquid Liquid Micro Extraction (DLLME) was attempted to be omitted.

Based on the results of the experiments carried out, it was proved that the extracts of the three samples of Lemnos honey showed antioxidant, antithrombotic and antiatherogenic activity.

Κατάλογος Πινάκων

- Πίνακας 1: Παρασκευή Πρότυπων διαλυμάτων
- Πίνακας 2: Αναλογία διαλυμάτων και ποσότητα μελιού
- Πίνακας 3: Αποτελέσματα Ολικών Φαινολικών
- Πίνακας 4: Αποτελέσματα Δείγματος Σκανδάλη για DPPH
- Πίνακας 5: Τελικά αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH δείγματος Σκανδάλη
- Πίνακας 6: Αποτελέσματα Δείγματος Λήμνος για DPPH
- Πίνακας 7: Τελικά αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH δείγματος Λήμνος
- Πίνακας 8: Αποτελέσματα Δείγματος Γομάτι για DPPH
- Πίνακας 9: Τελικά αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH δείγματος Γομάτι
- Πίνακας 10: Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής οξειδωσης πλάσματος
- Πίνακας 11: Αποτελέσματα αναστολής του PAF σε PRP
- Πίνακας 12: Αποτελέσματα του PAF σε PRP (IA50)

Κατάλογος γραφημάτων

- Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας Folin-Ciocalteu
- Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς Δοκιμασίας Ολικών Φλαβονοειδών
- Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς δοκιμασίας DPPH
- Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη Δείγματος Αναφοράς Οξειδωσης Πλάσματος
- Διάγραμμα 5: Δείγματα και αποτελέσματα Ολικών Φαινολικών
- Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα DPPH – SA₅₀ μg Trolox
- Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα DPPH – SA₅₀ mg μελιού
- Διάγραμμα 8: Καμπύλη Οξειδωσης Πλάσματος (Δείγμα Αναφοράς – Δείγμα μελιού Σκανδάλη)
- Διάγραμμα 9: Καμπύλη Οξειδωσης Πλάσματος (Δείγμα Αναφοράς – Δείγμα μελιού Σκανδάλη)
- Διάγραμμα 10: Καμπύλη Οξειδωσης Πλάσματος (Δείγμα Αναφοράς – Δείγμα μελιού Λήμνος)
- Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα μέτρησης αντιθρομβωτικής δράσης

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Κατάλογος Πινάκων.....	5
Κατάλογος γραφημάτων.....	6
1.Εισαγωγή.....	9
2.Σύσταση μελιού	10
3. Φαινολικές ουσίες	11
3.1 Φλαβονοειδή.....	12
3.1.1.Φλαβονόλες.....	13
3.1.2.Φλαβόνες	14
3.1.3. Ισοφλαβόνες.....	14
3.1.4.Φλαβανόνες.....	14
3.1.5. Ανθοκυανίνες.....	15
3.1.6. Χαλκόνες.....	15
3.2.1.Μη φλαβονοειδή	16
3.2.2. Φαινολικά οξέα	16
3.2.3 Ταννίνες	18
3.2.4. Στυλβένια και λιγνάνες	18
4. Μελέτες και επεξεργασία στο μέλι.....	21
5. Βιολογικές δράσεις φαινολικών	22
5.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	23
5.2. Διάφορες πολυφαινόλες ως αντιοξειδωτικά.....	24
5.3. Έρευνες για αντιοξειδωτική δράση διαφόρων ειδών μελιού	25
5.4. Εμπορικά διαθέσιμα είδη μελιού.....	26
5.5. Πολυφαινόλες μελιού	29

5.6. Καρδιαγγειακές παθήσεις και ο ρόλος του μελιού ως τρόφιμο.....	29
6.Μεθοδολογίες πειραμάτων	34
6.1 Μεθοδολογία Προετοιμασίας δειγμάτων	34
7. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	34
8.Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών.....	38
9.Δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)	40
10.Εκτίμηση της αντιαθηρογόνου δράσης των δειγμάτων μέσω αναστολής της <i>in vitro</i> οξειδωσης πλάσματος αίματος από ιόντα Cu^{2+}	43
11. Εκτίμηση της αντιθρομβωτικής δράσης μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP) 47	
12.Δοκιμασία Μικρο-εκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) για παραλαβή φλαβονοειδών	51
13.Αποτελέσματα και συζήτηση.....	52
13.1. Προετοιμασία δειγμάτων	52
13.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	52
13.3.Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών	53
13.4. Δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)	53
13.5. Προσδιορισμός της αντιαθηρογόνου δράσης των δειγμάτων μέσω αναστολής της <i>in vitro</i> οξειδωσης πλάσματος αίματος από ιόντα $Cu^{2+ (100)}$	57
13.6.Προσδιορισμός της αντιθρομβωτικής δράσης μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP)	60
13.7.Δοκιμασία Μικρο-εκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) για παραλαβή φλαβονοειδών	62
Συμπεράσματα	63
Βιβλιογραφία	64

1.Εισαγωγή

Από τα αρχαία χρόνια, το μέλι δεν θεωρούνταν μόνο τρόφιμο ή γλυκαντικό, αλλά χρησιμοποιούνταν επίσης ως φάρμακο για την τόνωση της πληγής, την αναγέννηση των ιστών και την ανακούφιση των γαστρεντερικών διαταραχών, της ουλίτιδας και άλλων διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Η θεραπευτική επίδραση του μελιού προκύπτει από την παρουσία διαφόρων αντιοξειδωτικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων, όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες κατέδειξαν την αντιμικροβιακή, αντι-ική, αντιμυκητιασική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική δράση του μελιού. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί προστατευτική επίδραση στα καρδιαγγειακά, νευρικά, αναπνευστικά και γαστρεντερικά συστήματα.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων εποχών, έχει τεκμηριωθεί η μεγαλύτερη χρήση φυσικών τροφών που προέρχονται από φυτά λόγω της παρουσίας ευεργετικών συστατικών όπως τα φυτοχημικά, τα ένζυμα, οι ορμόνες, οι βιταμίνες, τα μέταλλα, τα αντιοξειδωτικά, και άλλα συστατικά διατροφής. Αυτά τα συστατικά δεν προορίζονται μόνο για την παροχή βασικών θρεπτικών ουσιών από ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά και την πρόληψη των διαταραχών που σχετίζονται με τη διατροφή και τη βελτίωση της συνολικής υγείας των καταναλωτών.

Το μέλι είναι ένα φυσικό τρόφιμο το οποίο αποτελείται από 200 ουσίες οι οποίες είναι κυρίως σάκχαρα καθώς και άλλα συστατικά όπως ένζυμα, αμινοξέα, οργανικά οξέα, καροτενοειδή, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία και αρωματικές ενώσεις. Αποτελεί ένα μείγμα φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών τα οποία προδίδουν στο μέλι πολλές από τις ευεργετικές του δράσεις.

Κάθε συστατικό έχει μοναδικές θρεπτικές και φαρμακευτικές ιδιότητες, ενώ τα συστατικά ενεργούν συνεργιστικά, προσφέροντας τη χρήση του μελιού σε διάφορες εφαρμογές. Έχει αναφερθεί ότι το μέλι μειώνει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών ασθενειών, τόσο σε υγιείς ασθενείς όσο και σε ασθενείς με αυξημένους παράγοντες κινδύνου. Διάφορες παράμετροι, όπως η γλυκόζη πλάσματος, η ινσουλίνη πλάσματος, η χοληστερόλη, τα τριακυλογλυκερίδια (TG), τα λιπίδια του αίματος, η c-αντδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η ομοκυστεΐνη, εξετάστηκαν μετά από *in vivo* χορήγηση φυσικών και τεχνητών μελιών. Το φυσικό μέλι βρέθηκε ότι έχει σημαντικά θετικές επιδράσεις στις προαναφερθείσες παραμέτρους. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού εξαρτάται όχι μόνο από την παρουσία ολικών φαινολικών ενώσεων αλλά και από την παρουσία φλαβονοειδών, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση του οξειδωτικού στρες.

2.Σύσταση μελιού

Το μέλι μέλισσας είναι ένα ιξώδες διάλυμα που περιέχει διάφορα μόρια, συμπεριλαμβανομένης της φρουκτόζης και της γλυκόζης (80-85%), νερό (15-17%), τέφρα (0,2%), πρωτεΐνες και αμινοξέα (0,1-0,4%) και ιχνοστοιχεία ενζύμων, βιταμινών και άλλων ουσιών, όπως φαινολικών ενώσεων. Το μέλι είναι σημαντική πηγή μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη υπάρχουν σε μεγαλύτερες ποσότητες, και συμβάλλουν κυρίως στην ενεργειακή αξία και τα φυσικά χαρακτηριστικά του μελιού, όπως την υγροσκοπικότητα, την κοκκοποίηση και το ιξώδες του.

Υπάρχουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών, κυρίως με τη μορφή ενζύμων και ελεύθερων αμινοξέων, εκτός από την ασπαραγίνη και την γλουταμίνη. Η προλίνη είναι το κύριο αμινοξύ στο μέλι (50-85%), που προκύπτει κυρίως από τις εκκρίσεις σίελου των μελισσών (*Apis mellifera* L.). Χρησιμοποιείται ως παράμετρος για να αξιολογηθεί ο βαθμός ωρίμανσης του μελιού. Άλλα αμινοξέα είναι αλανίνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, γλουταμικό οξύ, ισολευκίνη και λευκίνη.

Η περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία στο μέλι κυμαίνεται από 0,04% στα ανοιχτόχρωμα μέλια σε 0,2% στα πιο σκουρόχρωμα μέλια. Το μέλι αντικατοπτρίζει τα χημικά συστατικά των φυτών από τα οποία συλλέγουν οι μέλισσες την τροφή τους, έτσι το περιεχόμενο των ιχνοστοιχείων που υπάρχουν στο μέλι εξαρτάται από το είδος του εδάφους στο οποίο ήταν το φυτό και το νέκταρ και μπορεί να υποδεικνύει τη βοτανική προέλευση συγκεκριμένου μελιού. Ορισμένες μελέτες ταξινομούν τα μέλια βασισμένα στην εκτίμηση του περιεχομένου του σε μεταλλικά στοιχεία. (Priscila Missio da Silva, Cony Gauche, Luciano Valdemiro Gonzaga, Ana Carolina Oliveira Costa, Roseane Fett, 2016).

Η σύσταση του, όπως και το χρώμα, άρωμα και η γεύση του εξαρτώνται αποκλειστικά από το φυτό, το κλίμα, την περιοχή και το είδος της μέλισσας που ενεπλάκη στην παραγωγή του. Η ποιότητα του μπορεί επίσης να επηρεαστεί και από τις καιρικές συνθήκες, την επεξεργασία, την διαχείριση, την συσκευασία και τον χρόνο αποθήκευσης. Παρόλα αυτά, σχεδόν όλο το μέλι παγκοσμίως περιέχει παρόμοιους τύπους φαινολικών οξέων, συμπεριλαμβανομένων των καφεϊκών, ελλαγικών, φερουλικών και ρ-κουμαρικών οξέων. Επίσης, φλαβονοειδή, όπως η απιγενίνη, η χρυσίνη, η γκαγκανίνη, η εσκερετίνη, η καμφερολίνη, η πινοεμπρεβίνη και η κβερκετίνη, και αντιοξειδωτικά, όπως τοκοφερόλες, ασκορβικό οξύ, δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) και ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH).

Η ποιότητα του μελιού συνήθως αξιολογείται από φυσικοχημικές, αισθητικές και μικροβιολογικές παραμέτρους. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες εξαρτώνται από τον τύπο του νέκταρ (βοτανική προέλευση), τη γεωγραφική προέλευση (κλιματολογικές

συνθήκες και σύνθεση εδάφους) και τον χειρισμό (αποθήκευση και μεταφορά). Υπάρχουν πολλές έρευνες που αναφέρουν τις φυσικοχημικές παράμετρους του μελιού, όπως η υγρασία, η ενεργότητα (a_w), η σύνθεση των σακχάρων, το pH, η οξύτητα, η τέφρα, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η 5-υδροξυμεθυλοφουρουράλη (HMF) και το χρώμα οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διάκριση διαφορετικών τύπων μελιού. Επίσης, τη νόθευση του μελιού μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους ποιότητας.

3. Φαινολικές ουσίες

Οι φαινολικές ουσίες ή πολυφαινόλες είναι από τις πιο σημαντικές ομάδες ουσιών που συναντώνται στα φυτά, στα οποία βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Τα φαινολικά οξέα είναι επίσης δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών. Οι πολυφαινόλες είναι από τα επιθυμητά φυτοχημικά προϊόντα λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης τους. Υπάρχουν γύρω στις 10,000 ενώσεις που συγκαταλέγονται στις φαινολικές ουσίες οι οποίες συγκεντρώνονται σε διαφορετικές υποομάδες ανάλογα με την βασική τους δομή. Τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα είναι οι πιο μεγάλες υποομάδες των πολυφαινολών με πάνω από 5000 ουσίες να τις απαρτίζουν. (Krystyna Pyrzynska, Magdalena Biesaga, 2009). Στα φυτά οι φαινολικές ουσίες μπορούν δράσουν ως φυτοαλεξίνες, αντιοξειδωτικοί παράγοντες, προσελκυστικά για επικονιαστές, συνησφέρουν στο χρώμα τους, και προστείνοντας τα από την υπεριώδη ακτινοβολία. Αυτές οι βιοδραστικές ιδιότητες καθιστούν αυτές τις ενώσεις να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών, παρέχοντας μια αποτελεσματική προστασία έναντι παθογόνων και θηρευτών (Ioana Ignat, Irina Volf, Valentin I. Popa 2011).

Αυτές οι ουσίες έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριες υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού, που συνδέεται κυρίως με την ικανότητα των εκκαθαριστών ελευθέρων ριζών, μέσω του σχηματισμού πιο σταθερών και λιγότερο τοξικών μορίων.

Δομή Φαινολικών

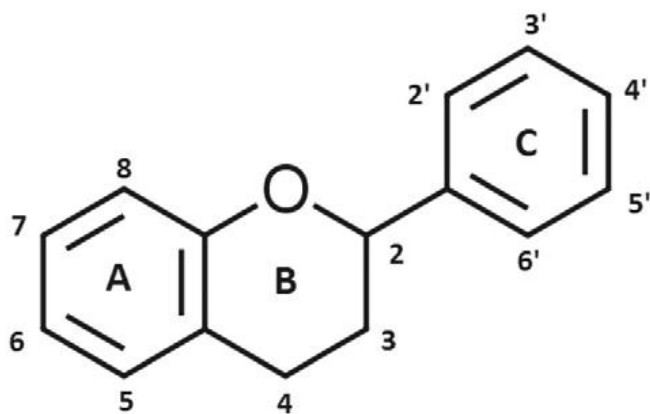
Οι φαινολικές ουσίες περιέχουν στην δομή τους τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερες υδροξυλομάδες και χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβοβοειδή.

3.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα με δύο αρωματικούς δακτύλιους (Α και Β) στο μόριο τους που συνδέονται μέσω μιας αλυσίδας τριών ανθράκων συνήθως με την μορφή ετεροκυκλικού δακτυλίου C. Γενικά, αυτές οι ενώσεις έχουν τουλάχιστον δύο φαινολικές ομάδες (OH) και συνδέονται συχνά με σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη μαζί με ξυλόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, αραβινόζη, ρουτινοζίτη και γλυκοραμνόζη. Όταν τα φλαβονοειδή δεν συνδέονται με σάκχαρα ονομάζονται αγλυκόνες. Οι κύριες υποκατηγορίες αυτών των C6-C3-C6 ενώσεων που διαχωρίζονται ανάλογα με τον βαθμό οξειδωσης τους, είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι χαλκόνες και οι ανθοκυανιδίνες. Επιπλέον πάνω από 4000 φλαβονοειδή φυτικής προέλευσης έχουν ταυτοποιηθεί. Στα φυτά κατανομούνται στους σπόρους, το φλοιό, τα φύλλα και τα άνθη τους. Τους παρέχουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, παθογόνα και φυτοφάγα ζώα. Τα φυτά έχουν πολλά πολυφαινολικά παράγωγα με υψηλή δομική ποικιλία και πολυπλοκότητα και όταν οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ, αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις μπορεί να μεταφερθούν από τα φυτά στο μέλι. Οι πιο άφθονες κατηγορίες φλαβονοειδών στο μέλι είναι οι φλαβόνες, οι φλαβανόλες και οι φλαβονόλες.

Τα φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερα σημαντικά αντιοξειδωτικά λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού τους, το οποίο τους επιτρέπει να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες και δότες υδρογόνου.

Τα φλαβονοειδή είναι τα πιο συχνά ευρεθέντα φυτοχημικά, τα οποία συνήθως βοηθούν στην προστασία του φυτού από την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, τα μυκητιακά παράσιτα, τα φυτοφάγα, τα παθογόνα και τον οξειδωτικό κυτταρικό τραυματισμό. Όταν καταναλώνονται τακτικά από τους ανθρώπους, τα φλαβονοειδή, έχουν συσχετιστεί με τη μείωση συχνότητας εμφάνισης ασθενειών όπως ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Υπάρχει επί του παρόντος μεγάλο ενδιαφέρον για έρευνα στα φλαβονοειδή λόγω της δυνατότητας βελτίωσης της δημόσιας υγείας μέσω της διατροφής, όπου η προληπτική υγειονομική περίθαλψη μπορεί να προωθηθεί μέσω της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών. Οι φλαβονόλες είναι μια κατηγορία φλαβονοειδών που απαντάται συχνά σε πολλά φρούτα και λαχανικά, το περιεχόμενο τους ποικίλλει ευρέως, ανάλογα με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι συνθήκες καλλιέργειας, το κλίμα, η αποθήκευση και οι συνθήκες μαγειρέματος (Ioana Ignat 2011).



Εικόνα 1: Δομή φλαβονοειδών

3.1.1. Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες συναντώνται ευρέως στους φυτικούς οργανισμούς. Οι πιο συνηθισμένες φλαβονόλες είναι η καεμφερόλη, κερκετίνη, ισοχαρμετίνη και η μυρικετίνη. Ο διπλός δεσμός των φλαβονολών βρίσκεται ανάμεσα στους άνθρακες C₂ και C₃ και η υδροξυλομάδα στον 3^ο άνθρακα (C₃). (Munawar Abbas, Farhan Saeed, Faqir Muhammad Anjum, Muhammad Afzaal, Tabussam Tufail, Muhammad Shakeel Bashir, Adnan Ishtiaq, Shahzad Hussain & Hafiz Ansar Rasul Suleria 2017). Τυπικά βρίσκονται ως γλυκοζίτες με σύζευξη που συμβαίνει στις θέσεις 5, 7, 3', 4' και 5'. Αν και ο αριθμός των αγλυκονών είναι περιορισμένος, υπάρχουν περισσότερα από 200 σύμπλοκα σακχάρου και καεμφερόλης. Υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητα φλαβονόλης σε φρούτα, λαχανικά και ποτά, συνήθως με μεγάλες διαφορές στις ποσότητες που βρίσκονται σε φαινομενικά παρόμοια προϊόντα, πιθανώς λόγω των τοπικών συνθηκών ανάπτυξης, των εποχιακών αλλαγών και των ποικιλομορφικών διαφορών. Οι φλαβονόλες που συναντώνται στο μέλι είναι η καεμφερόλη, μυρικετίνη και η κουερσετίνη (Krystyna Pyszynska, Magdalena Biesaga, 2009).

Στην δομή τους παρουσιάζουν μεγάλο εύρος ανάλογα με την θέση της μεθυλίωσης και της υδροξυλίωσης και συναντώνται σε πάρα πολλά φρούτα και λαχανικά. (A. N. Panche, A. D. Diwan and S. R. Chandra, 2016)

3.1.2. Φλαβόνες

Οι φλαβόνες, όπως η απιγενίνη (apigenin), η λουτεολίνη (luteolin), η γογκονίνη (wogonin) και η μπακαλεΐνη (baicalein) έχουν παρόμοια δομή με την φλαβονόλη έχουν δηλαδή διπλό δεσμό στην θέση C2 και C3 αλλά απουσία της υδροξυλομάδας στην θέση C3 (Daniele Del Rio 2013). Γενικά, οι φλαβόνες δεν κατανέμονται ευρέως, αν και έχουν ανιχνευθεί σημαντικές ποσότητες στο σέλινο (*Apium graveolens*), στον μαϊντανό (*Petroselinum hortense*) και σε ορισμένα βότανα. Στο μέλι απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες η λουτεονίνη, η γενιστεΐνη και η απιγενίνη (Krystyna Pyszynska, Magdalena Biesaga, 2009).

3.1.3. Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες διαθέτουν τον Β αρωματικό δακτύλιο στον C3. Βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε οσπριοειδή φυτά και ειδικά στην σόγια. Η κύρια μορφή με την οποία συναντώνται είναι γλυκοζηλιωμένες με σάκχαρα όπως γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη κ.ά. (Mircea Oroian , Isabel Escriche , 2015). Βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά σε οσπριοειδή φυτά με σημαντικές ποσότητες δαϊζεΐνης και γενιστεΐνης που απαντώνται σε σόγια (*Glycine max*).

Λόγω της δομικής ομοιότητάς τους με τα οιστρογόνα, οι ισοφλαβόνες ταξινομούνται ως φυτοοιστρογόνα, όπως και οι μη φλαβονοειδείς λιγνάνες, οι οποίες είναι μια διαφορετική ομάδα ενώσεων που εμφανίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις κυρίως σε κόκκους δημητριακών.

3.1.4. Φλαβανόνες

Στις φλαβανόνες η ανθρακική αλυσίδα είναι κορεσμένη, αντίθετα με τις φλαβόνες, ο διπλός δεσμός ανάμεσα στις θέσεις 2 και 3 είναι κορεσμένος και αυτή είναι η μόνη δομική διαφορά ανάμεσα στις δύο υποκατηγορίες των φλαβονοειδών. Σε αυτές τις ενώσεις οφείλεται η πικρή γεύση του χυμού και της φλούδας των εσπεριδοειδών. (A. N. Panche, A. D. Diwan and S. R. Chandra, 2016)

Γενικά γλυκοζυλιώνονται με δισακχαρίτη στον C7. Οι φλαβανόνες είναι παρούσες σε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο στα εσπεριδοειδή, αλλά απαντώνται και στις τομάτες και σε ορισμένα αρωματικά φυτά όπως η μέντα. (Ioana Ignat 2011).

3.1.5. Ανθοκυανίνες

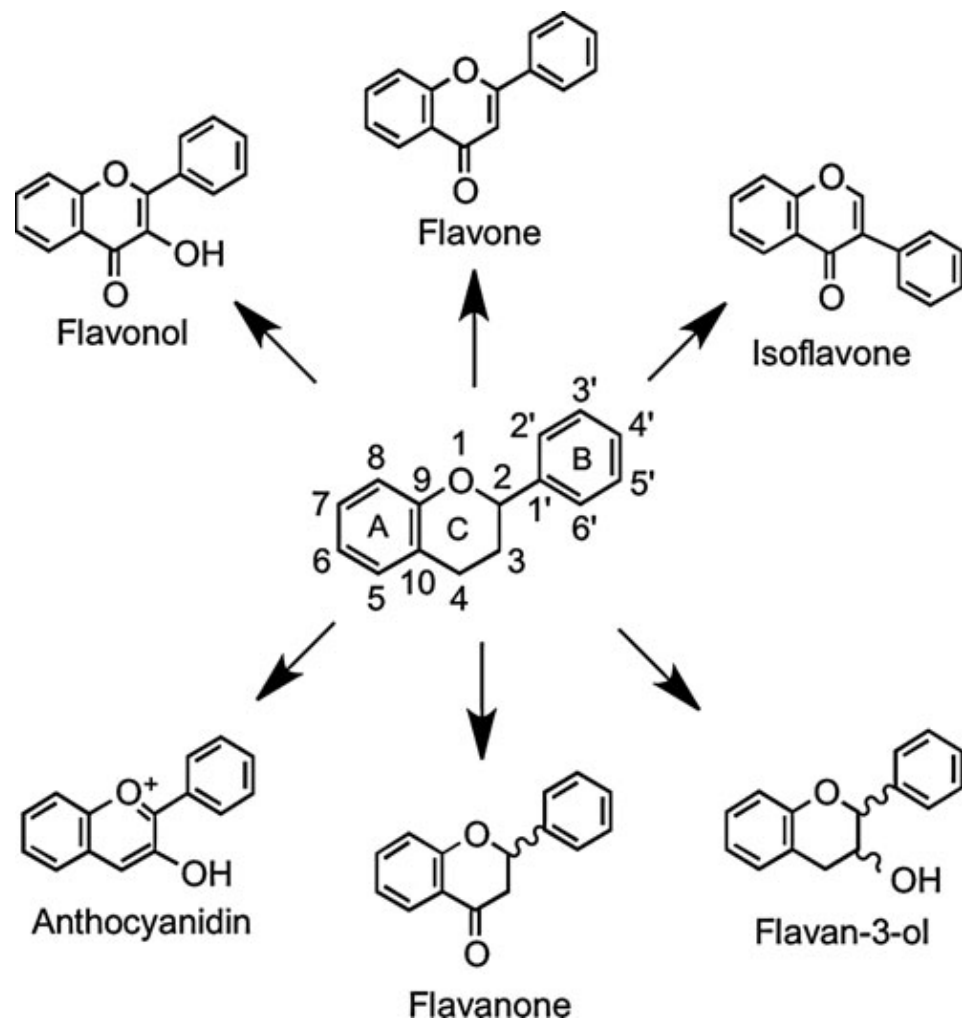
Οι ανθοκυανίνες είναι υπεύθυνες για το χρώμα πολλών φρούτων και λουλουδιών. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται στα φυτά με την μορφή των ανθοκυανιδινών, όπου κατά το ήμισυ περιέχουν ένα σάκχαρο στο C3 ή στην 5, 7-θέση του A δακτυλίου και με αυτό τον τρόπο δημιουργείται το χρώμα των φρούτων αυτών το οποίο κυμαίνεται από πορτοκαλί σε κόκκινο και από μπλε σε μωβ. (Munawar Abbas 2017). Το χρώμα της ανθοκυανίνης εξαρτάται από το pH και επίσης από μεθυλίωση ή ακυλίωση στις ομάδες υδροξυλίου στους δακτυλίους A και B. Εμφανίζονται κυρίως στα εξωτερικά κυτταρικά στρώματα των διαφόρων φρούτων όπως τα βακκίνια, η μαύρη σταφίδα, τα κόκκινα σταφύλια, τα σμέουρα, οι φράουλες και τα βατόμουρα. Η σταθερότητα τους σε συνδυασμό με τα οφέλη στην υγεία κάνουν επιθυμητή την χρησιμοποίησή τους στη βιομηχανία τροφίμων (A. N. Panche, A. D. Diwan and S. R. Chandra, 2016).

Οι ανθοκυανίνες εμφανίζονται σε όλους τους ιστούς των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των φύλλων, των στελεχών, των ριζών, των λουλουδιών και των καρπών. Τα γλυκοσιδικά παράγωγα των τριών μη μεθυλωμένων ανθοκυανιδινών (Πελαγονιδίνη (Pg), Κυανιδίνη (Cy), Δελφινιδίνη (Dp)) είναι τα πιο συνηθισμένα στη φύση, βρίσκονται σε ποσοστό 80% στα έγχρωμα φύλλα, 69% σε φρούτα και 50% σε άνθη. Τα σάκχαρα που συνδέονται συνήθως με ανθοκυανιδίνες είναι μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη και αραβινόζη) και δι- ή τρισακχαρίτες που σχηματίζονται από το συνδυασμό των τεσσάρων αυτών μονοσακχαριτών.

Οι απομονωμένες ανθοκυανίνες είναι εξαιρετικά ασταθείς και πολύ ευαίσθητες στην υποβάθμιση. Η σταθερότητά τους επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία αποθήκευσης, η χημική δομή, η συγκέντρωση, το φως, το οξυγόνο, οι διαλύτες, η παρουσία ενζύμων, φλαβονοειδών, πρωτεϊνών και μεταλλικών ιόντων. Οι ανθοκυανίνες, καθώς και άλλες φαινολικές ενώσεις, μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά, προσφέροντας υδρογόνο σε εξαιρετικά δραστικές ρίζες, αποτρέποντας έτσι τον περαιτέρω σχηματισμό ριζών. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό τους εξαρτάται από τον αριθμό και τη διάταξη των υδροξυλομάδων και από την έκταση της δομικής σύζευξης, καθώς και στην παρουσία υποκαταστατών που δίνουν ηλεκτρόνια και αποσύρουν ηλεκτρόνια στη δομή του δακτυλίου. Οι ανθοκυανίνες διαθέτουν γνωστές φαρμακολογικές ιδιότητες και ισχυρές βιολογικές λειτουργίες όπως οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες. Επιπλέον, η αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική δράση των ανθοκυανινών, που σχετίζεται με την πρόληψη ορισμένων εκφυλιστικών νόσων, παρέχει πρόσθετα οφέλη για τα τρόφιμα χρωματισμένα με αυτά (Ioana Ignat 2011).

3.1.6. Χαλκόνες

Οι χαλκόνες χαρακτηρίζονται από την απουσία C δακτυλίου και γι' αυτό τον λόγο αναφέρονται και ως φλαβονοειδή ανοικτής αλυσίδας. Περιέχονται σε σημαντικές ποσότητες στις ντομάτες, τα αγγούρια, τις φράουλες και σε ορισμένα προϊόντα σιταριού (A. N. Panche, A. D. Diwan and S. R. Chandra, 2016).



Εικόνα 2: Δομή φλαβονοειδών

3.2.1. Μη φλαβονοειδή

3.2.2. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα, που είναι γνωστό ότι χρησιμεύουν ως βιοδραστικές ενώσεις πολλαπλών χρήσεων, είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλο το φυτικό βασίλειο. Πολλές από τις προστατευτικές επιδράσεις των φαινολικών ενώσεων στην υγεία έχουν αποδοθεί στις αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές, αντι-καρκινογόνες, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και άλλες βιολογικές ιδιότητές τους.

Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την δομή τους: τα παράγωγα βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα κινναμωμικού οξέος. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από ένα δακτύλιο βενζολίου συνδεδεμένο με μια καρβοξυλική ομάδα (βενζοϊκά οξέα) ή με ένα προπενοϊκό οξύ (κινναμωμικά οξέα). Τα υδροβενζοϊκά οξέα περιλαμβάνουν το γαλλικό, p-υδροξυ-βενζοϊκό, βανιλικό, πρωτοτεκουχικό και συριγγικό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα έχουν αντιπροσώπους καφεϊκό, p-κουμαρικό και σιναποκό οξύ. Τα φαινολικά οξέα που συχνότερα εντοπίζονται στο μέλι είναι το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το βανιλλικό οξύ, το συριγγικό οξύ και το 4-(διμεθυλαμινο)βενζοϊκό οξύ (Danila Cianciosi 2018).

Τα φαινολικά οξέα συμπεριφέρονται ως αντιοξειδωτικά, λόγω της αντιδραστικότητας του τμήματος φαινόλης (υποκαταστάτης υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο). Αν και υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί, ο κύριος τρόπος αντιοξειδωτικής δραστηρότητας πιστεύεται ότι είναι η αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών μέσω παροχής ατόμων υδρογόνου.

Λόγω της αφθονίας τους σε πολλά φυτικά τρόφιμα, οι άνθρωποι καταναλώνουν καθημερινά φαινολικά οξέα. Το εκτιμώμενο εύρος κατανάλωσης είναι 25 mg-1 g ανά ημέρα ανάλογα με τη διατροφή που καταναλώνεται (φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, τσάι, καφέδες, μπαχαρικά). Το καφεϊκό οξύ, ένα από τα φυσικά κινναμωμικά οξέα, είναι γνωστό ότι εμποδίζει επιλεκτικά τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, τα συστατικά που εμπλέκονται σε ανοσορυθμιστικές ασθένειες, άσθμα και αλλεργικές αντιδράσεις. Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το καφεϊκό οξύ και ορισμένοι από τους εστέρες του μπορεί να έχουν αντικαρκινική δράση κατά της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου (Fereidoon Shahidi 2015).

Συνήθως, οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις συνδέονται με τα δομικά συστατικά του φυτού (κυτταρίνη, λιγνίνη) αλλά και με άλλους τύπους οργανικών μορίων όπως γλυκόζη, άλλα σάκχαρα ή φλαβονοειδή (Danila Cianciosi 2018).

3.2.3 Ταννίνες

Οι ταννίνες παράγονται από τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολείς. Ανάλογα με την δομή τους οι ταννίνες διαχωρίζονται σε υδρολυόμενες ταννίνες και συμπυκνωμένες ταννίνες. Εκτός από τον στυπτικό τους χαρακτήρα, έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Mircea Oroian, Isabel Escriche, 2015). Οι υδρολυόμενες ταννίνες περιέχουν ένα κεντρικό πυρήνα γλυκόζης ή άλλης πολυόλης που έχει εστεροποιηθεί με γαλλικό οξύ και ονομάζονται γαλλοταννίνες ενώ με εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ ονομάζονται ελλαγιταννίνες. Η μεγάλη ποικιλία στη δομή αυτών των ενώσεων οφείλεται στις πολλές δυνατότητες σχηματισμού οξειδωτικής σύνδεσης. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή φλαβονο-3-όλης, οι οποίες αναφέρονται και ως προανθοκυανιδίνες επειδή καταλήγουν σε ανθοκυανιδίνες μέσω οξειδωσης καταλυόμενης με οξύ όταν θερμαίνεται σε διαλύματα όξινης αλκοόλης (Jin Dai, Russell J. Mumper, 2010)

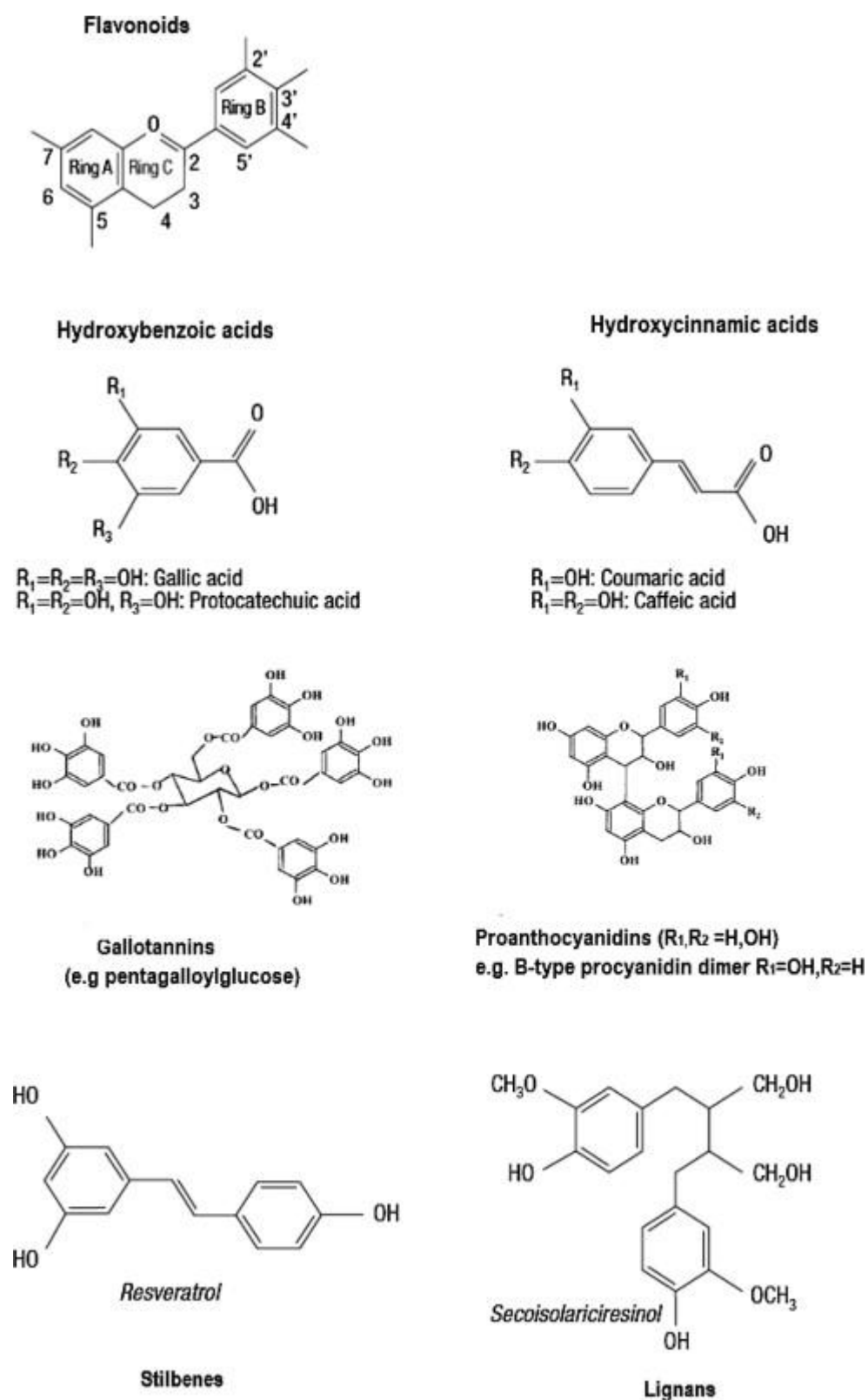
3.2.4. Στιλβένια και λιγνάνες

Τα στιλβένια είναι φαινολικές ενώσεις που εμφανίζουν δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδεόνται με γέφυρα αιθανίου. Μπορούν να εμφανιστούν ως μονομερή όπως είναι η ρεσβερατρόλη και η οξυρεσβερατρόλη και ως ολιγομερή όπως διμερή, τριμερή ή πολυμερή ρεσβερατρόλης ή άλλα στιλβένια. Τα στιλβένια είναι σημαντικές ενώσεις καθώς οι θετικές επιπτώσεις στην υγεία εμφανίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλες φαινολικές ενώσεις (Mircea Oroia, Isabel Escriche, 2015) Τα στιλβένια έχουν μία δομή C6-C2-C6 και είναι φυτοαλεξίνες που παράγονται από τα φυτά σε απόκριση σε ασθένειες, τραυματισμούς και στρες. Το κύριο στιλβένιο, η ρεσβερατρόλη η οποία εμφανίζεται σε cis και trans μορφή (Daniele Del Rio, Ana Rodriguez-Mateos, Jeremy P.E. Spencer, Massimiliano Tognolini, Gina Borges, Alan Crozier, 2013)

Η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστυλοβένιο) παράγεται από τα φυτά σε απόκριση σε βλάβες, ιδιαίτερα στα αμπελόφυλλα, τα πεύκα και τα όσπρια. Το κύριο διαιτητικό στιλβένιο είναι η ρεσβερατρόλη από το κόκκινο κρασί και τα φιστίκια με λιγότερα ποσά που βρέθηκαν σε φιστίκια, μούρα, κόκκινο λάχανο, σπανάκι και ορισμένα βότανα. Η trans-ρεσβερατρόλη έχει κερδίσει σημαντική παγκόσμια προσοχή λόγω της ικανότητάς της να αναστέλλει ή να καθυστερεί μια μεγάλη ποικιλία ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών νοσημάτων και του καρκίνου. Ο Gülçin (2010) ανέφερε ότι η ρεσβερατρόλη είναι ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό σε

διαφορετικές in vitro δοκιμασίες συμπεριλαμβανομένης της ολικής αντιοξειδωτικής δραστηρότητας, της εκκαθάρισης διαφόρων ελευθέρων ριζών όπως τα DPPH •, ABTS •+, DMPD •+ και O₂ •-, και υπεροξειδίου του υδρογόνου, σε σύγκριση με τις τυπικές αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως το BHA, το BHT και την α-τοκοφερόλη (Gülçin, 2010). Η ρεσβερατρόλη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ελαχιστοποίηση ή την πρόληψη της οξείδωσης των λιπιδίων σε φαρμακευτικά προϊόντα, την επιβράδυνση του σχηματισμού προϊόντων τοξικής οξείδωσης, τη διατήρηση της θρεπτικής ποιότητας και την παράταση της διάρκειας ζωής των φαρμάκων.

Οι λιγνάνες είναι μια ομάδα φαινολικών ενώσεων που εμφανίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον λιναρόσπορο και άλλους σπόρους, ρίζες, φύλλα, φρούτα και ξυλώδη τμήματα αγγειακών φυτών. Οι δομές των λιγνάνων είναι χτισμένες σε μονάδες C6-C3 που προέρχονται από μονάδες κινναμυλίου (Mircea Oroian, Isabel Escriche, 2015).



Εικόνα 3: Δομή μη φλαβονοειδών

3.3. Πηγές φαινολικών ενώσεων

Μεταξύ των φρούτων, των λαχανικών και των διαφορετικών βοτάνων, τα αγροτικά και βιομηχανικά κατάλοιπα είναι πολύ καλές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα άντλησης φαινολικών ενώσεων από φθηνές ή υπολειμματικές πηγές γεωργικών βιομηχανιών. Τα υποπροϊόντα που παραμένουν μετά την επεξεργασία φρούτων και λαχανικών στη βιομηχανία μεταποίησης τροφίμων εξακολουθούν να περιέχουν μια τεράστια ποσότητα φαινολικών ενώσεων. Ορισμένες μελέτες έχουν ήδη γίνει σχετικά με τα υποπροϊόντα, τα οποία θα μπορούσαν να είναι πιθανές πηγές αντιοξειδωτικών.

Μια από τις πλουσιότερες πηγές είναι ο φλοιός ραγών σταφυλιού, τα οποία κατά τη οينوποίηση και την παραγωγή χυμών παραμένουν ως υποπροϊόντα και συνήθως μετατρέπονται σε λίπασμα. Τα απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούν επίσης σημαντική πηγή φαινολικών (Ioana Ignat 2011).

Η βιομηχανία εσπεριδοειδών παράγει μεγάλες ποσότητες φλοιού και υπολειμμάτων σπόρων, που μπορούν να φτάσουν μέχρι και το 50% του συνολικού βάρους των φρούτων. Τα υποπροϊόντα της βιομηχανίας εσπεριδοειδών, αν χρησιμοποιηθούν με τον βέλτιστο τρόπο, θα μπορούσαν να αποτελέσουν μείζονες πηγές φαινολικών ενώσεων, καθώς διαπιστώθηκε ότι οι φλούδες περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ολικών φαινολικών σε σύγκριση με τα βρώσιμα τμήματα.

4. Μελέτες και επεξεργασία στο μέλι

Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι έχουν χρησιμοποιηθεί ως φυτικοί δείκτες και έχουν επίσης αυξήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηρότητας που αποδίδεται σε αυτές τις ενώσεις λόγω της ικανότητας τους να μειώνουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Μερικές μελέτες δείχνουν ότι τα φλαβονοειδή θα μπορούσαν να προστατεύουν τα λιποειδή της κυτταρικής μεμβράνης από την οξείδωση τους.

Μία κατηγορία συστατικών του μελιού όπως προαναφέρθηκε είναι τα φλαβονοειδή. Αυτά μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στην ολική αντιοξειδωτική δράση του μελιού, έχοντας ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών στις περισσότερες περιπτώσεις εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των ομάδων υδροξυλίου, άλλους υποκατάστατες και τη γλυκοζυλίωση των μορίων. Η παρουσία ορισμένων ομάδων υδροξυλίου στους φλαβονοειδείς δακτυλίους ενισχύει την αντιοξειδωτική τους δράση. Η γλυκοζυλίωση των φλαβονοειδών μειώνει την αντιοξειδωτική δράση τους όταν συγκρίνεται με τα αντίστοιχα φλαβονοειδή που δεν είναι γλυκοζυλιωμένα.

Οι φαινολικές ουσίες υποβαθμίζονται ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες υπόκεινται. Αξιολογώντας τις περιπτώσεις βιομηχανικής θερμικής

επεξεργασίας στις φαινολικές ενώσεις ισπανικών μελιών, υπέστησαν υγροποίηση σε συνθήκες 45 ± 1 C για 48 ώρες και υγροποίηση και συνδυασμό με παστερίωση στους $80^\circ \pm 0.05$ °C για 4 λεπτά. Αυτή η επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα να ανιχνευτούν στο μέλι το καφεϊκό οξύ και κουμαρικά οξέα και τα φλαβονοειδή, ναρινγενίνη, εσπερετίνη, κερκετίνη και καεμφορόλη. Ανιχνευθήκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της γαλανγίνης, καμφοφερόλης, της μυριστίνης και του α-κουμαρικού οξέως (Priscila Missio da Silva, Cony Gauche, Luciano Valdemiro Gonzaga, Ana Carolina Oliveira Costa, Roseane Fett, 2016).

Το μέλι χαρακτηρίζεται από την τάση να κρυσταλλώνεται αυθόρμητα σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε προβλήματα στην επεξεργασία και στον χειρισμό του μελιού. Ο τρόπος αποφυγής της κρυστάλλωσης κατά την αποθήκευση του μελιού και είναι η εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας όχι μόνο για τη διάλυση των κρυστάλλων αλλά για την καταστολή της μικροβιακής μόλυνσης του μελιού. Ωστόσο, η θερμική επεξεργασία μπορεί να ακολουθηθεί από έναν αριθμό ανεπιθύμητων αντιδράσεων, μεταξύ των οποίων και χρωματικές αλλαγές καθώς και την ανάπτυξη ορισμένων μολυσματικών ουσιών, π.χ. σχηματίζεται HMF. Η HMF μπορεί να μετατραπεί σε κυτταροτοξική και μεταλλαξιογόνο ένωση 5-σουλφοξυμεθυρφορφυράλη. Η παραγωγή της HMF συμβαίνει επίσης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης (θερμοκρασία, pH, υγρασία).

5. Βιολογικές δράσεις φαινολικών

Η διατροφική πρόσληψη φαινολικών επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διατροφικές συνήθειες και τις προτιμήσεις των ατόμων. Η μέση ημερήσια πρόσληψη διαιτητικών πολυφαινολών είναι περίπου 1 g ανά άτομο και οι κύριες πηγές είναι τα ποτά, τα φρούτα και, σε μικρότερο βαθμό, τα λαχανικά και τα όσπρια. Απλές φαινολικές ενώσεις όπως συζεύγματα υδροξυκινναμικού οξέος και φλαβονοειδή είναι σημαντικά συστατικά φρούτων, λαχανικών και ποτών. Αυτές οι ενώσεις δείχνουν ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων in vitro και πιστεύεται ότι ασκούν προστατευτικές επιδράσεις κατά των κύριων ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Το οξειδωτικό στρες που επιβάλλεται από τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) διαδραματίζει πράγματι κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία που σχετίζεται με νεοπλασία, αθηροσκλήρωση και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Ορισμένα αντιοξειδωτικά εμφανίζουν δραστηριότητα υπεροξειδάσης υπό ορισμένες συνθήκες και πιθανή καρκινογένεση κάτω από άλλες, έτσι η διατροφική συμπλήρωση με μεγάλες ποσότητες ενός μόνο αντιοξειδωτικού μπορεί να είναι επιβλαβής για την υγεία. Ένα από τα πιο κρίσιμα συμπεράσματα σήμερα είναι ότι ο χαμηλός κίνδυνος καρκίνου συνδέεται στενότερα με μια διαίτα πλούσια σε πολλαπλά αντιοξειδωτικά από ότι μια συμπληρωμένη με ένα μεμονωμένο αντιοξειδωτικό. Ένας συνδυασμός αντιοξειδωτικών με διαφορετικούς τρόπους δράσης πιστεύεται ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα και ελαχιστοποιεί την τοξικότητα.

Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντι-αλλεργικές, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αγγειοδιασταλτικές. Πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες τσαγιού μπορούν να προστατεύσουν από διαφορετικά στάδια. Το EGCG, η κύρια κατεχίνη στο πράσινο τσάι, χρησιμεύει ως παράγοντας χημειοαντιδραστικών για τον καρκίνο (πνεύμονες, συκώτι, γαστρεντερική οδός, καρκίνος του δέρματος και του προστάτη) καθώς και για την παχυσαρκία και στην καρδιαγγειακή νόσο. Η αντιοξειδωτική δράση και οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία της κύριας πολυφαινόλης του πράσινου τσαγιού, της γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης (EGCG), ενισχύθηκαν κατά τη σύζευξη με το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) και ο σχηματιζόμενος τετραεστέρας ήταν ικανός να συγκρατήσει αποτελεσματικά τον καρκίνο του παχέος εντέρου (κόλον). Οι πολυμεθοξυφλαβόνες, τα κύρια συστατικά της φλούδας πορτοκαλιού, έχουν βρεθεί ότι αποφέρουν οφέλη για την υγεία (Fereidoon Shahidi 2015).

Η καφεΐνη είναι επίσης αποτελεσματική στην καταστολή της αύξησης του σωματικού βάρους με την τόνωση της θερμογένεσης, την επέκταση της συμπαθητικής διέγερσης, την καταστολή της πρόσληψης τροφής και τη μείωση της μάζας λιπώδους ιστού. Επιπλέον, η υδροξυτυροσώλη, ένα από τα μείζονα φαινολικά συστατικά στο ελαιόλαδο, αναφέρθηκε ότι μειώνει τον κίνδυνο στεφανιαίας καρδιακής νόσου και αθηροσκλήρωσης από μόνη της.

Έχει γίνει κατανοητό πως οι φαινολικές ουσίες έχουν πολλές ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως την αντιοξειδωτική τους δράση. Γιαυτό τον λόγο θα αναλυθούν κάποιες έννοιες που βοηθούν να γίνει κατανοητό πώς τα φαινολικά δρουν και στην συνέχεια αναφέρονται διάφορες έρευνες που εξηγούν την ακριβή βιολογική δράση των φαινολικών του μελιού.

5.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες (free radicals) είναι άτομα ή ενώσεις που διαθέτουν μονήρη ηλεκτρόνια. Συνήθως έχουν περιττό αριθμό ηλεκτρονίων. Αντιδράσεις ελεύθερων ριζών παρατηρούνται στους ζώντες οργανισμούς, κατά τη διάρκεια των μεταβολικών διεργασιών. Αξιοσημείωτα παραδείγματα αποτελούν η αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E (τοκοφερόλη) και C (ασκορβικό οξύ) και η αντιοξειδωτική δράση συγκεκριμένων φλαβονοειδών που απαντώνται στα εσπεριδοειδή, τα μήλα, τα σταφύλια, το μέλι και το τσάι (π.χ. η κερκετίνη). Οι ρίζες είναι πολύ δραστικά ενδιάμεσα με μικρούς χρόνους ημίσειας ζωής. Η παραμονή τους εξαρτάται από το πόσο εύκολα σχηματίζονται, αλλά και το πόσο εύκολα εξαφανίζονται. Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών στον οργανισμό (in vivo) οδηγεί σε βλάβες των κυττάρων και του γενετικού υλικού.

Διάφοροι παράγοντες ευνοούν τη δημιουργία ριζών (κάπνισμα, μόλυνση περιβάλλοντος, άγχος, κ.τ.λ.). Ως ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen

Species, ROS) θεωρούνται οξυγονούχες οντότητες με μεγάλη δραστηριότητα: O_2 (απλής κατάστασης), H_2O_2 , $\bullet NO$, $OH\bullet$, $RO\bullet$ και $ROO\bullet$. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου είναι πολύ επικίνδυνες για τους οργανισμούς, αν και απαντώνται φυσιολογικά σε αυτούς. Ελέγχονται από κατάλληλα ένζυμα, αλλά όταν παραμείνουν ανεξέλεγκτες οδηγούν σε οξειδωτικό στρες (oxidative stress) και μια σειρά από πολύ επικίνδυνες παθολογικές καταστάσεις.

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επιδιορθώνει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του DNA και των λιπιδίων. Χημικά, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται είτε με την αυξημένη παραγωγή ROS είτε με τη μείωση των αντιοξειδωτικών εφεδρειών του οργανισμού, όπως του μηχανισμού ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειώνης (GSH/GSSG). Οι ROS προκαλούν υπεροξειδωτική βλάβη των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, οδηγώντας στην εμφάνιση καρκίνου, πρόωρης γήρανσης και εκφυλιστικών νοσημάτων.

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών: Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης (όταν είναι μέτριας ισχύος), είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση (όταν είναι πολύ ισχυρές). Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται μετά από υπερβολική προσφορά οξυγόνου (για παράδειγμα στους μύες κατά την έντονη άσκηση) ή ακτινοβολία των ιστών (η αλληλεπίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας με μόρια H_2O και O_2 παράγει ελεύθερες ρίζες) και συμβάλλει στην ιστική βλάβη. [J. McMurry, Οργανική Χημεία, (Μετάφραση Α. Βάρβογλης, Μ. Ορφανόπουλος, Ι. Σμόνου, Μ. Στρατάκης), Ηράκλειο, Ελλάς: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2012.]

5.2. Διάφορες πολυφαινόλες ως αντιοξειδωτικά

Οι διατροφικές πολυφαινόλες λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά. Επομένως, η κερκετίνη, το καφεϊκό οξύ, η καμφερόλη και η απιγενίνη που βρίσκονται στο μέλι, ενδέχεται να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο στη θεραπεία της καρδιαγγειακής νόσου. Αυτές οι ενώσεις μειώνουν το οξειδωτικό στρες με διάφορους τρόπους. Η κερκετίνη μειώνει το οξειδωτικό στρες με την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών, τη χηλίωση των μεταλλικών ιόντων και την αναστολή της οξειδάσης ξανθίνης και της υπεροξειδάσης των λιπιδίων. Μειώνει επίσης το οξειδωτικό στρες στον διαβήτη, που προκαλείται από στρεπτοζοτοκίνη, σε αρουραίους και στην επαγόμενη από αιθανόλη στο ήπαρ ποντικού.

Το καφεϊκό οξύ αναστέλλει το οξειδωτικό στρες σε αρουραίους με παροχή υψηλών δόσεων σιδήρου, μειώνοντας την υπεροξειδωτική βλάβη των λιπιδίων και αυξάνοντας τα

επίπεδα της βιταμίνης E στο πλάσμα. Ο φαιναιθυλεστερας του καφεϊκού οξέος (CAPE) που απομονώθηκε από την πρόπολη μελισσών προκάλεσε οξειδωτικό στρες του μυοκαρδίου σε αρουραίους, με σάρωση ελεύθερων ριζών.

Η καμφερόλη είναι ένα флаβονοειδές που μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το γλουταμινικό, στην κυτταρική σειρά ιπποκάμπου ποντικού HT-22, παρεμποδίζοντας την παραγωγή ROS. Η καμφερόλη επίσης αναστέλει το οξειδωτικό στρες σε κοκκία κυττάρων κατά τη διάρκεια της, με χαμηλά επίπεδα καλίου επαγόμενης, απόπτωσης.

Η απιγενίνη είναι ένα κοινό флаβονοειδές που βρίσκεται στο μέλι και είναι ικανό να μειώσει το οξειδωτικό στρες και να προστατεύσει την αγγειοχαλάρωση της αορτής σε αρσενικούς αρουραίους Sprague – Dawley (Md. Sakib Hossen 2017).

5.3. Έρευνες για αντιοξειδωτική δράση διαφόρων ειδών μελιού

5.3.1. Σκούρο μέλι

Μελέτη καταδείκνυε ότι οι φαινολικές ενώσεις του μελιού είναι εν μέρει υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική του δράση, επιβεβαιώνοντας τη σημασία του μελιού ως υγιεινού διατροφικού προϊόντος, ως πηγή αντιοξειδωτικών. Σε αυτήν παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα φαινολικών ενώσεων, που λαμβάνεται από το δείγμα σκούρου μελιού, έχει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (που μπορεί να αποδοθεί στην αναγωγική τους ικανότητα και τους εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών) από το δείγμα διαυγούς μελιού. Αυτά τα αποτελέσματα, που οφείλονται επίσης στις διαφορές στο προφίλ των φαινολικών ενώσεων, που εξαρτώνται από τη γεωγραφική προέλευση του μελιού (κυριαρχία χλωρίδας), είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι το σκούρο δείγμα μελιού έχει φαινολικές ενώσεις με υψηλότερες ιδιότητες μικροβιολογικών αναστολέων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν με θεραπευτικά χαρακτηριστικά. [Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, (Letícia Estevinho, Ana Paula Pereira, Leandro Moreira, Luís G. Dias, Ermelinda Pereira), Food and Chemical Toxicology, (Elsevier), December 2008.]

5.3.2. Μέλι από την κοιλάδα του Κασμίρ

Οι τέσσερις μονοποικιλιακοί τύποι μελιού από την κοιλάδα του Κασμίρ παρατηρήθηκαν ότι είναι πλούσιοι σε K, Ca, Na και P και πολυφαινολικές ενώσεις. Επιπλέον, αρκετοί σημαντικοί θετικοί συσχετισμοί έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ιδιότητα μπορεί να αποδοθεί σε φαινολικά και флаβονοειδή περιεχόμενα. Μεταξύ των αναλυθέντων τύπων μελιού, το μέλι μήλου παρουσίασε την υψηλότερη

αντιοξειδωτική δράση ακολουθούμενο από κεράσι, άγριο θάμνο (*P. rugosus*) και μέλι σαφράν. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι είναι δυνατή η αποτελεσματική ταξινόμηση του μελιού με την εφαρμογή χημειομετρικών τεχνικών. Η μελέτη επιβεβαίωσε επίσης ότι τα ιχνοστοιχεία έχουν υψηλότερη διακριτική ισχύ και αντιοξειδωτικές ικανότητες από ότι οι χρωστικές. [A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India, (Gulzar Ahmad Nayik, Vikas Nanda), LWT - Food Science and Technology, (Elsevier), December 2016.]

5.4. Εμπορικά διαθέσιμα είδη μελιού

Σε έρευνα που διεξήχθη, η αντιοξειδωτική δράση παρατηρήθηκε σε όλα τα εμπορικά διαθέσιμα μέλια, βασιλικό πολτό και πρόπολη. Συγκεκριμένα, το μέλι του φαγόπυρου έδειξε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Διακρίνεται ιδιαίτερα, η υψηλή αντιοξειδωτική δράση στα μέλια με σκούρο χρώμα, όπως το φαγόπυρο, και η μικρή δραστηριότητα των αντίστοιχων με το ανοιχτόχρωμο χρώμα, όπως το καθαρό μέλι (ακακία) και το μέλι από ιαπωνική μέλισσα. Ως αποτέλεσμα της θερμικής επεξεργασίας, η αντιοξειδωτική δράση μειώθηκε δραστικά σε αυτά τα μέλια, γεγονός που υποδηλώνει όχι μόνο την αποσύνθεση των βιταμινών, όπως η βιταμίνη B1, B2 και C, αλλά και την καταστροφή της ακεραιότητας των ενζύμων καταλάση και υπεροξειδάση. Παρά το γεγονός ότι υπάρχει ποσότητα βιταμίνης C στο μέλι (Crane, 1975, Ferreres et al., 1993, Ioyrish, 1974), η πλειονότητα της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μελιών μπορεί να προέρχεται από άλλες ενώσεις εκτός της βιταμίνης C. Ιδιαίτερα, η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της πρόπολης μπορεί να οφείλεται σε φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη, οι φλαβόνες, οι ισοφλαβόνες, οι φλαβονόνες, οι ανθοκυάνες, η κατεχίνη και η ισοκετίνη (Takeshi Nagai 2001).

5.4.1. Μέλι από *A. Cerana*

Σε διαφορετική μελέτη, αποδείχθηκε η αντιοξειδωτική δράση του μελιού από *A. Cerana* κατά την οξεία ηπατική βλάβη, που προκαλείται από το αλκοόλ σε ποντίκια. Συλλέχθηκαν δείγματα μελιού απευθείας από τέσσερις κύριες περιοχές στα βουνά Qinling της Κίνας και μετρήθηκαν τα συνολικά φαινολικά τους περιεχόμενα και οι αντιοξειδωτικές τους δραστηριότητες in vitro. Συνήθως, τα αντιοξειδωτικά συστατικά των μελιών συμπεριλαμβανομένων φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών και

ασκορβικού οξέος είναι το κλειδί για την αντιοξειδωτική δράση. Έχει αποδειχθεί ότι όλα τα δείγματα μελιού *A. Cerana* έχουν εξαιρετική αντιοξειδωτική ικανότητα, με δραστηριότητες εκκαθάρισης, όπως φαίνεται μέσω των διαδικασιών DPPH, FRAP και χηλίωσης ιόντων σιδήρου. Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων αποδίδεται στην διάταξη των υδροξυλίων και των καρβονυλικών ομάδων, καθώς και στην παρουσία υποκατάστατων που δίνουν ηλεκτρόνια ή υδρογόνα που είναι σε θέση να προκαλέσουν αναγωγή στις ελεύθερες ρίζες και να σχηματίζουν μια σταθερή φαινοξυλική ρίζα (Gülçin, 2012). Επιπλέον, το ασκορβικό οξύ θεωρείται επίσης ένα από τα πιο ισχυρά και λιγότερο τοξικά φυσικά αντιοξειδωτικά και μπορεί επίσης να τερματίσει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, με μεταφορά ηλεκτρονίων. Γενικά, οι φαινολικές ενώσεις είναι τα πιο κοινά και δημοφιλή αντιοξειδωτικά ευρέως ευρισκόμενα στο μέλι.

Αρχικά, τέθηκε η υπόθεση ότι η κατανάλωση μελιού *A. cerana* μπορεί να είναι ευεργετική για τους αλκοολικούς ασθενείς με ηπατική νόσο. Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί η ηπατοπροστατευτική δράση των μελιών *A. Cerana* από τα βουνά Qinling, αναμίχθηκαν ίσες ποσότητες δειγμάτων από τρεις περιοχές του βουνού Qinling (Foping, Fengxian και Zhenping), που κατέταξαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα in vitro. Επιπλέον διαφορετικές δόσεις του *A. Cerana*, του μείγματος μελιού *cerana* και η σιλυμαρίνη δόθηκαν σε ποντίκια για 12 εβδομάδες. Η σιλυμαρίνη είναι μία ηπατοπροστατευτική ουσία, που εξάγεται από το φαρμακευτικό φυτό *Carduus marianus*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο ελέγχου (Hellerbrand, Schattenberg, Peterburs, Lechner, & Brignoli, 2016). [Antioxidant and hepatoprotective effects of *A. cerana* honey against acute alcohol-induced liver damage in mice, (Haoan Zhao, Ni Cheng, Liangliang He, Guoxia Peng, Xiaofeng Xue, Liming Wu, Wei Cao), Food Research International, (Elsevier), November 2017.]

5.4.2. Είδη μελιού Μαλαισίας (Gelam και Coconut)

Έρευνα επιχείρησε να αξιολογήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα του μελιού της Μαλαισίας και τη σχέση μεταξύ των φαινολικών περιεχομένων και της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Επειδή τα διαφορετικά φυτά περιέχουν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις και παρουσιάζουν μεταβολές στο συνολικό τους περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες (Zheng and Wang, 2001), η σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών μελιού Gelam και Coconut στα παραπάνω, οφείλεται στη μεταβολή των φυτικών πηγών τους. Παρατηρήθηκε ότι τα φαινολικά που περιέχονται στα δύο είδη μελιού, είναι ποσοτικά και ποιοτικά διαφορετικά. Είναι πιθανό ορισμένες από τις υπάρχουσες φαινολικές ενώσεις να μην είναι αντιοξειδωτικές. Όμως, οι συνολικές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των εκχυλισμάτων μελιού έδειξαν το ίδιο πρότυπο δραστηριότητας με εκείνο της δραστηριότητας καθαρισμού των ελευθέρων ριζών.

Γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι μεταβολές στις αντιοξειδωτικές δραστηριότητες των μελιών οφείλονται στην ποσοτική και ποιοτική φύση των περιεχόμενων φαινολικών ουσιών. Παρατηρήθηκε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των συνολικών αντιοξειδωτικών δράσεων των δύο ειδών μελιού και των συνολικών φαινολικών τους, γεγονός που δείχνει ότι τα φαινολικά είναι τα συστατικά που ευθύνονται για τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις του μελιού, αλλά προφανώς και άλλοι παράγοντες. Αυτοί μπορεί να είναι μη-φαινολικά αντιοξειδωτικά, όπως ασκορβικό, α-τοκοφερόλη και β-καροτένιο. Το μέλι του Gelam παρατηρήθηκε ότι περιέχει μερικά φαινολικά οξέα, όπως τα φερουλικά, καφεϊκά, βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, ενώ το μέλι καρύδας περιέχει γαλλικά, καφεϊκά και βενζοϊκά οξέα, και μερικές άλλες άγνωστες φαινολικές ενώσεις (Al-Mehdi, 2002). Το μέλι έχει χρησιμοποιηθεί παγκοσμίως για τη θεραπεία ασθενειών και φαίνεται πολύ πιθανό ότι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός υποκρύπτει μερικές από τις θεραπευτικές επιδράσεις του μελιού. Επιπλέον, το μέλι μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παροχή αντιοξειδωτικών της διατροφής, σε εξαιρετικά ευχάριστη μορφή (Frankel κ.ά., 1998), και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως φυσικό αντιοξειδωτικό για τη μείωση των αρνητικών επιδράσεων κατά την ενζυμική επεξεργασία φρούτων και λαχανικών. Συμπερασματικά, η αντιοξειδωτική δράση του μελιού Gelam παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη από εκείνη του μελιού Coconut, η οποία οφειλόταν στη διαφορά στο φαινολικό τους περιεχόμενο και συνεπώς στις φυτικές πηγές τους. Επίσης, ήταν εμφανής η μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης του μελιού και του συνολικού περιεχομένου του σε φαινολικές ουσίες, υποδεικνύοντας ότι η αντιοξειδωτική δράση του μελιού οφείλεται κυρίως στα φαινολικά του συστατικά.

Από την άλλη πλευρά, η απομάκρυνση των δραστικών ριζών υδροξυλίου, που εικάζεται ότι παράγονται στο μέλι ως μέρος του αντιβακτηριακού συστήματος του μελιού, θα μπορούσε να ελεγχθεί από την αντιοξειδωτική δράση του μελιού. Το μέλι περιέχει τόσο υδατικά όσο και λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, και η αλληλεπίδραση μεταξύ τους κάνει το μέλι ένα ιδανικό φυσικό αντιοξειδωτικό, που μπορεί να δράσει σε διαφορετικές κυτταρικές θέσεις. (A.M. Aljadi 2004)

5.5. Πολυφαινόλες μελιού

Γενικά

Το οξειδωτικό στρες είναι η βάση της δομικής και λειτουργικής βλάβης στα κύρια βιομόρια όπως τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Στην πραγματικότητα, οι βλάβες αυτές οδηγούν στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι μεταβολικές διαταραχές και οι καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες. Η θεραπευτική επίδραση του μελιού προκύπτει από την παρουσία διαφόρων αντιοξειδωτικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων και των φαινολικών ενώσεων, όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η προστατευτική επίδραση στα καρδιαγγειακά, νευρικά, αναπνευστικά και γαστρεντερικά συστήματα.

Το μέλι περιέχει πολυφαινόλες. Όλες αυτές οι ενώσεις είναι συχνά το προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών φαινολικών ομάδων, που συνδέονται με περισσότερο ή λιγότερο σύνθετες δομές. Αυτές οι ουσίες αναγνωρίστηκαν ως οι κύριες υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού, που συνδέεται κυρίως με την ικανότητα καταστροφής ελεύθερων ριζών, μέσω του σχηματισμού πιο σταθερών και λιγότερο τοξικών μορίων. Οι φαινολικές ενώσεις σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες όταν αποδίδουν υδρογόνο από μια εκ των υδροξυλομάδων τους. Ο βαθμός δραστηριότητας σχετίζεται με τον αριθμό των υδροξυλομάδων αυτών.

Τα τελευταία χρόνια έχει προκύψει ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη και διάδοση μιας φλεγμονώδους κατάστασης, που οδηγεί στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Και οι δύο διαδικασίες έχουν βρεθεί συχνά ταυτόχρονα σε άτομα με διαβήτη, καρκίνο, καρδιαγγειακές, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και πολλές άλλες ασθένειες (Danila Cianciosi 2018).

5.6. Καρδιαγγειακές παθήσεις και ο ρόλος του μελιού ως τρόφιμο

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις (CVDs) είναι μια ομάδα ασθενειών που επηρεάζουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία. Αυτές περιλαμβάνουν την στεφανιαία καρδιακή νόσο, το εγκεφαλικό επεισόδιο, την στηθάγχη και τις συγγενείς καρδιακές παθήσεις, οι οποίες αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Οι πιο συνηθισμένοι παράγοντες κινδύνου για αυτή την πολυπαραγοντική ασθένεια είναι η ηλικία, το φύλο, η υπέρταση, η υπερχοληστερολαιμία, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και ένας ανθυγιεινός τρόπος ζωής, όπως το κάπνισμα, η σωματική αδράνεια, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η ανθυγιεινή διατροφή. Διάφορες επιδημιολογικές, κλινικές και πειραματικές μελέτες κατέδειξαν ότι η υψηλότερη πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής, σχετίζεται με τη βελτίωση της CVD. Οι πολυφαινόλες

βελτιώνουν την CVD μέσω διαφόρων μηχανισμών. Οι περισσότεροι από αυτούς παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία, αναστέλλουν τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, οδηγούν σε χαμηλότερη αρτηριακή πίεση, μείωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, μείωση του οξειδωτικού στρες, βελτίωση της στεφανιαίας αγγειοδιαστολής και μείωση της οξειδώσεως της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL). Οι καρδιαγγειακές παθήσεις είναι οι κύριες αιτίες θανάτου και αναπηριών στον κόσμο.

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις επικρατούν σε μεγάλο βαθμό παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, το 2008, 17,3 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από καρδιαγγειακές παθήσεις, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 30% του συνόλου των θανάτων στον κόσμο (George J. Crystal 2019).

Η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων είναι ένα άλλο κρίσιμο γεγονός στην παθογένεση πολλών τύπων καρδιαγγειακών νοσημάτων, όπως η αθηροσκλήρωση, το εγκεφαλικό επεισόδιο, ο σακχαρώδης διαβήτης και η στεφανιαία νόσος. Η συσσωμάτωση αιμοπεταλίων είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο αίμα. Είναι το στάδιο της ακολουθίας γεγονότων που οδηγούν στο σχηματισμό συσσωματώματος ή θρόμβου.

Πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες της διατροφής μειώνουν τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και εμποδίζουν την CVD. Το μέλι είναι πλούσια πηγή πολυφαινόλων. Οι πολυφαινόλες μελιού, όπως η κουκεστίνη, η απιγενίνη, η λουτεολίνη, η κατεχίνη και η ρουτίνη αναστέλλουν την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων in vitro μέσω δέσμευσης στον υποδοχέα θρομβοξάνης A2. Η κατανάλωση κερκετίνης αναστέλλει τη σηματοδότηση με τη μεσολάβηση του κολλαγόνου στα αιμοπετάλια και μειώνει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Η μείωση της αρτηριακής πίεσης, η βελτίωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, η μείωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, η βελτίωση της στεφανιαίας αγγειοδιαστολής και η μείωση της οξειδώσεως LDL είναι κάποιοι στόχοι για την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο μέλι εμποδίζουν τα καρδιαγγειακά νοσήματα μέσω των παραπάνω μηχανισμών. Η κερκετίνη στο μέλι, μείωσε τη συστολική αρτηριακή πίεση και τις συγκεντρώσεις οξειδωμένης LDL στο πλάσμα σε παχύσαρκους πληθυσμούς. Η κερκετίνη παρατηρήθηκε να μειώνει την οξείδωση της LDL, με αναστολή της μυελοϋπεροξειδάσης. Η κερκετίνη επίσης μείωσε την οξείδωση της LDL μέσω μακροφάγων κυττάρων, προλαμβάνοντας την παραγωγή λιποειδικών υδροϋπεροξειδίων. Η κερκετίνη παρατηρήθηκε να διεγείρει τη στεφανιαία αγγειοδιαστολή, μειώνοντας την έκφραση της ενδοθηλίνης-1 mRNA, και να βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία. Σε μια άλλη μελέτη, η κερκετίνη παρατηρήθηκε να ενισχύει την δράση της συνθάσης του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου και την μείωση παραγωγής ανιόντων υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) με τη μεσολάβηση της NADPH οξειδάσης, μειώνοντας την έκφραση του παράγοντα 1 των ουδετερόφιλων, και να παρεμποδίζει την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε υπερτασικούς αρουραίους. Η καθημερινή χορήγηση κερκετίνης, ρουτίνης και εσπεριδίνης στα 80mg / kg παρατηρήθηκε να μειώνει τόσο την οξεία όσο και την χρόνια φάση της φλεγμονής, σε ένα μοντέλο ανοσολογικής αρθρίτιδας σε

αρουραίους. Επομένως, η κερκετίνη, η ρουτίνη και η εσπεριδίνη πιθανόν να μπορούν να ασκήσουν ορισμένες αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες (George J. Crystal 2019).

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ μειωμένου κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών διαταραχών και κατανάλωσης τροφίμων εμπλουτισμένων με μερικές ενώσεις που υπάρχουν επίσης στο μέλι, όπως τα φλαβονοειδή και η βιταμίνη C.

Η καρδιοπροστατευτική δράση των φλαβονοειδών έχει αποδειχθεί ευρέως και οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς όπως: (i) τη μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων, (ii) την πρόληψη της οξειδωσης της LDL, και (iii) τη βελτίωση της στεφανιαίας αγγειοδιαστολής. Η μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων έχει καταδειχθεί in vitro σε έρευνα, όπου διερευνήθηκαν οι επιδράσεις διαφόρων τύπων μελιού στη συσσώρευση και την πήξη των αιμοπεταλίων. Το μέλι ανέστειλε την πήξη και στα τρία είδη υδατόπτωσης (ενδογενή, εξωγενή και στην κοινή υδατόπτωση) και σε μειωμένα επίπεδα ινωδογόνου.

Για όλους αυτούς τους λόγους, το μέλι μπορεί να θεωρηθεί εξαιρετικό για την εξουδετέρωση της διαδικασίας σχηματισμού αθηροσκληρωτικών πλακών, που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρδιακών διαταραχών. Στην παθογένεση των αθηροσκληρωτικών πλακών, η υπεροξειδωση των λιποειδών παίζει επίσης θεμελιώδη ρόλο.

Επιβεβαιώνεται ότι οι φαινολικές ενώσεις του μελιού έχουν προληπτικό και προστατευτικό αποτέλεσμα έναντι της βλαπτικής δράσης των ελευθέρων ριζών, εξουδετερώνοντας, όπως εξηγήθηκε, την υπεροξειδωση των λιποειδών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η αποφυγή της οξειδώσεως χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) σε λίγες in vitro μελέτες, γεγονός που επικυρώνει την αντίσταση κατά των καρδιαγγειακών παθήσεων. (Shi Shen 2018)

Περισσότεροι θάνατοι, αναπηρίες και επίσης μεγαλύτερο οικονομικό κόστος από οποιαδήποτε άλλη ασθένεια στον αναπτυγμένο κόσμο οφείλονται στην ισχαιμική καρδιοπάθεια (IHD). Οι σοβαρές ενδείξεις της IHD είναι οι αρρυθμίες και το έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI). Οι κοιλιακές αρρυθμίες, για παράδειγμα η κοιλιακή μαρμαρυγή και η κοιλιακή ταχυκαρδία, αποδείχθηκαν οι κύριες αιτίες θνησιμότητας κατά τη διάρκεια του MI και της καρδιακής χειρουργικής επέμβασης. Το καθαρό φυσικό μέλι χρησιμοποιούνταν, ωστόσο, για θεραπευτικούς σκοπούς από τις αρχέγονες εποχές σε σχέση με τις καρδιαγγειακές παθήσεις.

Το μεγαλύτερο μέρος της προηγούμενης έρευνας βασίστηκε σε ζώα και επικεντρώθηκε κυρίως στην επίδραση του μελιού σε παράγοντες καρδιακού κινδύνου, όπως η παραγωγή ελευθέρων ριζών και η υπερλιπιδαιμία. Στα αντιοξειδωτικά του μελιού περιλαμβάνονται φλαβονοειδή, βιταμίνη C, πολυφαινόλες και μονοφαινόλες. Η κατανάλωση φλαβονοειδών σε τακτική βάση συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο καρδιακών παθήσεων.

Οι συνολικές φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι έχουν ευοίωνες επιπτώσεις στη θεραπεία των καρδιακών παθήσεων. Στη στεφανιαία νόσο (CHD), τα προστατευτικά αποτελέσματα των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνουν αγγειοδιασπαστική, αντιοξειδωτική, αντι-ισχαιμική και αντιθρομβωτική ιδιότητα.

Υπάρχουν τρεις βασικές ενέργειες: 1) η βελτίωση της στεφανιαίας αγγειοδιαστολής, 2) η μείωση της ικανότητας των αιμοπεταλίων στο αίμα να υποστούν θρόμβωση και 3) η ανθεκτικότητα των LDL στην οξείδωση, μέσω των οποίων τα φλαβονοειδή μειώνουν τον κίνδυνο CHD. Σε μελέτη εξετάστηκε λεπτομερώς σε 38 υπέρβαρα άτομα η επίδραση του φυσικού μελιού στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της χοληστερόλης λιποπρωτεϊνών υψηλής και χαμηλής πυκνότητας (HDL-C, LDL-C), της c-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), των τριακυλογλυκερολών, της γλυκόζης αίματος σε κατάσταση νηστείας και στο σωματικό βάρος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατανάλωση του μελιού οδήγησε στη μείωση της ολικής χοληστερόλης, της CRP, των τριακυλογλυκερολών και της LDL.

Αρκετές έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το φυσικό μέλι μετριάζει τους παράγοντες καρδιακού κινδύνου (CVD), κυρίως σε άτομα με αυξημένο κίνδυνο και δεν αύξησε το σωματικό βάρος των παχύσαρκων ατόμων. Σε άλλη μελέτη που διεξήχθη σε ανθρώπους για τις μεταγενέστερες επιδράσεις της λήψης 75g φυσικού μελιού, με την ίδια ποσότητα τεχνητού μελιού, φάνηκε ότι η αύξηση της ινσουλίνης και των επιπέδων της CRP ήταν μεγαλύτερη μετά την πρόσληψη γλυκόζης από ό, τι μετά την κατανάλωση του μελιού. Σε ανθρώπους με υπερτριγλυκεριδαμία, το τεχνητό μέλι αύξησε τα τριγλυκερίδια (TG), ενώ το φυσικό μέλι μείωσε τη συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων. Σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία, το τεχνητό μέλι είχε ουδέτερη δράση στα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, ενώ με το φυσικό μέλι μειώθηκαν. Επιπλέον, το μέλι οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερη αύξηση της γλυκόζης στο πλάσμα σε διαβητικούς ασθενείς.

Το μέλι αποτελείται από μεταβολίτες νιτρικού οξειδίου και τα αυξημένα επίπεδά του στο μέλι έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση των καρδιακών παθήσεων. Το μέλι έχει επίσης τη δυνατότητα να μειώνει την ενδοφλέβια πίεση του αίματος, που μπορεί να μειώσει την υπερλειτουργία της καρδιάς, και κατά συνέπεια μπορεί να μειώσει τη συμφόρηση του φλεβικού συστήματος.

Οι προφυλακτικές επιδράσεις του φυσικού μελιού ως φαρμακολογικού παράγοντα σε επαγόμενα από ισχαιμία / επαναιμάτωση (I / R) τραύματα, που επιβεβαιώθηκαν σε απομονωμένη καρδιά αρουραίου, έδειξαν ότι η παρατεταμένη λήψη από το στόμα φυσικού μελιού για 45 ημέρες, προκαλεί ισχυρές αντι-εμφραγματικές και αντι-αρρυθμικές επιδράσεις σε αρουραίους. Σε άλλη έρευνα, φυσικό μέλι (5 g / kg) χορηγούμενο για μία ώρα σε αναισθητοποιημένους φυσιολογικούς ή καταπονημένους αρουραίους, πριν από την χορήγηση αδρεναλίνης (100 mcg / kg), έδειξε προφύλαξη από καρδιακές διαταραχές και από αγγειοκινητική δυσλειτουργία, προκαλούμενη από επινεφρίνη, και της αδρεναλίνης.

Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το φυσικό μέλι είναι ικανό να προκαλέσει καρδιοπροστατευτικά και θεραπευτικά αποτελέσματα, σε σύγκριση με την καρδιακή και αγγειοκινητική δυσλειτουργία που προκαλείται από την αδρεναλίνη, άμεσα ή έμμεσα, από την απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου μέσω της επίπτωσης της βιταμίνης C στο ενδοθήλιο. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να περιοριστεί λόγω της νευρο-προστατευτικής δράσης του μελιού, όπως φάνηκε ότι ανταποκρίνεται στον κυτταρικό θάνατο in vitro και στην εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία in vivo.

Το μέλι, που περιέχει οργανικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση κατά των ελευθέρων ριζών, φαίνεται ότι έχει την ικανότητα να συμβάλει στην ανθρώπινη διατροφή ως ζωτική πηγή αντιοξειδωτικών. (M. B. Rabia Shabir Ahmad 2017)

Μία από τις πιο αξιοσημείωτες εφαρμογές του μελιού είναι η μείωση των επιπέδων χοληστερόλης σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία. Για παράδειγμα, η συνεχής χορήγηση 75 g μελιού που διαλύθηκε σε 250 ml νερού για 15 ημέρες μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των λιπιδίων.

Μια άλλη μελέτη ανέφερε τις επιδράσεις του μελιού στη γλυκόζη αίματος σε κατάσταση νηστείας (FBG), στο σωματικό βάρος, τη χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL-C), τη συνολική χοληστερόλη, τη χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL-C), την τριακυλογλυκερόλη και την (CRP) σε 55 ασθενείς, και έδειξε ότι εκ του στόματος χορήγηση 70 g μελιού για 30 ημέρες, οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της LDL, των τριακυλογλυκερολών και της χοληστερόλης σε υπέρβαρους ασθενείς. Επιπλέον, τα επίπεδα HDL-C αυξήθηκαν κατά 10% μετά την κατανάλωση μελιού για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, υποδηλώνοντας ότι η τακτική κατανάλωση μελιού έχει οφέλη για την υγεία, μέσω του γλυκαιμικού ελέγχου και της βελτίωσης του λιπιδαιμικού προφίλ, που οδηγεί άμεσα ή έμμεσα σε μείωση της εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων.

Η χορήγηση μελιού (3 g / kg / ημέρα) για 45 ημέρες έδειξε μια βελτίωση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου σε αρουραίους. Έχει αναφερθεί θετική επίδραση στην διαταραχή των ενζύμων των καρδιακών δεικτών [κίνηση της κρεατίνη-MB (CK-MB), γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) και ασπαρτική τρανσαμινάση (AST)]. (Pasupuleti Visweswara Rao 2016)

6.Μεθοδολογίες πειραμάτων

Δράσεις που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία

- Προσδιορισμός ολικών φαινολικών
- Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών
- DPPH
- Αντιθρομβωτική δράση
- Οξειδωση πλάσματος

6.1 Μεθοδολογία Προετοιμασίας δειγμάτων

Υλικά και Αντιδραστήρια

1. 3 Δείγματα Μελιού
2. Μεθανόλη

Όργανα και εξοπλισμός

1. Ζυγός ακριβείας
2. Κωνικές φιάλες
3. Τράπεζα ανάδευσης
4. Γυάλινη ράβδος

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων αρχικά παραλήφθηκε μέλι από 2 περιοχές της Λήμνου τη Σκανδάλη και το Γομάτι και ένα δείγμα μελιού από μείγμα διαφόρων μελιών από διάφορες περιοχές της Λήμνου. Στην συνέχεια ζυγίστηκαν 7.5 g μέλι με την βοήθεια ηλεκτρονικού ζυγού. Ακολούθως προστέθηκαν 25ml CH₃OH σε κάθε ένα από τα τρία δείγματα και τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης για 24 ώρες στα 200 rpm. Ο τελικός όγκος μεταφέρθηκε σε μικροφουελίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου και αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη στους -40°C έως περαιτέρω ανάλυση.

7. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

7.1. Σκοπός

Η ποσοτική εκτίμηση των ολικών φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα υπό μελέτη δείγματα.

7.2. Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) είναι μία διαδικασία φασματοφωτομετρική που βασίζεται σε μια χημική αναγωγή του ομόλογου αντιδραστήριου (αντιδραστήριο FC) που αποτελεί ένα μίγμα οξειδίων βολφραμίου και μολυβδαινίου. Τα προϊόντα της αναγωγής των οξειδίων των μετάλλων έχουν μπλε χρώμα, το οποίο παρουσιάζει μία ευρεία απορρόφηση φωτός με μέγιστο στα 765 nm. Η ένταση της απορρόφησης του φωτός σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

Η μέθοδος FC έχει υιοθετηθεί ως η επίσημη μέθοδος για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών. Η ανάπτυξη του χρώματος είναι αργή αλλά μπορεί να επιταχυνθεί με τη θέρμανση του δείγματος. Με την υπερβολική θέρμανση, ωστόσο, ακολουθεί γρήγορη απώλεια του χρώματος και καθιστά πολύ δύσκολη την μέτρηση αναπαραγωγικών αποτελεσμάτων. Το αντιδραστήριο FC είναι εμπορικά διαθέσιμο, αλλά μπορεί να παρασκευαστεί ακολουθώντας το πρωτόκολλο παρασκευής του (Singleton και Rossi, 1965).

7.3. Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Γαλλικό οξύ (M.W: 170.12 g/mol)
2. Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC)
1. *Αποθηκεύεται σε σκοτεινό μέρος ή και σκουρόχρωμη φιάλη και τα δείγματα απορρίπτονται εάν γίνουν εμφανώς πράσινα
2. Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) (M.W: 105.99 g/mol)
3. Απιονισμένο νερό (dH₂O)
4. Υπό μελέτη δείγματα

7.4. Όργανα και Εξοπλισμός

1. Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-5 mL, 5-50μL, 20-200μL και 0,5-10μL
2. Αυτόματη πιπέτα σταθερού όγκου 100μL
3. Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
4. Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
5. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
6. Ποτήρια ζέσεως
7. Ρύγχοι αυτόματων πιπετών 8.
8. Τριβάλβοδο πουάρ
9. Πλαστικές κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1cm και όγκου 1mL
10. Σιφόνιο του 1,0 mL
11. Σπάτουλα ζύγισης
12. Στατώ
13. Τράπεζα ανακίνησης/ανάδευσης (Shaker)
14. Υδατόλουτρο
15. Υδροβολέας

16. Φασματοφωτόμετρο (765nm)

7.5. Παρασκευή διαλυμάτων

7.5.1. Γαλλικό οξύ (Gallic acid; GA)

Ποσότητα 0,05 g γαλλικού οξέος διαλύεται σε 1,0 mL αιθανόλης και το όλο αραιώνεται ως τελικού όγκου 10,0 mL με dH₂O δίνοντας τελική συγκέντρωση 5000 mg/L.

7.5.2. Διάλυμα Ανθρακικού Νατρίου (Na₂CO₃)

Ποσότητα 200 g άνυδρου Na₂CO₃ διαλύονται σε 800 mL dH₂O και το όλο φέρεται σε βρασμό. Αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται λίγοι κρύσταλλοι Na₂CO₃ και αφήνεται για 24h. Ακολουθεί διήθηση σε ογκομετρική φιάλη του 1 L όπου και συμπληρώνεται ως τη χαραγή με dH₂O και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

7.5.3. Πρότυπα διαλύματα

Χρησιμοποιώντας το διάλυμα φύλαξης του πρότυπου γαλλικού οξέος (GA) συγκέντρωσης 5000 mg/L παρασκευάζονται σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 50, 100, 250 και 500 mg/L σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5):

Πίνακας 1: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Πρότυπο (mg/L)	Δείγμα	Όγκος (μL)	Όγκος (μL)	
		GA (5000 mg/L)	GA (500 mg/L)	dH ₂ O
Π1 (500)		200		1800
Π2 (250)			1000	1000
Π3 (100)			300	1200
Π4 (50)			200	1800

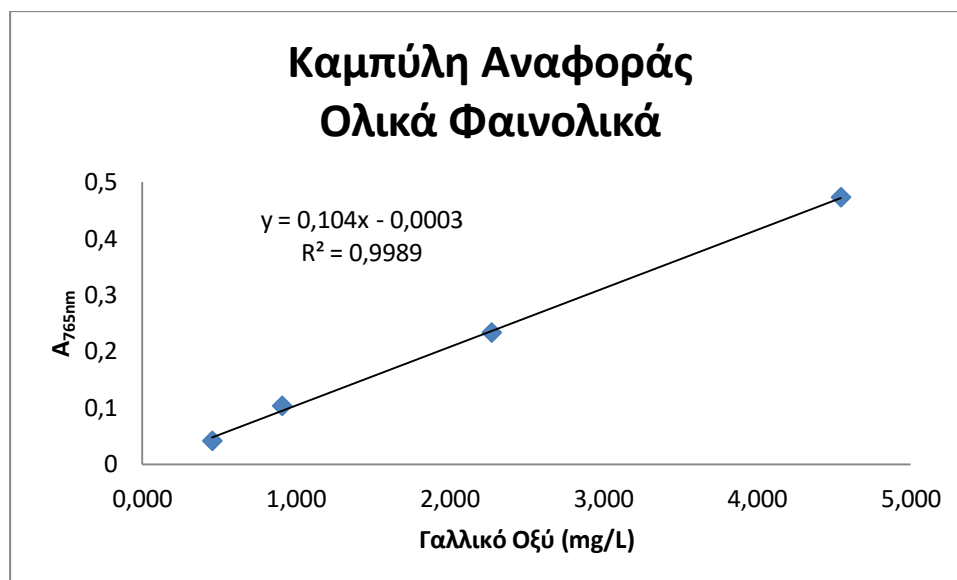
7.6. Πειραματική πορεία

1. Σε 4 υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται 20 μL από το κάθε πρότυπο διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης που παρασκευάστηκε με βάση τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 5) και προκύπτουν τα διαλύματα Π1, Π2, Π3 και Π4.
2. Χρησιμοποιείτε ένας επιπλέον υάλινος δοκιμαστικός σωλήνας για να παρασκευαστεί το τυφλό διάλυμα.
3. Σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες, προσθέτουμε τις κατάλληλες ποσότητες δείγματος (μελιού), προς υπολογισμό φαινολικών.

4. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη dH₂O έως τελικού όγκου 1800 μL.
5. Ακολουθεί προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 100 μL αντιδραστηρίου FC.
6. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη συσκευή Vortex.
7. Ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε σκοτεινό μέρος (*Η επώαση δε θα πρέπει να ξεπεράσει τα 8 λεπτά).
8. Ακολουθεί προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 300 μL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃.
9. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη συσκευή Vortex.
10. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 40 οC για επώαση 30 λεπτών.
11. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 765 nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης.

7.6.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για τη κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από διάλυμα φύλαξης γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 5 g/L (0,03M) διαλύματα με συγκεντρώσεις 50 mg/L (0,3 μM), 100 mg/L (0,6 μM), 250 mg/L (1,5 μM), 500 mg/L (3μM). Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα με 1800μL dH₂O, 100 μL αντιδραστηρίου FC και 300 μL διαλύματος κορεσμένου Na₂CO₃.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας Folin-Ciocalteu

8. Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών

8.1. Σκοπός

Η ποσοτική εκτίμηση των ολικών φλαβονοειδών που περιέχονται στα υπό μελέτη δείγματα.

8.2. Αρχή Μεθόδου

Αποτελεί μία φασματοφωτομετρική μέθοδο, όπου η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών ενώσεων που περιέχονται στο διάλυμα. Παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση φωτός στα 510 nm.

8.3 Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Ρουτίνη (M.W.: 664,58 g/mol)
2. Μεθανόλη (CH₃OH)
3. Νιτρώδες Νάτριο 5% (NaNO₂) (1:20)
4. Τριχλωριούχο Αργίλιο 10% (AlCl₃) (1:10)
5. Καυστικό Νάτριο (NaOH) (1M)
6. Υπερκάθαρο νερό
7. Υπό μελέτη δείγματα

8.4. Όργανα και Εξοπλισμός

1. Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 5-50 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL
2. Αναλυτικός ζυγός
3. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
4. Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
5. Ποτήρια ζέσεως
6. Ρύγχοι αυτόματων πιπετών
7. Τριβάλοδο πουάρ
8. Πλαστικές κυψελίδες οπτικής διαδρομής 1cm και όγκου 1mL
9. Σιφόνιο των 10,0 mL
10. Στατώ
11. Σπάτουλα ζύγισης
12. Φασματοφωτόμετρο (510nm)

8.5. Παρασκευή διαλυμάτων

8.5.1. Ρουτίνη (Rutin; R)

Ποσότητα 8,3 mg ρουτίνης διαλύεται σε 8,3 mL μεθανόλης δίνοντας τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 1,505 mM.

8.5.2. Νιτρώδες Νάτριο 5% (NaNO₂) (1:20)

Ποσότητα 5,0 g NaNO₂ προστίθενται σε 80 mL dH₂O και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με dH₂O.

8.5.3. Τριγλωριούχο Αργίλιο 10% (AlCl₃) (1:10)

Ποσότητα 10,0 g AlCl₃ προστίθενται σε 80 mL dH₂O και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με dH₂O.

8.5.4. Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 1M

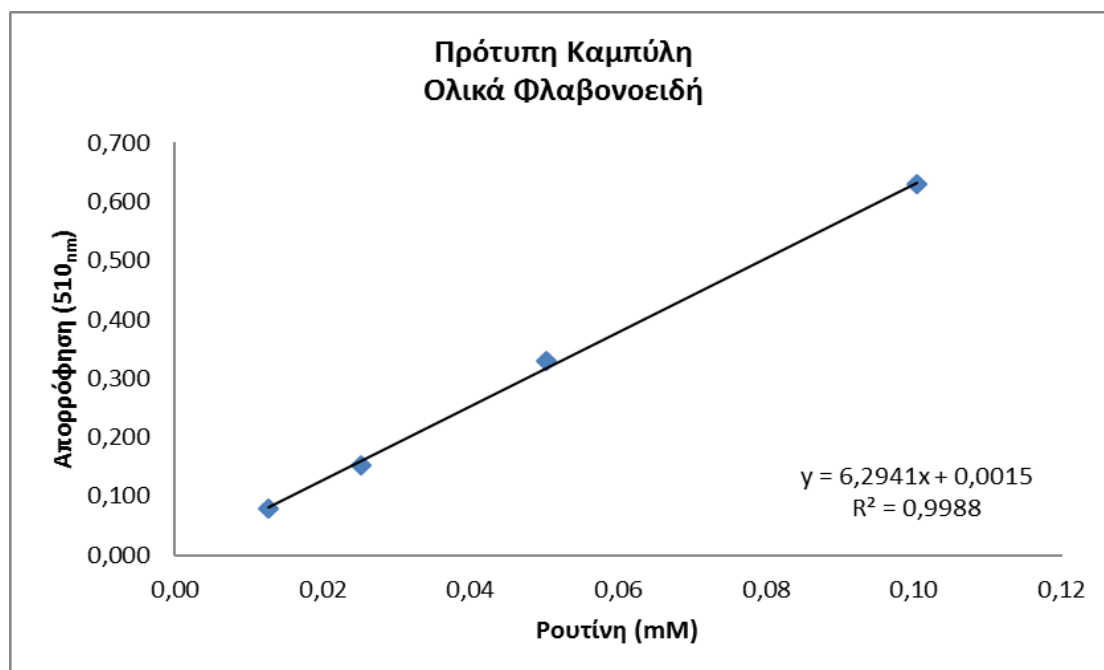
Ποσότητα 4,0 g NaOH προστίθενται σε 80 mL dH₂O και το όλο αναδεύεται έως διαλυτοποίησης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 100,0 mL με dH₂O.

8.6. Πειραματική πορεία

1. Σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε τις κατάλληλες ποσότητες δείγματος μελιού, προς υπολογισμό φλαβονοειδών.
2. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες γίνεται προσθήκη υπερκάθαρου νερού ως τελικού όγκου 888 μL.
3. Ακολουθεί προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 36 μL 5% NaNO₂.
4. Ακολουθεί καλή ανάδευση με το Vortex.
5. Μετά από 5 λεπτά ακολουθεί προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 36 μL 10% AlCl₃.
6. Ακολουθεί καλή ανάδευση με το Vortex.
7. Μετά από 6 λεπτά ακολουθεί προσθήκη σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες 240 μL NaOH 1M.
8. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 510 nm και γίνεται καταγραφή των τιμών απορρόφησης.
9. Παράλληλα ετοιμάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με χρήση διαλύματος φύλαξης του πρότυπου ρουτίνης συγκέντρωσης 1,505 mM καθώς και ένα κενό διάλυμα για το τυφλό προσδιορισμό και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μg ρουτίνης.

8.7. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για τη κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς ρουτίνης παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από διάλυμα φύλαξης ρουτίνης συγκέντρωσης 1,505 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 10, 20, 40 και 80 μg ρουτίνης.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας Ολικά Φλαβονοειδή

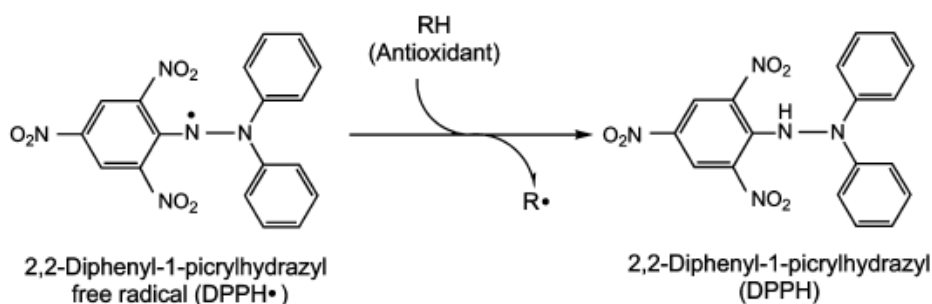
9. Δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)

9.1. Σκοπός

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω δέσμευσης μιας σταθερής και εμπορικά διαθέσιμης οργανικής ρίζας αζώτου.

9.2. Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου του DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο) βασίζεται στην εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματός του στα 515 nm κατά τη δέσμευσή του από τα αντιοξειδωτικά.



Αντίδραση DPPH

9.3. Όργανα και Εξοπλισμός

1. Μεθανόλη (CH₃OH)
2. Υπερκάθαρο H₂O
3. DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο)
4. Trolox (M.W: 290,29 g/mol)
5. Υπό μελέτη δείγματα

9.4. Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 0,5-10 μ L, 5-50 μ L, 20-200 μ L και 100-1000 μ L
2. Φιαλίδια από πολυπροπυλένιο των 2,0 mL
3. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
4. Ζυγός ακριβείας
5. Κυκλοαναδευτήρας (Vortex)
6. Κωνικές φιάλες των 50 και 100 mL
1. Κυψελίδες πολυστυρενίου οπτικής διαδρομής 1cm και όγκου 1mL
2. Σπάτουλα ζύγισης
3. Στατώ
4. Υδροβολέας
5. Φασματοφωτόμετρο (515nm)
6. Χαρτί ζύγισης

9.5. Παρασκευή διαλυμάτων

9.5.1. Διάλυμα φύλαξης DPPH συγκέντρωσης 600 μ M

Ζυγίζονται 0,0118 g DPPH (m.w: 394,32 g/mol) και αναδιαλύονται σε 25 mL CH₃OH. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με CH₃OH έως τα 50,0 mL. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40°C.

9.5.2. Διάλυμα φύλαξης Trolox συγκέντρωσης 6,2 mM

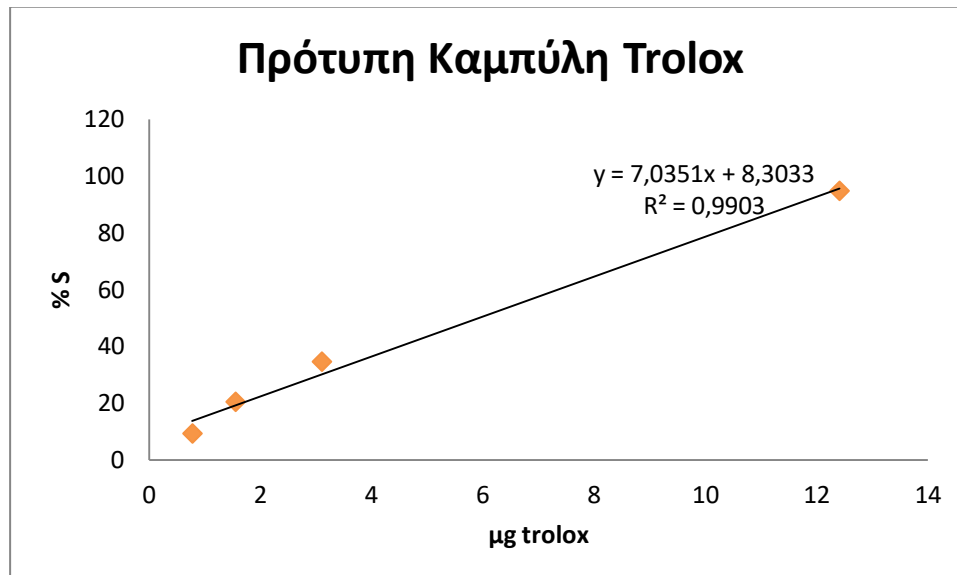
Σε κωνική φιάλη παρασκευάζονται 10,0 mL διαλύματος CH₃OH/H₂O, 1/1 (v/v). Ζυγίζονται 0,0160g Trolox 97% (m.w.: 250,29 g/mol) και αναδιαλύονται σε 5,0 mL CH₃OH/H₂O, 1/1 (v/v). Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10,0 mL και συμπληρώνεται ο όγκος έως τα 10,0 mL με CH₃OH/H₂O, 1/1 (v/v) δίνοντας συγκέντρωση 6,2 mM. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου μικρού όγκου στους -40°C.

9.6. Πειραματική Πορεία

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται κατάλληλοι όγκοι δείγματος μελιού και συμπληρώνεται ο όγκος με CH_3OH έως τα 900 μL .
2. Ακολουθεί ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα.
3. Ακολουθεί προσθήκη 100 μL DPPH ανά 30 sec στο κάθε δείγμα.
4. Ακολουθεί καλή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα.
5. Ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό μέρος για 15min.
6. Μετά την επώαση γίνεται φωτομέτρηση στα 515nm και καταγραφή των τιμών απορρόφησης.
7. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με Trolox (ανάλογο της Βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox. Χρησιμοποιείται ένας επιπλέον δοκιμαστικός σωλήνας για να παρασκευαστεί το διάλυμα αναφοράς που περιέχει 900 μL CH_3OH και 100 μL DPPH.

9.6.1. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς Trolox παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από το διάλυμα φύλαξης του trolox συγκέντρωσης 6,2 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 3 , 6 , 12,5 , 25, 37 και 50 nmol trolox.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς Δοκιμασίας DPPH

10. Εκτίμηση της αντιαθηρογόνου δράσης των δειγμάτων μέσω αναστολής της *in vitro* οξειδωσης πλάσματος αίματος από ιόντα Cu^{2+}

10.1 Σκοπός

Ο προσδιορισμός της ικανότητας των δειγμάτων να αναστέλλουν την οξειδωση του πλάσματος από αίμα ανθρώπου.

10.2 Αρχή Μεθόδου

Η μέτρηση της *in vitro* οξειδωσης του πλάσματος από αίμα ανθρώπου, προκαλούμενη από ιόντα Cu^{2+} , βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245 nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στα συζυγή διένια των υδροπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις, όπως συζυγή διένια υδροξυδίων, που παράγονται κατά την οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, όταν προστίθενται ιόντα Cu^{2+} .

Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245 nm παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης της κινητικής της οξειδωσης, που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα του αίματος. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη, καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών, τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξειδωσης των αντιοξειδωτικών, η απορρόφηση στα 245 nm αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος, που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά, καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του πλάσματος στην οξειδωση. Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245 nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μια σιγμοειδή καμπύλη, με κύριο χαρακτηριστικό το χρόνο της λανθάνουσας φάσης (lag time).

Άλλα χαρακτηριστικά των καμπυλών οξειδωσης του πλάσματος είναι τα εξής:

- Μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245 nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης ανά min χρόνος (t_{max}) κατά τον οποίο παρατηρείται η V_{max} .
- Μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης.

10.3. Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών
2. Πλάσμα από αίμα ανθρώπου
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH=7,4, με 145 mM NaCl
4. Υδατικό διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 mM)
5. Υπό μελέτη δείγματα

10.4. Όργανα και Εξοπλισμός

1. Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL
2. Ποτήρια ζέσεως των 100 mL
3. Φασματοφωτόμετρο (245 nm)
4. Κυψελίδες από χαλαζία των 3 mL και οπτικής διαδρομής 1 cm
5. Αυτόματες πιπέτες των 0,5-5 mL, 0,5-10 μL 5-50 μL και 20-200 μL

10.5. Παρασκευή διαλυμάτων

10.5.1. Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (AC)

Σε 100 mL dH_2O διαλύονται 1,365 g ένυδρου κιτρικού οξέος ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και 2,5 g διωδρικού κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

10.5.2. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH = 7,4, 146 mM σε NaCl

Σε 240 mL dH_2O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται προς διαλυτοποίηση 0,2269 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0602 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και 2,1332 g NaCl. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και προστίθεται dH_2O έως τελικό όγκο 250 mL.

10.5.3. Υδατικό διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης 1mM

Σε 200 mL dH_2O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται προς διαλυτοποίηση 49,939 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

10.5.4. Πλάσμα από αίμα ανθρώπου

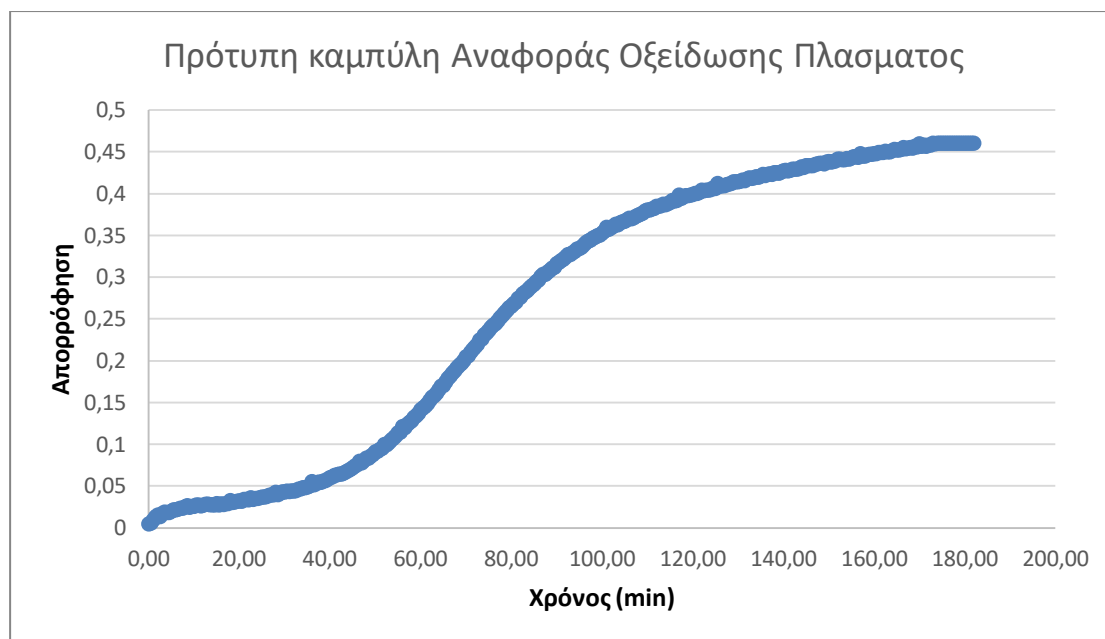
Με αποστειρωμένη σύριγγα λαμβάνονται 20,0 mL αίματος και τοποθετούνται σε σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50 mL με βιδωτό πώμα που περιέχει 2,0 mL αντιπηκτικού διαλύματος κιτρικών. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για 1 min και φυγοκέντρηση στα 1500 g για 20 min. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποτελεί το πλάσμα του αίματος και αποθηκεύεται ανά 500 μL σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου με καπάκι στους -40°C.

10.6. Πειραματική Πορεία

1. Σε υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας κατάλληλες ποσότητες δειγμάτων.
2. Γίνεται προσθήκη 2200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), pH=7,4 και 146 mM σε NaCl.
3. Ακολουθεί καλή ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα.
4. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του PBS σε όλα τα δείγματα, ετοιμάζουμε και δείγμα αναφοράς που δεν περιέχει δείγματα.
5. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 50 μL πλάσματος σε όλα τα δείγμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση.
6. Ακολουθεί η προσθήκη 250 μL υδατικού διαλύματος $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mM και ήπια ανάδευση
7. Τα δείγματα μεταφέρονται ΑΜΕΣΩΣ σε κυψελίδες κατάλληλες για μέτρηση στην υπεριώδη περιοχή και τοποθετούνται στο φωτόμετρο για καταγραφή της απορρόφησης στα 245 nm για χρονικό διάστημα 3 ωρών.

Σημείωση:

- Τα συγκρίνονται ως προς το δείγμα αναφοράς το οποίο περιέχει PBS pH 7,4, πλάσμα αίματος και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mM.
- Παρασκευάζεται ένα δείγμα αναφοράς για όλα τα υπό μελέτη δείγματα.



Διάγραμμα 4: Πρότυπη Καμπύλη Δείγματος Αναφοράς Οξείδωσης Πλάσματος

11. Εκτίμηση της αντιθρομβωτικής δράσης μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP)

11.1.Σκοπός

Ο προσδιορισμός της ικανότητας των δειγμάτων να αναστέλλουν τη θρόμβωση προκαλούμενη από τον Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor; PAF), σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP).

11.2.Αρχή Μεθόδου

Η *in vitro* μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων αποτελεί μία προσπάθεια προκειμένου να χαρακτηριστεί η *in vitro* ικανότητα των αιμοπεταλίων να σχηματίζουν πρωτογενές αιμοστατικό θρόμβο.

Αιμοπετάλια σε εναιώρημα πλάσματος απομονώνονται από δείγμα αίματος σε αντιπηκτικό μέσω φυγοκέντρησης σε χαμηλή ταχύτητα, παραλαμβάνοντας παρασκευάσμα γνωστό ως πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP: Platelet Rich Plasma). Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP: Platelet Poor Plasma) παρασκευάζεται με φυγοκέντρηση του κατακείμενου της πρώτης φυγοκέντρησης του αίματος σε υψηλότερη ταχύτητα.

Το συσσωρευματομέτρο τύπου Born, γνωστό και ως οπτικό συσσωρευματομέτρο, είναι ένα τροποποιημένο φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος με θάλαμο θέρμανσης των δειγμάτων στους 37 °C. Κατά τη μέτρηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων απαιτείται ανάδευση των δειγμάτων, καθώς η επαφή μεταξύ των αιμοπεταλίων είναι αναγκαία προκειμένου να επέλθει η συσσώρευσή τους σε *in vitro* συνθήκες.

Μία δέσμη υπέρυθρου φωτός διέρχεται από τα δείγματα που βρίσκονται στις κυψελίδες μέσα στους θαλάμους υποδοχείς. Η μία κυψελίδα περιέχει PRP, και αποτελεί το υπό εξέταση δείγμα, και η δεύτερη περιέχει PPP, και αποτελεί το δείγμα αναφοράς. Δίοδοι φωτός σιλικόνης ανιχνεύουν το φως που είναι σε θέση να διαπερνάει τα δείγματα: το PRP θεωρείται αυθαίρετα ότι αποδίδει 0% μετάδοση φωτός που αντιστοιχεί σε 0% συσσώρευση, ενώ το PPP θεωρείται ότι αποδίδει 100% μετάδοση φωτός που αντιστοιχεί σε 100% συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η διαφορά των αποτελεσμάτων μετάδοσης φωτός μεταφέρεται από τις διόδους φωτός σε συσκευές καταγραφής.

Όταν γίνεται προσθήκη ενός θρομβωτικού παράγοντα στην κυψελίδα που περιέχει PRP, τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται στη δράση αυτού του παράγοντα, και οι μεταβολές που προκαλούνται στη διάδοση του φωτός καταγράφονται με την πάροδο του χρόνου από τη συσκευή καταγραφής.

Όταν τα αιμοπετάλια υπόκεινται σε αλλαγή σχήματος σε απόκριση ενός θρομβωτικού παράγοντα, αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος που επιτρέπει λιγότερο φως να περάσει μέσα από το PRP: αυτό καταγράφεται ως λιγότερη μετάδοση φωτός διαμέσου του δείγματος σε σχέση με το PPP. Αν η δόση του παράγοντα θρόμβωσης είναι αρκετά ισχυρή ώστε να προκαλέσει προσκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους προς συσσώρευση και σχηματισμό συσσωματώματος, περισσότερο φως είναι ικανό να περάσει διαμέσου του δείγματος PRP. Η αλλαγή της μετάδοσης του φωτός καταγράφεται, με την πάροδο του χρόνου, και δείχνει μία τάση προς το πλάσμα το φτωχό σε αιμοπετάλια που αντιστοιχεί σε 100% μετάδοση φωτός ή 100% συσσώρευση.

Η καταγραφή την *in vitro* συσσώρευσης χαρακτηρίζεται από:

1. Αλλαγή σχήματος
2. Ένα πρώτο κύμα συσσώρευσης (αρχική συσσώρευση) που μπορεί να είναι αντιστρεπτό και να επιστρέψει προς την αρχική τιμή του PRP.
3. Ένα μη αντιστρεπτό δεύτερο κύμα συσσώρευσης που εμφανίζεται όταν τα εκκρινόμενα περιεχόμενα των κοκκίων των αιμοπεταλίων συνιστούν ερέθισμα που προκαλεί επιπλέον συσσώρευση.

Οι καμπύλες συσσώρευσης χαρακτηρίζονται επίσης από:

1. Το μέγιστο ποσοστό μεταβολής της μετάδοσης του φωτός προκαλούμενο από τον θρομβωτικό παράγοντα (επί τοις εκατό συσσώρευση).
2. Από την καμπύλη συσσώρευσης που προκαλείται από ορισμένη συγκέντρωση συσσωρευτικού παράγοντα.
3. Την κλίση ή το ποσοστό της συσσώρευσης, ως % μεταβολή της συσσώρευσης ανά λεπτό.

Από τη γραμμική περιοχή που αντιστοιχεί στο 20 έως 80% της μέγιστης συσσώρευσης παρουσία ή όχι συστατικών από τρόφιμα υπολογίζεται η % αναστολή της θρόμβωσης, η οποία ορισμένες φορές εκφράζεται και ως IA_{50} που αφορά την συγκέντρωση μίας ουσίας τροφίμων που απαιτείται για να προκαλέσει 50% αναστολή της μέγιστης θρόμβωσης.

Για τον χαρακτηρισμό των αποτελεσμάτων ως % συσσώρευση μέσω των καμπυλών συσσώρευσης αιμοπεταλίων χρησιμοποιήθηκε το μέγιστο ποσοστό μεταβολής της μετάδοσης του φωτός προκαλούμενο από τον θρομβωτικό παράγοντα PAF.

11.3. Υλικά και αντιδραστήρια

1. Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1%) ελεύθερος πυρετογόνων
2. Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών (AC)
3. Διάλυμα φύλαξης βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL
4. Διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL
5. Διάλυμα φύλαξης PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{CH}_3\text{OH}$ 1/1 (v/v)
6. Διάλυμα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $2,6 \times 10^{-4}$ M, $2,6 \times 10^{-5}$ M, $2,6 \times 10^{-6}$ M και $2,6 \times 10^{-7}$ M σε διάλυμα εργασίας BSA
7. Υπό μελέτη δείγματα
8. Πλάσμα από αίμα ανθρώπου

11.4. Όργανα και Εξοπλισμός

1. Αυτόματες πιπέτες των 0,1-10 μL , 10-100 μL και 100-1000 μL
2. Πλαστικοί σωλήνες των 10 και 50 mL
3. Πλαστικά σιφόνια των 20 mL
4. Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
5. Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log (500 CA)
6. Θερμοστατούμετρο υδατόλουτρο στους 37 °C
7. Φυγόκεντρος

11.5. Παρασκευή διαλυμάτων

11.5.1. Διάλυμα φύλαξης βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL

Ποσότητα 100 mg BSA (Sigma) ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων. Φυλάσσεται στους -20 °C.

11.5.2. Διάλυμα φύλαξης βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL

Από 10 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL διαλύματος φύλαξης BSA.

11.5.3. Διάλυμα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $2,6 \times 10^4$ M, $2,6 \times 10^5$ M, $2,6 \times 10^6$ M και $2,6 \times 10^7$ M σε διάλυμα εργασίας BSA

Σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 1 mL από το διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 384 μL διαλύματος εργασίας BSA. Μετά από παραμονή 10 min από το διάλυμα αυτό συγκέντρωσης $2,6 \times 10^{-4}$ M, ετοιμάζονται σε πλαστικούς σωλήνες και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις με διάλυμα εργασίας BSA.

11.6. Πειραματική Πορεία

11.6.1. Απομόνωση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP)

1. Χρησιμοποιούνται σωλήνες πολυπροπυλενίου των 50 mL όπου προστίθεται 4 mL αντιπηκτικού AC.
2. Συλλέγεται το αίμα ανθρώπου από την μέση βασιλική ή λοξή φλέβα του βραχίονα έως τελικού όγκου 36 mL και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 500 g.
4. Τα 2/3 του υπερκείμενου που αποτελούν το πλάσμα το πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) αναρροφώνται με πλαστικό σιφόνιο των 20 mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 10 mL.
5. Το κατακείμενο φυγοκεντρείται για 20 min στα 1465 g. Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρησης αποτελεί το πλάσμα το φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma).
6. Ετοιμάζεται πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια που περιέχει $5,0 \times 10^6$ κύτταρα/mL, αραιώνοντας με PPP.

11.6.2. Συσσώρευση αιμοπεταλίων σε PRP

1. Σε υάλινες κυψελίδες συσσωματομέτρου των 0,5 mL προστίθενται 250 μ L από το PRP και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200 στροφές το λεπτό (rpm, rounds per min).
2. Ακολουθεί επώαση για 15 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C.
3. Έπειτα η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας.
4. Εντοπίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση και η ελάχιστη μη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων.
5. Προστίθενται ποσότητες εκχυλισμάτων τέτοιες ώστε να πετυχαίνεται συσσώρευση μεταξύ 50 και 80% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης αλλά και μεταξύ 20 και 50% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης.
6. Στις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που προκαλείται συσσώρευση από 20 έως 80% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης υπάρχει γραμμική απόκριση, οπότε υπολογίζεται το IA^{50} με το οποίο εκφράζονται τα αποτελέσματα.
7. Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων συγκέντρωσης $2,6 \times 10^{-7}$ M σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, το διάγραμμα της οποίας παρουσιάζεται παρακάτω.

12. Δοκιμασία Μικρο-εκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) για παραλαβή φλαβονοειδών

Η εκχύλιση έγινε με βάση το πρωτόκολλο των Natalia Campillo, Pilar Viñas, Gema Férrez-Melgarejo, Manuel Hernández-Córdoba για παραλαβή φλαβονοειδών από τα 3 δείγματα μελιού.

Στο πείραμα στην αρχή χρησιμοποιήθηκε ένα γραμμάριο για κάθε δείγμα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές ακόμα με διαφορετικές ποσότητες δείγματος.

Εκχειρίστηκαν τα φλαβονοειδή με την μέθοδο μικρο-εκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού. Με χρήση μικρής ποσότητας χλωροφορμίου και ακετονιτριλίου σε 3 δείγματα μελιού αραιωμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.01M, pH 3). Το εναιώρημα φυγοκεντρείται και παραλαμβάνεται η κάτω φάση στην οποία βρίσκεται το χλωροφόρμιο μαζί με τα φλαβονοειδή. Το χλωροφόρμιο απομακρύνεται με ρεύμα αερίου αζώτου και αναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο μεθανόλης.

Το πείραμα επαναλήφθηκε 4 φορές με τις εξής ποσότητες δείγματος και συνθήκες.

- 1g από 3 φορές το κάθε δείγμα
- 3g από κάθε δείγμα
- 5g από κάθε δείγμα
- 1g από ένα δείγμα χωρίς αναδιάλυση σε μεθανόλη

13. Αποτελέσματα και συζήτηση

13.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε στην μεθοδολογία. Ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος ήταν στο μέλι Λήμνου (δείγμα) 24.7 mL, στο δείγμα από τη Σκανδάλη 21.95mL και σε αυτό από το Γομάτι 22.4mL. Στον παρακάτω πίνακα(2) έχει υπολογιστεί τελικά πόσα μg μελιού περιέχονται σε 50μL δείγματος που παρασκευάστηκε. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται στις παρακάτω αναλύσεις.

Πίνακας 2: Αναλογία διαλυμάτων και ποσότητας μελιού

Στήλη1	Μέλι(mg)	Τελικός όγκος (μL)	Τελικά mg μελιού ανά 50 μL δείγματος
Λήμνος	7500	24730	15,2
Σκανδάλη	7500	21950	17,1
Γομάτι	7500	22400	16,7

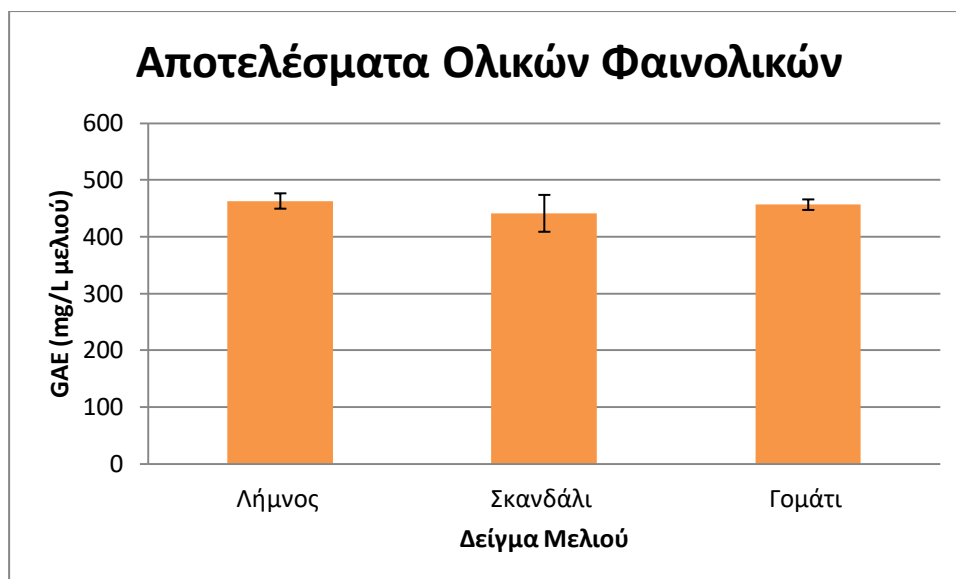
13.2. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για την ανάλυση αυτή έγιναν τριπλές μετρήσεις και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο μελιού.

Πίνακας (3): Αποτελέσματα Ολικών Φαινολικών

Δείγματα	Μέση τιμή Ολικών Φαινολικών (mg γαλλικού οξέως/ L μελιού)
Λήμνος	463±13,51
Σκανδάλη	441±32,48
Γομάτι	457±9,25

Τα αποτελέσματα επίσης παρουσιάζονται μαζί με τις τυπικές τους αποκλίσεις στο παρακάτω γράφημα.



Διάγραμμα 5: Δείγματα και αποτελέσματα ολικών φαινολικών

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των διαφορετικών δειγμάτων μελιού, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων μελιού. Εφόσον τα φυτά που συλλέγονται για την παραγωγή των συγκεκριμένων μελιών είναι από την ίδια ευρύτερη περιοχή (Λήμνος) είναι αρκετά λογικό να περιέχουν και παρόμοιες ποσότητες φαινολικών ουσιών.

13.3. Μέτρηση ολικών φλαβονοειδών

Μετά από 3 δοκιμές από τα δείγματα στην μέτρηση των φλαβονοειδών δεν ανιχνεύτηκαν φλαβονοειδή στα δείγματα. Η επεξεργασία που λογικά υπέστησαν τα δείγματα για την συσκευασία και την αποθήκευσή τους πρέπει να μείωσε κατά πολύ τις ποσότητες που υπήρχαν στο αρχικό μέλι και δεν μπόρεσαν να ανιχνευτούν.

13.4. Δοκιμασία της σταθερής ελεύθερης ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζόλιο (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH)

Τα αποτελέσματα από την μέτρηση εκφράζουν την ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH των δειγμάτων μελιού και εκφράζονται σε ισοδύναμα trolox. Ο όγκος δηλαδή

του δείγματος σε μL δείχνει τα ισοδύναμα trolox που χρειάζονται για το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH (SA_{50}).

Χρησιμοποιήθηκαν όγκοι δείγματος 100 και 300 μL για κάθε ένα από τα 3 δείγματα και το πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

- Δείγμα Σκανδάλη

Πίνακας 4: Αποτελέσματα δείγματος Σκανδάλη για DPPH

<u>Δείγματα</u>	<u>% Εκκαθάριση</u>	<u>μL διλύματος</u>	<u>Μέλι (mg)</u>	<u>μg ισοδύναμα trolox σε</u>
<u>$\Sigma 1$</u>	32,5175	100	34,2	3,47
<u>$\Sigma 1$</u>	70,2290	300	102,6	8,8
<u>$\Sigma 2$</u>	31,8182	100	34,2	3,34
<u>$\Sigma 2$</u>	70,0382	300	102,6	8,78
<u>$\Sigma 3$</u>	31,8182	100	34,2	3,34
<u>$\Sigma 3$</u>	67,5573	300	102,6	8,42

Βάσει των αποτελεσμάτων του πίνακα υπολογίστηκε η ποσότητα trolox που αντιστοιχεί στα μL του δείγματος μελιού που απαιτούνται για την 50% δέσμευση της ρίζας DPPH (SA_{50}).

Πίνακας 5: Τελικά Αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH δείγματος Σκανδάλη

<u>Δείγμα</u>	<u>mg μελιού SA_{50}</u>	<u>μg trolox SA_{50}</u>
<u>Σκανδάλη</u>	67,374	5,9367 \pm 0,0058

- Δείγμα Λήμνος

Πίνακας 6: Αποτελέσματα δείγματος Λήμνος για DPPH

<u>Δείγματα</u>	<u>% εκκαθάριση</u>	<u>μL διαλύματος</u>	<u>Μέλι (mg)</u>	<u>μg ισοδύναμα trolox</u>
<u>$\Lambda 1$</u>	23,0769	100	30,4	1,4539
<u>$\Lambda 1$</u>	42,1756	300	91,2	4,8148
<u>$\Lambda 2$</u>	24,1259	100	30,4	1,4539
<u>$\Lambda 2$</u>	42,3664	300	91,2	4,8419

Βάσει των αποτελεσμάτων του πίνακα υπολογίστηκε η ποσότητα trolox που αντιστοιχεί στα μL του δείγματος μελιού που απαιτούνται για την 50% δέσμευση της ρίζας DPPH (SA_{50}).

Πίνακας 7: Τελικά αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH για Λήμνος

<u>Δείγμα</u>	mg μελιού SA_{50}	μg trolox SA_{50}
<u>Λήμνος</u>	116,37	6,225 \pm 0,05

- Δείγμα Γομάτι

Πίνακας 8: Αποτελέσματα δείγματος Γομάτι για DPPH

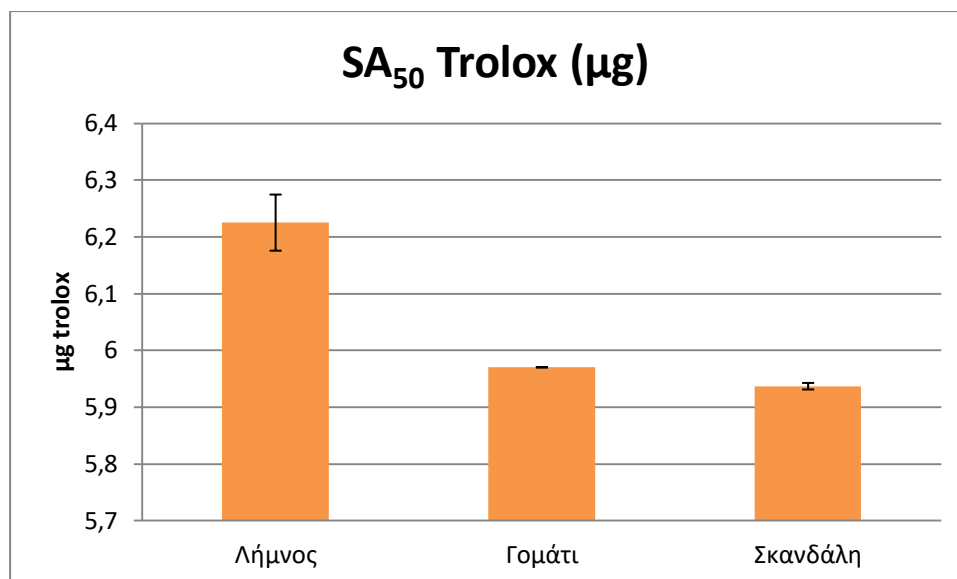
<u>Δείγματα</u>	% Εκκαθάριση	μL διαλύματος	Μέλι (mg)	μg ισοδυναμία trolox σε
<u>Γ1</u>	24,3007	100	33,4	2,3128
<u>Γ1</u>	48,6641	300	100,2	5,7759
<u>Γ2</u>	28,3217	100	33,4	2,8843
<u>Γ2</u>	48,2824	300	100,2	5,7217
<u>Γ3</u>	24,3007	100	33,4	2,3128
<u>Γ3</u>	46,9466	300	100,2	5,5318

Βάσει των αποτελεσμάτων του πίνακα υπολογίστηκε η ποσότητα trolox που αντιστοιχεί στα μL του δείγματος μελιού που απαιτούνται για την 50% δέσμευση της ρίζας DPPH (SA_{50}).

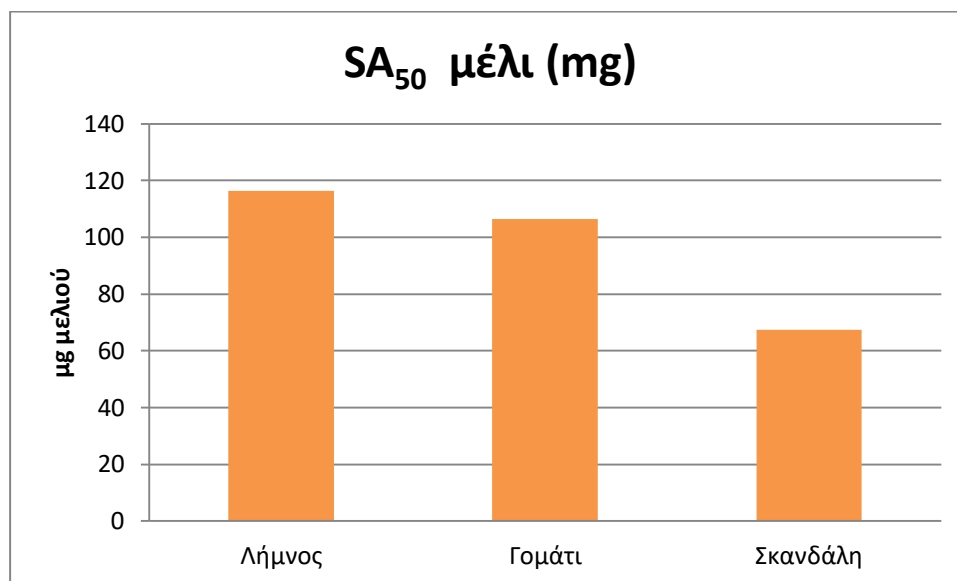
Πίνακας 9: Τελικά αποτελέσματα δοκιμασίας DPPH για δείγματα Γομάτι

<u>Δείγμα</u>	mg μελιού SA_{50}	μg trolox SA_{50}
<u>Γομάτι</u>	106,3456	5,97

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα



Διάγραμμα 6 : Αποτελέσματα DPPH - SA₅₀ μg Trolox



Διάγραμμα 7: Αποτελέσματα DPPH- SA₅₀ mg μελιού

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα βγαίνει το συμπέρασμα πως το δείγμα από την περιοχή Σκανδάλη έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση καθώς χρειάζεται μικρότερη ποσότητα δείγματος για την 50% δέσμευση της ρίζας DPPH. Ακολουθούν τα δείγματα από την περιοχή Γομάτι και το Λήμνος.

13.5. Προσδιορισμός της αντιαθηρογόνου δράσης των δειγμάτων μέσω αναστολής της in vitro οξειδωσης πλάσματος αίματος από ιόντα Cu^{2+}

Τα αποτελέσματα για την αξιολόγηση της in vitro αντιαθηρογόνου δράσης παρατίθενται παρακάτω:

Εκχύλιση μελιού

- Τα 100 μl εκχυλίσματος μελιού Λήμνος έδωσαν χρόνο λανθάνουσας φάσης ίσο με 73,17 min που ισοδυναμεί με 79,5% αύξηση ως προς τον χρόνο λανθάνουσας φάσης του δείγματος αναφοράς.
- Τα 100 μl εκχυλίσματος μελιού Σκανδάλη έδωσαν χρόνο λανθάνουσας φάσης ίσο με 70,17 min που ισοδυναμεί με 76,24% αύξηση ως προς τον χρόνο λανθάνουσας φάσης του δείγματος αναφοράς.
- Τα 100 μl εκχυλίσματος μελιού Γομάτι έδωσαν χρόνο λανθάνουσας φάσης ίσο με 63,7 min που ισοδυναμεί με 69,21% αύξηση ως προς τον χρόνο λανθάνουσας φάσης του δείγματος αναφοράς.

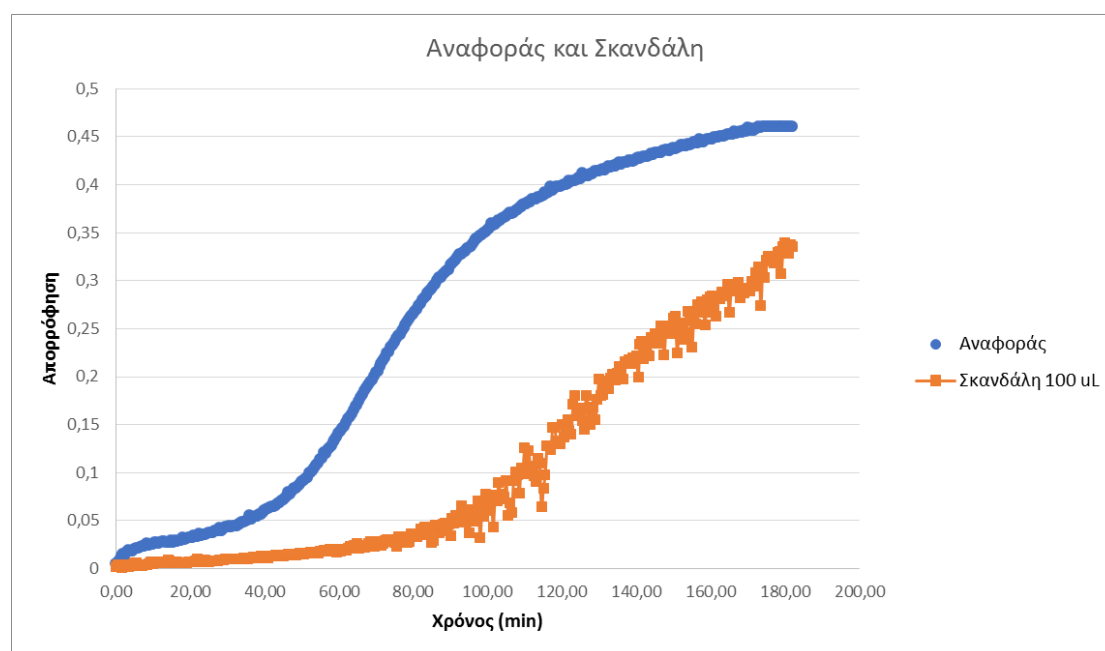
Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα δοκιμασίας αναστολής οξειδωσης του πλάσματος

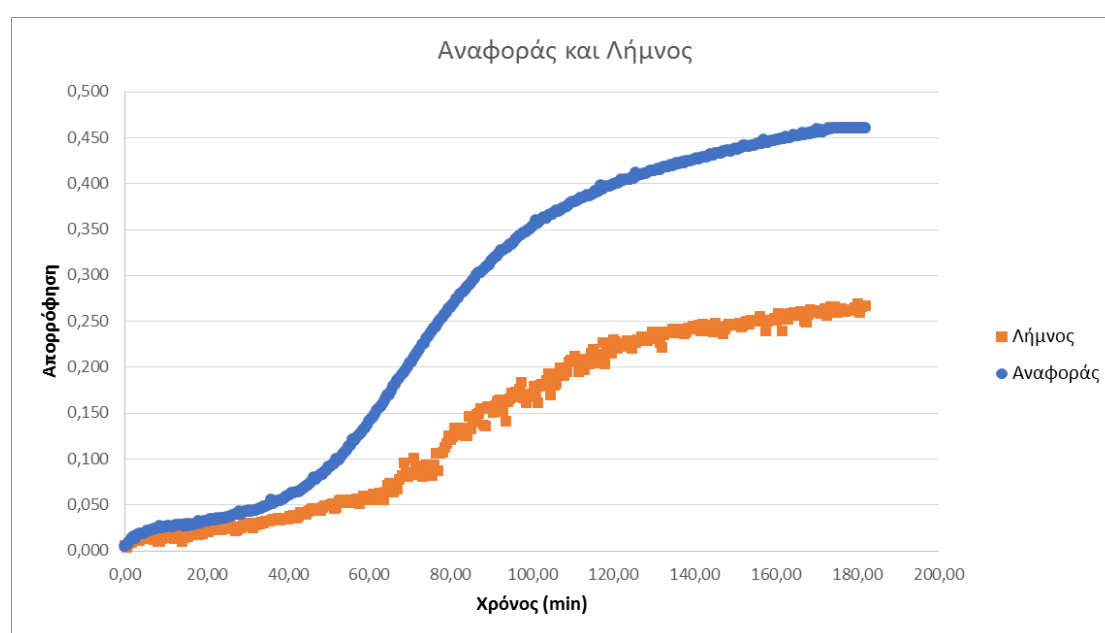
Δείγματα	Έκχυλισμα (μL)	Χρόνος λανθάνουσας φάσης (min)	Ποσοστό αύξησης χρόνου λανθάνουσας φάσης
Λήμνος	100	73,17	79,5
Σκανδάλη	100	70,17	76,24
Γομάτι	100	63,7	69,21

Στα τρία παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται όλα τα δείγματα που εμφάνισαν αύξηση του χρόνου λανθάνουσας φάσης, ως προς το δείγμα αναφοράς, ώστε να συγκριθούν οι καμπύλες οξείδωσης του πλάσματος.

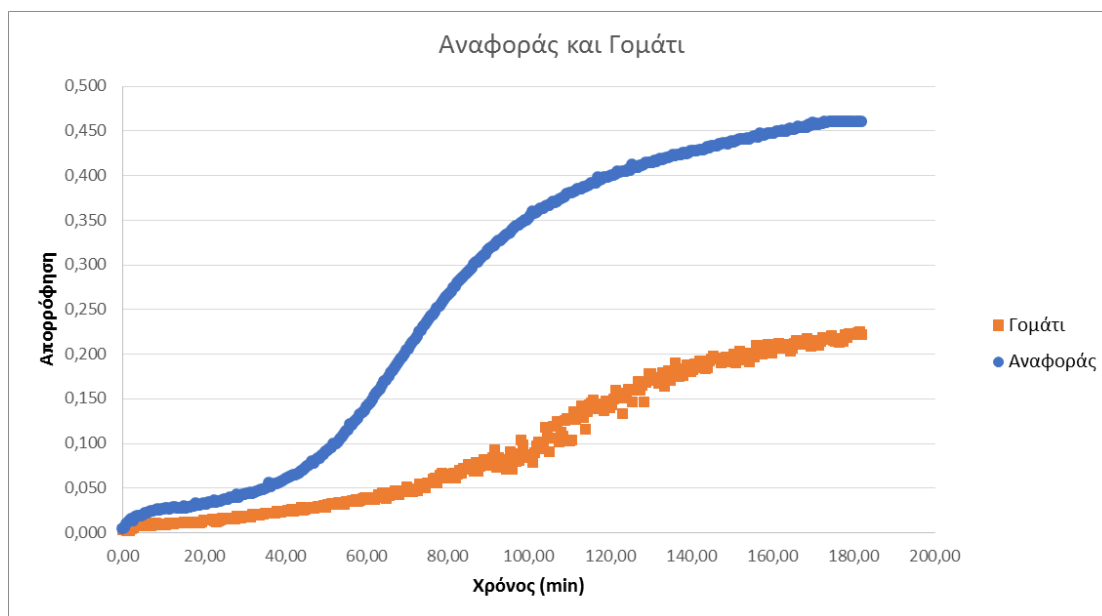
Διάγραμμα 8: Καμπύλη Οξείδωσης Πλάσματος (Δείγμα Αναφοράς – Δείγμα μελιού Σκανδάλη)



Διάγραμμα 9: Καμπύλη Οξείδωσης Πλάσματος (Δείγμα Αναφοράς – Δείγμα μελιού Λήμνος)



Διάγραμμα 10: Καμπύλη οξείδωσης πλάσματος (Δείγμα αναφοράς – Δείγμα μελιού Γομάτι)



Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Η αθηροσκλήρωση είναι μια ασθένεια, που προκαλείται από την οξείδωση των πρωτεϊνών του πλάσματος. Προκειμένου να επιβραδυνθεί η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών, και επομένως της αθηροσκλήρωσης, συμβάλλουν με θετικό ρόλο τα αντιοξειδωτικά. Ανάλογα με τον χρόνο που απαιτείται για την οξείδωσή τους, παρτηρείται και η αντιαθηρογόνο δράση τους. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος λανθάνουσας φάσης των δειγμάτων, σε σύγκριση με αυτόν του δείγματος αναφοράς, τόσο περισσότερο αυξημένη προστατευτική δράση παρουσιάζουν τα δείγματα ως προς την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Με επακόλουθο, να διαθέτουν και υψηλότερη αντιαθηρογόνο δράση.

Όλα τα δείγματα μελιού που μελετήθηκαν εμφάνισαν αύξηση του χρόνου λανθάνουσας φάσης, σε σύγκριση με τον αντίστοιχο του δείγματος αναφοράς. Το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης του χρόνου λανθάνουσας φάσης εμφάνισε το δείγμα από το εκχύλισμα μελιού Λήμνος, σε συγκέντρωση 100μL με 79,5%. Το δείγμα εκχυλίσματος μελιού Σκανδάλη, σε ίδια συγκέντρωση, εμφάνισε κάπως χαμηλότερο ποσοστό αύξησης στα 76,24%, ενώ το δείγμα από το εκχύλισμα μελιού Γομάτι, σε ίδια συγκέντρωση, εμφάνισε χαμηλότερο ποσοστό, της τάξης του 69,21% αύξησης

του χρόνου λανθάνουσας φάσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα δείγματα μελιού που μελετήθηκαν όσον αφορά την *in vitro* αντιθηρογόνο δράση τους.

13.6. Προσδιορισμός της αντιθρομβωτικής δράσης μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) σε Πλάσμα ανθρώπου Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP)

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) είναι λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών. Ο PAF είναι ένας πανίσχυρος ενεργοποιητής και μεσολαβητής πολλών λειτουργιών διαφόρων κυττάρων συμπεριλαμβανομένου και της θρόμβωσης των αιμοπεταλίων.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της αντιθρομβωτικής ικανότητας των δύο δειγμάτων, μέσω μέτρησης της αναστολής του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) σε Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα αναστολής του PAF σε PRP

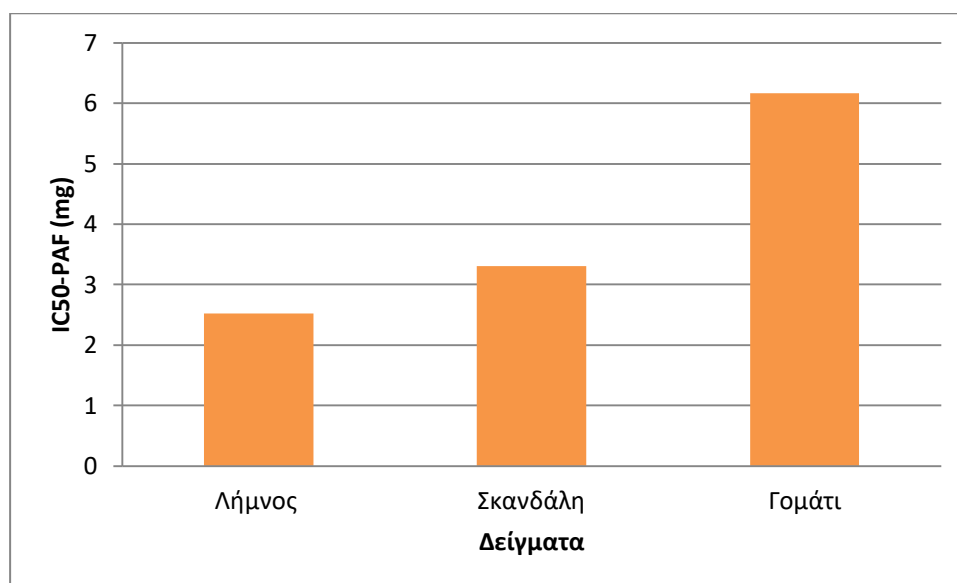
Δείγματα	Έκχυλισμα (μL)	% Αναστολή του PAF
Λήμνος	10	60,34
Σκανδάλη	8	41,38
Γομάτι	14	37,93

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η ποσότητα κάθε δείγματος μελιού που απαιτείται για την 50% αναστολή του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).

Πίνακας 12: Αποτελέσματα αναστολής του PAF σε PRP (IA50)

Δείγματα	μL εκχυλίσματος για 50 % αναστολή του PAF σε PRP (IC ₅₀)	Ισοδύναμα mg αρχικού δείγματος μελιού για 50 % αναστολή του PAF σε PRP (IC ₅₀)
Λήμνος	8,29	2,52
Σκανδάλη	9,67	3,31
Γομάτι	18,46	6,17

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της αντιθρομβωτικής ικανότητας των δειγμάτων, εκφρασμένα ως ισοδύναμα mg αρχικού δείγματος μελιού, παρουσιάζονται με την μορφή γραφήματος.



Διάγραμμα 11: Αποτελέσματα μέτρησης αντιθρομβωτικής δράσης

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Παρατηρώντας το διάγραμμα προκύπτει ότι από τα τρία δείγματα μελιού, το δείγμα μελιού της περιοχής Γομάτι εμφανίζει μικρότερα ποσοστά αντιθρομβωτικής δράσης, καθώς χρειάζεται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος (σχεδόν τη διπλάσια) προκειμένου να επιτελεσθεί αυτή του η δράση, σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα. Επίσης, παρατηρείται ότι τα άλλα δύο δείγματα παρουσιάζουν ίδιου επιπέδου αντιθρομβωτική δράση.

13.7.Δοκιμασία Μικρο-εκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού (Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) για παραλαβή φλαβονοειδών

Μετά από τις 4 επαναλήψεις της δοκιμασίας μικρο-εκχύλισης υγρού-υγρού δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα φλαβονοειδών στα δείγματα. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με το αποτέλεσμα την δοκιμασίας των ολικών φλαβονοειδών σε δείγματα μελιού κατάλληλα αραιωμένα σε νερό το οποίο επίσης δεν έδωσε κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Η αδυναμία ανίχνευσης φλαβονοειδών στα δείγματα που αναλύθηκαν μπορεί να οφείλεται στην επεξεργασία του και συγκεκριμένα στην θέρμανση που υπόκεινται τα δείγματα για να αποφευχθεί η κρυστάλλωση τους κατά την αποθήκευση.

Συμπεράσματα

Τα τρία δείγματα αναλύθηκαν ως προς κάποιες δράσεις τους και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- Αρχικά είχαν όλα τα δείγματα παρόμοιες ποσότητες φαινολικών ενώσεων.
- Τα δείγματα δεν περιέχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα φλαβονοειδών
- Ως προς την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης φάνηκε πως το δείγμα από την περιοχή Σκανδάλη παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και ακολουθούν τα δείγματα Γομάτι και Λήμνος.
- Ως προς την αναστολή οξείδωσης πλάσματος το περισσότερο δραστικό δείγμα φαίνεται να είναι το Λήμνος, με μικρή διαφορά όμως με τα άλλα δύο.
- Τέλος, το Λήμνος και το δείγμα από την περιοχή Σκανδάλη υπερτερούν ως προς την αντιθρομβωτική τους δράση έναντι του δείγματος από την περιοχή Γομάτι.

Τα δείγματα μελιού Λήμνου έδειξαν αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική και αντιαθηρογόνο δράση σε *in vitro* επίπεδο. Οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων δεν είναι σημαντικές με εξαίρεση αυτές που αφορούν στην αντιθρομβωτική δράση. Η μη ανίχνευση φλαβονοειδών στα δείγματα μελιού φανερώνει την ανάγκη για διερεύνηση καλύτερης μετασυλλεκτικής κατεργασίας προκειμένου να διατηρηθούν όσο το δυνατόν περισσότερα φλαβονοειδή.

Βιβλιογραφία

- A. N. Panche, A. D. Diwan and S. R. Chandra. «Flavonoids: an overview.» *Journal of Nutritional Science*, 2016.
- A.M. Aljadi, M.Y. Kamaruddin. «Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys.» *Food Chemistry*, 2004.
- CATHERINE A. RICE-EVANS, NICHOLAS J. MILLER, GEORGE PAGANGA. «STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS.» *Free Radical Biology & Medicine*, 1996.
- Daniele Del Rio, Ana Rodriguez-Mateos, Jeremy P.E. Spencer, Massimiliano Tognolini, Gina Borges, and Alan Crozier. «Dietary (Poly)phenolics in Human Health:Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases.» *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 2013.
- Danila Cianciosi, Tamara Yuliett Forbes-Hernández, Sadia Afrin, Massimiliano Gasparrini, Patricia Reboredo-Rodriguez , Piera Pia Manna , Jiaojiao Zhang, Leire Bravo Lamas, Susana Martínez Flórez, Pablo Agudo Toyos, José Luis Quiles, Francesca Giampie. «Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review.» *Molecules*, 2018.
- Fereidoon Shahidi, Priyatharini Ambigaipalan. «Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review.» *Journal of Functional Foods*, 2015.
- George J. Crystal, Sherif I. Assaad,Paul M. Heerdt. « Cardiovascular Physiology Integrative Function.» *Pharmacology and Physiology for Anesthesia*, 2019.
- Gülçin, İlhami. «Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight.» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010.
- Gulzar Ahmad Nayik, Vikas Nanda. «A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India.» *Food Science and Technology*, 2016.
- Haoan Zhao, Ni Cheng,Liangliang He,Guoxia Peng,Xiaofeng Xue,Liming Wu,Wei Cao. «Antioxidant and hepatoprotective effects of A. cerana honey against acute alcohol-induced liver damage in mice.» *Food Research International*, 2017.
- Ioana Ignat, Irina Volf, Valentin I.Popa. «A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.» *Food Chemistry*, 2011: 1821-1835.
- Ioana Ignat, Irina Volf, Valentin I.Popa. «A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.» *Food Chemistry*, 2011.

- Kelly E. Heim, Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya. «Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.» *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 2002: 572–584.
- Krystyna Pyrzynska, Magdalena Biesaga. «Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey.» *Trends in Analytical Chemistry*, 2009.
- Letícia Estevinho, Ana Paula Pereira, Leandro Moreira, Luís G. Dias, Ermelinda Pereira. «Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey.» *Food and Chemical Toxicology*, 2008.
- Marco Ciulu, Nadia Spano, Maria I. Pilo and Gavino Sanna. «Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys.» 2016.
- Md. Sakib Hossen, Md. Yousuf Ali, M.H.A. Jahurul, Mohamed M. Abdel-Daim, Siew Hua Gan, Md. Ibrahim Khalil. «Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review.» *Pharmacological Reports*, 2017.
- Mircea Oroian, Isabel Escriche. «Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis.» *Food Research International*, 2015.
- Munawar Abbas, Farhan Saeed, Faqir Muhammad Anjum, Muhammad Afzaal, Tabussam Tufail, Muhammad Shakeel Bashir, Adnan Ishtiaq, Shahzad Hussain & Hafiz Ansar Rasul Suleria. «Natural polyphenols: An overview.» *International Journal of Food Properties*, 2017.
- Natalia Campillo, Pilar Viñas, Gema Férrez-Melgarejo, Manuel Hernández-Córdoba. «Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry.» *Talanta* 131, 2015: 185-191.
- Pandey, Shashank Kumar and Abhay K. «Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview.» *The Scientific World Journal*, 2013.
- Pasupuleti Visweswara Rao, Kumara Thevan Krishnan, Naguib Sallehb, Siew Hua Ganc. «Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review.» 2016.
- Priscila Missio da Silva ↑, Cony Gauche, Luciano Valdemiro Gonzaga, Ana Carolina Oliveira Costa, Roseane Fett. «Honey: Chemical composition, stability and authenticity.» *Food Chemistry*, 2016.
- Rabia Shabir Ahmad, Muhammad Bilal Hussain, Farhan Saeed, Marwa Waheed & Tabussam Tuf. «Phytochemistry, metabolism, and ethnomedical scenario of honey: A concurrent review.» *International Journal of Food Properties*, 2017.
- Rabia Shabir Ahmad, Muhammad Bilal Hussain, Farhan Saeed, Marwa Waheed & Tabussam Tufail. «Phytochemistry, metabolism, and ethnomedical scenario of honey: A concurrent review.» *International Journal of Food Properties*, 2017.

Shi Shen, Jingbo Wang, Qin Zhuo, Xi Chen, Tingting Liu and Shuang-Qing Zhang. «Quantitative and Discriminative Evaluation of Contents of Phenolic and Flavonoid and Antioxidant Competence for Chinese Honeys from Different Botanical Origins.» *National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2018.*

Takeshi Nagai, Mizuho Sakai, Reiji Inoue, Hachiro Inoue, Nobutaka Suzuki. «Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis.» *Food Chemistry, 2001.*

Tsao, Rong. «Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols.» *Nutrients, 2010: 1231-1246.*