



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μέλι βελανιδιάς της περιφερειακής ενότητας Τρικάλων: α) Αεριοχρωματογραφική μελέτη πτητικού κλάσματος, β) Υγροχρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη μεθανολικού εκχυλίσματος, καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και της αντιμικροβιακής του δράσης

Βασιλική Ι. Γεωργαρίου

Επιβλέπων Καθηγητής:
Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2023**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μέλι βελανιδιάς της περιφερειακής ενότητας Τρικάλων: α) Αεριοχρωματογραφική μελέτη πτητικού κλάσματος, β) Υγροχρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη μεθανολικού εκχυλίσματος, καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και της αντιμικροβιακής του δράσης

Oak honey of the regional unit of Trikala: a) Gas chromatographic study of volatile fraction, b) Liquid chromatographic and spectroscopic study of methanolic extract, as well as assessment of its antioxidant and antimicrobial activity

Βασιλική Ι. Γεωργαρίου

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ελευθέριος Αλυσσανδράκης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΛΜΕΠΑ

Παντελής Νατσκούλης, Ερευνητής Γ' ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Μέλι βελανιδιάς της περιφερειακής ενότητας Τρικάλων: α) Αεριοχρωματογραφική μελέτη πτητικού κλάσματος, β) Υγροχρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη μεθανολικού εκχυλίσματος, καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και της αντιμικροβιακής του δράσης

ΠΜΣ: Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε η χημική σύσταση δείγματος ελληνικού μελιού βελανιδιάς, και εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα και η αντιμικροβιακή δράση του μεθανολικού εκχυλίσματός του.

Για τον σκοπό αυτόν, αφού παρελήφθη με την τεχνική SPME πτητικό κλάσμα του δείγματος μελιού, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την τεχνική GC-MS. Ανάμεσα στις πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, περιλαμβανόταν η 1-δεκανόλη σε υψηλότερη συγκέντρωση σχετικά με τις υπόλοιπες ενώσεις και πιθανολογείται πως θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως δείκτης ελληνικού μελιού βελανιδιάς. Επίσης, εντοπίστηκαν διάφορες ενώσεις που έχουν παρατηρηθεί σε μέλι βελανιδιάς, όπως οι 2-φαινυλοαιθανόλη, α-τερπινεόλη, βενζαλδεΐδη, φαινυλακεταλδεΐδη και δεκανάλη.

Χρησιμοποιώντας την τεχνική SPE εκχυλίστηκε το δείγμα μελιού με όξινο διάλυμα μεθανόλης. Για το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού, διενεργήθηκε, αρχικά, ανάλυση LC-QTOF-MS, ώστε να προσδιοριστεί το φαινολικό του προφίλ. Μεταξύ των φαινολικών συστατικών που ανιχνεύθηκαν με τη χρήση προτύπων ενώσεων, το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, μπορούν να χαρακτηριστούν ως εν δυνάμει δείκτες του μελιού βελανιδιάς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταυτοποίηση, χωρίς τη χρήση προτύπων ενώσεων, της ένωσης φραξετίνη, η οποία, όπως αναφέρεται σε άλλες μελέτες, έχει ανιχνευθεί σε πρόπολη και ξύλο βελανιδιάς.

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας ATR-FTIR κατέστη δυνατό να υλοποιηθεί απλός και γρήγορος προσδιορισμός τόσο των συστατικών του δείγματος μελιού, όσο και της συνολικής περιεκτικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις.

Το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού εξετάστηκε, ακόμα, ως προς την αντιοξειδωτική του ικανότητα με τις δοκιμές DPPH και ABTS, και ως προς την περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά με τη δοκιμή Folin-Ciocalteu. Από τις δοκιμές DPPH και ABTS προέκυψε ως αξιόλογη η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος, καθώς οι τιμές των IC_{50} του εκχυλίσματος υπολογίστηκαν 0,039 mL εκχυλίσματος /g μελιού και 0,010 mL εκχυλίσματος /g μελιού, για την κάθε δοκιμή αντίστοιχα. Με τη χρήση της δοκιμής Folin-Ciocalteu, εμφανίστηκε υψηλό το περιεχόμενο του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς σε φαινολικές ενώσεις (42,2 mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά 100 g μελιού).

Επιπλέον, αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών του μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς, όπου διαπιστώθηκε αναστολή ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram στελεχών βακτηρίων: *Escherichia coli* B16 και *Pseudomonas fluorescens* B29, καθώς και του θετικού κατά Gram *Staphylococcus aureus* B134.

Επιστημονική περιοχή: Αναλυτική Χημεία

Λέξεις κλειδιά: Μέλι, βελανιδιά, SPME, GC-MS, μεθανολικό εκχύλισμα, SPE, LC-QTOF-MS, φαινολικά, Folin-Ciocalteu, αντιοξειδωτική ικανότητα, DPPH, ABTS, ATR-FTIR, αντιμικροβιακή δράση

Oak honey of the regional unit of Trikala: a) Gas chromatographic study of volatile fraction, b) Liquid chromatographic and spectroscopic study of methanolic extract, as well as assessment of its antioxidant and antimicrobial activity

*MSc: Food Science & Technology
Department of Chemistry Food Science & Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry*

Abstract

In the present master's thesis, the chemical composition of a sample of Greek oak honey was studied, and its methanolic extract antioxidant capacity and antimicrobial activity were evaluate.

For this purpose, after the volatile fraction of the honey sample was obtained by the SPME technique, an analysis was carried out by using the GC–MS technique. Among the volatile compounds that were isolated and identified was 1-decanol in a relatively higher concentration than the rest of the compounds and it could be characterized as an indicator of Greek oak honey. Also, various compounds that have been observed in oak honey, such as 2-phenylethanol, α -terpineol, benzaldehyde, phenylacetaldehyde and decanal, were detected.

By using the SPE technique, the honey sample was extracted with an acidic methanol solution. LC–QTOF–MS analysis was performed on the methanolic extract of the honey sample to determine its phenolic profile. Among the phenolic components detected using standard compounds, protocatechuic acid, gallic acid and 4-hydroxybenzoic acid, can be characterized as potential indicators of oak honey. Noteworthy to mention is the identification, without the use of standard compounds, of the compound fraxetin, which, as reported in other studies, has been detected in propolis and oak wood.

By performing ATR–FTIR spectroscopy, it was feasible to implement a simple and rapid determination of both the components of the honey sample and the total content of the methanolic extract in phenolic compounds.

The methanolic extract of the honey sample was, also, examined for its antioxidant capacity with the DPPH and ABTS assays, and for its content in phenolic components with the Folin–Ciocalteu assay. The DPPH and ABTS assays, showed appreciable antioxidant capacity of the sample, as the IC₅₀ values of the extract were calculated as 0.039 mL extract/g honey and 0.010 mL extract/g honey, for each assay respectively. Using the Folin – Ciocalteu assay, the content of the methanolic extract of the oak honey sample appeared high in phenolic compounds (42.2 mg gallic acid equivalents per 100 g of honey).

In addition, the antimicrobial activity of the phenolics in oak's honey methanolic extract was evaluated. It was observed growth inhibition of the Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* B16 and *Pseudomonas fluorescens* B29, as well as the Gram-positive bacterium: *Staphylococcus aureus* B134.

Scientific field: Analytical Chemistry

Keywords: Honey, oak tree, SPME, GC–MS, methanolic extract, SPE, LC–QTOF–MS, phenolics, Folin–Ciocalteu, antioxidant capacity, DPPH, ABTS, ATR–FTIR, antimicrobial activity

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω, αρχικά, στον κ. Χρήστο Παππά, Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ανάθεση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, με θέμα που συγκαταλέγεται στα πλέον σύγχρονα και ενδιαφέροντα. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υποστηρικτική του διάθεση, την επιστημονική του καθοδήγηση και τις καίριες επισημάνσεις του σε όλη τη διάρκεια της επίβλεψης της μελέτης μου.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Ελευθέριο Αλυσσανδράκη, Επίκουρο Καθηγητή του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου αναγνωρίζοντας πως η ολοκλήρωση των φυσικοχημικών αναλύσεων δε θα ήταν εφικτή χωρίς τη συνεισφορά του.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον κ. Παντελή Νατσκούλη, Ερευνητή Γ' του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων στον Ελληνικό Γεωργικό Οργανισμό (ΕΛΓΟ) ΔΗΜΗΤΡΑ για την πολύτιμη καθοδήγησή του στην πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων. Το επιστημονικό του υπόβαθρο, η διαθεσιμότητα και οι συμβουλές του βοήθησαν ουσιαστικά στη βελτίωση της εργασίας.

Σημαντική ήταν η συμβολή της διδάκτορος και μεταδιδακτορικής ερευνήτριας κας Παναγιώτας Ρεβέλου, την οποία και ευχαριστώ για τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τον απεριόριστο σεβασμό μου στη διδάκτορα Λυδία Βαλάση. Την ευχαριστώ θερμά για την στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ακόμα, τους υποψήφιους διδάκτορες Ελευθέρια Καπαράκου και Μαρίνο Ξαγοράρη για την καθοδήγηση και την άμεση ανταπόκριση στις ανάγκες που παρουσιάζονταν.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους συνοδοιπόρους και πολύτιμους συνεργάτες μου σε αυτό το ταξίδι, τον μεταπτυχιακό φοιτητή Βασίλη Λαζαρίνη, τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Γεωργία Κορδατζάκη και Καλλιόπη Τζανή, καθώς και την προπτυχιακή φοιτήτρια

Χαρά Βάτσα. Η θετική τους διάθεση και η ουσιαστική υποστήριξή τους συνετέλεσαν στο να ξεπεραστούν οι δυσκολίες που εμφανίζονταν.

Ευχαριστώ συνολικά τους Καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της Κατεύθυνσης «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων» για την υποστήριξη και τα γνωστικά εφόδια που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου. Ιδιαίτερώς, νιώθω βαθιά ευγνωμοσύνη για τον Καθηγητή Συστημάτων Διασφάλισης και Υγιεινής Τροφίμων κ. Δροσινό Ελευθέριο που με την υπομονή και το ενδιαφέρον του με ενθάρρυνε, να διεκδικώ τις φιλοδοξίες μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στους δικούς μου ανθρώπους για την αγάπη και την ανεκτίμητη υποστήριξή τους.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract	3
Ευχαριστίες	4
Περιεχόμενα	6
Κατάλογος πινάκων	8
Κατάλογος εικόνων	9
Κατάλογος σχημάτων	11
Εισαγωγή	12
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος	14
Α.1. Μέλι	14
Α.1.1. Διάκριση και τύποι μελιών	14
Α.1.2. Χημική σύσταση μελιού	15
Α.1.3. Περιεκτικότητα μελιού σε φαινολικά συστατικά	17
Α.1.4. Συμβολή στην ανθρώπινη υγεία	18
Α.1.5. Στατιστικά στοιχεία	19
Α.1.6. Μέλι βελανιδιάς	20
Α.1.6.1. Βελανιδιά	21
Α.2. Αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (MS).....	23
Α.3. Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FTIR, spectroscopy).....	24
Α.3.1. Τεχνική της αποσβένουσας ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR).....	25
Α.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη δοκιμή Folin – Ciocalteu.....	25
Α.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας	26
Α.6. Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QTOF-MS)	26
Α.7. Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης	27
Σκοπός.....	28
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος.....	29
Β.1. Δείγμα μελιού.....	29
Β.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δείγματος μελιού βελανιδιάς.....	30
Β.3. Παραλαβή πτητικών συστατικών μελιού βελανιδιάς με την τεχνική SPME και ανάλυση με GC - MS	32
Β.3.1. Πειραματική πορεία	32
Β.3.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	34
Β.3.3. Συμπεράσματα.....	38
Β.4. Φασματοσκοπική μελέτη μελιού βελανιδιάς με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR	39
Β.4.1. Πειραματική πορεία	39
Β.4.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	39
Β.4.3. Συμπεράσματα.....	42
Β.5. Ανάλυση φαινολικών συστατικών μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς	43
Β.5.1. Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).....	43

B.5.2. Χρωματογραφική μελέτη φαινολικών ενώσεων δείγματος μελιού βελανιδιάς με LC – QTOF – MS	45
B.5.2.1. Πειραματική πορεία	45
B.5.2.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	46
B.5.2.3. Συμπεράσματα.....	51
B.5.3. Φασματοσκοπική μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος μελιού βελανιδιάς με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR	52
B.5.3.1. Πειραματική πορεία	52
B.5.3.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	52
B.5.3.3. Συμπεράσματα.....	55
B.5.4. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά με τη δοκιμή Folin – Ciocalteu	56
B.5.4.1. Πειραματική πορεία	56
B.5.4.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	58
B.5.4.3. Συμπεράσματα.....	59
B.5.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας δείγματος μελιού βελανιδιάς με εφαρμογή των δοκιμών DPPH και ABTS	60
B.5.5.1. Δοκιμή DPPH.....	60
B.5.5.2. Δοκιμή ABTS.....	61
B.5.5.3. Αποτελέσματα – Συζήτηση	63
B.5.5.4. Συμπεράσματα.....	65
B.5.6. Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης δείγματος μελιού βελανιδιάς με εφαρμογή της Μεθόδου των Ζωνών Αναστολής.....	66
B.5.6.1. Πειραματική πορεία	66
B.5.6.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση	69
B.5.6.3. Συμπεράσματα.....	73
B.6. Γενικά Συμπεράσματα	74
B.7. Ερευνητικές προτάσεις.....	77
Βιβλιογραφία	78
Διεθνής.....	78
Ελληνική.....	93
Παράρτημα.....	94

Κατάλογος πινάκων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος		
A.1.1.1	Χαρακτηριστικά σύστασης μελιού και ανώτατα όρια όπως ορίζονται από τον Codex Alimentarius και την Ευρωπαϊκή Οδηγία	17
A.1.2.1	Μέση σύσταση μελιού (g/100 g)	18
A.1.3.1	Συνήθη φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή σε μέλια	19
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος		
B.2.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δείγματος μελιού βελανιδιάς	32
B.3.2.1	Πτητικές ενώσεις δείγματος μελιού βελανιδιάς που απομονώθηκαν	37
B.4.2.1	Οι βασικές κορυφές του φάσματος ATR – FTIR δείγματος μελιού βελανιδιάς	43
B.5.2.1.1	Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης	47
B.5.2.1.2	Συνθήκες λειτουργίας του οργάνου	48
B.5.2.2.1	Φαινολικά συστατικά του δείγματος μελιού βελανιδιάς που ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση προτύπων ενώσεων	49
B.5.2.2.2	Φαινολικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς που ανιχνεύθηκαν χωρίς τη χρήση προτύπων ενώσεων	52
B.5.3.2.1	Οι βασικές κορυφές του φάσματος ATR – FTIR του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς	56
B.5.5.1.1	Περιεκτικότητες διαλυμάτων που προέκυψαν από αραίωση του δείγματος (mL δείγματος/mL διαλύματος)	62
B.5.5.2.1	Περιεκτικότητες διαλυμάτων που προέκυψαν από αραίωση του δείγματος (mL δείγματος/mL διαλύματος)	64
B.5.6.1.1	Θερμοκρασία και χρόνος επώασης των επιλεγμένων μικροοργανισμών	69
B.5.6.1.2	Καταμέτρηση θετικών κατά Gram μικροοργανισμών	70
B.5.6.1.3	Καταμέτρηση αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών	70
B.5.6.2.1	Ζώνες αναστολής (σε mm) (n=6)	72

Κατάλογος εικόνων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος		
A.1.3.1	Βασικές δομές φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων	20
A.1.6.1	Μέλι βελανιδιάς	23
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος		
B.1.1	Δείγμα μελιού που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη	31
B.3.1.1	Εκχύλιση με την τεχνική SPME	35
B.3.1.2	Σύστημα GC – MS	36
B.5.1.1	Τεχνική SPE παραλαβής μεθανολικού εκχυλίσματος από μέλι βελανιδιάς. Α. Όργανα και αντιδραστήρια (αριστερά). Β. Προσθήκη δείγματος στο στηλάκι (δεξιά)	46
B.5.4.1.1	Αραιωμένο διάλυμα μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος (περιεκτικότητα 0,05 mL /mL) έπειτα της προσθήκης των αντιδραστηρίων της δοκιμής Folin – Ciocalteu και παραμονή σε σκοτεινό μέρος, σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα	59
B.5.5.1.1	Ενδεικτικά διαλύματα που προέκυψαν από αραιώση του δείγματος με περιεκτικότητες 0,125 mL /mL (δεξιά) και 0,75 mL /mL (αριστερά) έπειτα από αντίδραση με τη ρίζα DPPH σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα	63
B.5.6.1.1	Τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA)	69
B.5.6.1.2	Καταμέτρηση αποικιών του μικροοργανισμού <i>Staphylococcus aureus</i> B134 (αραιώσεις από αριστερά προς τα δεξιά: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6})	70
B.5.6.2.1	Απουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα με το στέλεχος <i>Bacillus subtilis</i> B109 τρυβλία και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά)	73
B.5.6.2.2	Παρουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα τρυβλία με αραιό (άνω σειρά) και πυκνό (κάτω σειρά) εμβόλιο του στελέχους <i>Escherichia coli</i> B16 και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά)	74

B.5.6.2.3	Παρουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα τρυβλία με αραιό (άνω σειρά) και πυκνό (κάτω σειρά) εμβόλιο του στελέχους <i>Pseudomonas fluorescens</i> B29 και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά)	74
B.5.6.2.4	Παρουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα τρυβλία με αραιό (άνω σειρά) και πυκνό (κάτω σειρά) εμβόλιο του στελέχους <i>Staphylococcus aureus</i> B134 και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά).	75

Κατάλογος σχημάτων

Αριθμός	Περιεχόμενα	Σελίδα
Μέρος Β: Πειραματικό μέρος		
B.3.2.1	Χρωματογράφημα δείγματος μελιού βελανιδιάς	40
B.4.2.1	Φάσμα ATR–FTIR δείγματος μελιού βελανιδιάς	42
B.5.2.2.1	Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς	49
B.5.3.2.1	Φάσμα ATR – FTIR μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς	55
B.5.4.1.1	Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος	60
B.5.5.3.1	Ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας DPPH από το μεθανολικό εκχύλισμα δείγματος μελιού βελανιδιάς	66
B.5.5.3.2	Ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας ABTS από το μεθανολικό εκχύλισμα δείγματος μελιού βελανιδιάς	66

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, το εμπορικό ενδιαφέρον για τα μέλια μελιτώματος ολοένα αυξάνεται, καθώς θεωρείται πως εμφανίζουν υψηλότερες θεραπευτικές ιδιότητες από αυτές των ανθόμελων. Επιπλέον, εκτιμάται ιδιαίτερα η έντονη γεύση αυτού του είδους μελιού από τους καταναλωτές (Nešović et al., 2020). Ως εκ τούτου, η διάκριση μεταξύ μελιού μελιτωμάτων και μελιού ανθέων έχει μεγάλο ενδιαφέρον για την αποφυγή νοθειών.

Τα μέλια μελιτώματος διαφόρων βοτανικών και γεωγραφικών προελεύσεων έχουν χαρακτηριστεί με βάση τις φυσικοχημικές τους παραμέτρους και τη χημική τους σύσταση. Ωστόσο, η εύρεση αξιόπιστων χημικών δεικτών για τη βοτανική προέλευση είναι δύσκολη, αφού η χημική σύσταση του μελιού εξαρτάται, όχι μόνο από το είδος του φυτού που παράγει μελίτωμα ή νέκταρ, αλλά και από άλλους παράγοντες, όπως τη γεωγραφική περιοχή, την εποχή συλλογής, τις καιρικές συνθήκες, τον χρόνο ωρίμανσης του μελιού, τον τρόπο αποθήκευσης, τις συνθήκες και την τεχνολογία συγκομιδής (Kaškonienė & Venskutonis, 2010). Επιπλέον, τα μέλια ίδιας βοτανικής προέλευσης μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικό αποτέλεσμα σχετικά με τη χημική τους σύσταση ανάλογα με την αναλυτική τεχνική και τη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος που χρησιμοποιείται (Pita-Calvo & Vázquez, 2018).

Για τον εντοπισμό πιθανών ενώσεων – δεικτών σε διάφορους τύπους μελιού έχουν πραγματοποιηθεί χρωματογραφικές αναλύσεις σε αρκετές μελέτες διεθνώς, καθώς η χρήση συγκεκριμένων δεικτών για την πιστοποίηση της προέλευσης των μελιών μελιτωμάτων κρίνεται ως ακριβέστερη. Ωστόσο, δεν έχουν δημοσιευθεί επαρκή δεδομένα για τα πτητικά συστατικά που υπάρχουν σε μέλια μελιτωμάτων, όπως το μέλι βελανιδιάς και ιδίως για αυτό που συλλέγεται στον ελλαδικό χώρο. Επίσης, ενώσεις – δείκτες αναζητούνται και μεταξύ των φαινολικών ενώσεων των μελιών, εντούτοις εντοπίζεται έλλειψη σε επιστημονικές έρευνες για το φαινολικό περιεχόμενο του μελιού βελανιδιάς, κυρίως του εγχώριου. Διαπιστώνοντας το κενό αυτό στην έρευνα, διενεργήθηκε η παρούσα μελέτη που αφορά σε ελληνικό μέλι βελανιδιάς.

Μέσω της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μαζών (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC – MS) υποστηρίζεται πως καθίσταται δυνατή, με μεγάλη πιστότητα, η ανίχνευση πτητικών ενώσεων οι οποίες είναι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Moniruzzaman et al., 2014). Για τον λόγο αυτόν, προτείνεται η χρήση της σε δείγματα μελιού προκειμένου να προσδιοριστούν πτητικά συστατικά που μπορούν να

αποτελέσουν εν δυνάμει ενώσεις – δείκτες (Cuevas-Glory, Pino, Santiago, & Sauri-Duch, 2007), ενώ για τον προσδιορισμό του φαινολικού προφίλ, ανάμεσα στις μεθόδους που προτείνονται ανήκει η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτή χρόνου πτήσης (Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, LC – QTOF – MS), καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα (Himmelsbach, 2012). Υπό αυτό το πρίσμα, πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικές αναλύσεις συνδυαστικά με φασματομετρία μάζας (GC – MS και LC – QTOF – MS) στο υπό μελέτη δείγμα μελιού βελανιδιάς.

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης μιας απλής και ταχείας τεχνικής για τον καθορισμό των βασικών συστατικών των μελιών, ώστε να πραγματοποιηθεί έλεγχος της ποιότητάς τους, έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική FTIR σε αρκετές μελέτες (Anjos, Campos, Ruiz, & Antunes, 2014· Xagoraris et al., 2021). Ωστόσο, εκλείπουν δεδομένα σχετικά με το μέλι βελανιδιάς, διεθνώς. Έτσι, η μελέτη αυτή έχει ως στόχο να προσθέσει στοιχεία προσδιορίζοντας τα συστατικά δείγματος μελιού βελανιδιάς προερχόμενου από τον ελλαδικό χώρο. Επιπλέον, κρίνεται σημαντική μια πρώτη προσέγγιση, μέσω της φασματοσκοπίας FTIR, του συνολικού περιεχομένου του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος σε φαινολικά συστατικά, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί αντίστοιχη αξιολόγηση σε προηγούμενη μελέτη.

Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του μελιού, όπως επισημαίνεται από πολλούς μελετητές, συσχετίζεται με την περιεκτικότητά του σε ολικές φαινολικές ουσίες, οι οποίες καθορίζονται από τη βοτανική προέλευση (Vasić et al., 2018). Εντοπίζοντας την έλλειψη ερευνών αναφορικά με το μεθανολικό εκχύλισμα μελιού βελανιδιάς, πραγματοποιήθηκε ένας συνδυασμός δοκιμών εκτίμησης αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH, ABTS). Παράλληλα, για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, επιλέχτηκε, για το παρόν πείραμα, η δοκιμή Folin – Ciocalteu, καθώς η χρήση της έχει προταθεί λόγω της απλότητας και της ευαισθησίας της (Bertoncelj, Dobersek, Jamnik, & Golob, 2007).

Οι μελέτες που υπάρχουν για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος είναι ελάχιστες και δεν αφορούν σε μέλι βελανιδιάς. Εκτιμώντας τη χρησιμότητα να ερευνηθεί η ιδιότητα αυτή για τον συγκεκριμένο τύπο μελιού, στο παρόν πείραμα, εξετάστηκε η επίδραση στους μικροοργανισμούς *Staphylococcus aureus* B134, *Bacillus subtilis* B109, *Escherichia coli* B16 και *Pseudomonas fluorescens* B29, που απαντώνται συχνά σε τρόφιμα (Montville & Matthews, 2022).

Μέρος Α: Θεωρητικό μέρος

A.1. Μέλι

«Το μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγεται από μέλισσες, συλλέγοντας νέκταρ των φυτών ή εκκρίσεις από μέρη ζωντανών φυτών ή εκκρίσεις εντόμων (μελιτώματα), μεταποιώντας και εμπλουτίζοντας το υλικό αυτό με δικές τους ουσίες και αποθηκεύοντάς το στην κυψέλη, ώστε να επιτευχθεί η ωρίμανσή του» (Codex Alimentarius, 2001). Η Ευρωπαϊκή Οδηγία 2001/110/EK (Council of the European Union, 2002), ωστόσο, ορίζει το μέλι ως «τη φυσική γλυκιά ουσία που παράγεται από μέλισσες του είδους *Apis mellifera*», δηλαδή το διαφοροποιεί από μέλια που παράγονται από άλλα είδη μελισσών. Οι χώρες στις οποίες το μέλι παράγεται από άλλα είδη μελισσών, αναφέρεται πως θα πρέπει να υιοθετήσουν πρόσθετες διατάξεις σχετικά με τον ορισμό, καθώς υπάρχουν διαφορές στις φυσικοχημικές, μικροσκοπικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του μελιού που παράγεται από αυτά τα διαφορετικά είδη μελισσών (Souza et al., 2006). Μέχρι στιγμής, στην επιστήμη των τροφίμων, δεν υπάρχει επίσημη ονομασία για το μέλι που παράγεται από άλλες μέλισσες.

Ένα φυσικό προϊόν με ποικιλομορφία στη σύστασή του αποτελεί το μέλι, καθώς επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων, όπως τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση, τις κλιματικές συνθήκες, τους μελισσοκομικούς χειρισμούς, τη συσκευασία, το χρονικό διάστημα και τις συνθήκες αποθήκευσης. Η νομοθεσία δεν μπορεί πάντα να ακολουθεί την πολυπλοκότητα των παραλλαγών του μελιού και, επομένως, υπάρχουν περιπτώσεις όπου αυθεντικά, μη επεξεργασμένα μέλια δε συμμορφώνονται με τα κριτήρια των κανόνων, όπως επίσης και περιπτώσεις νοθευμένων μελιών με παραμέτρους εντός των θεσπισμένων κριτηρίων (Thrasynvoulou et al., 2017).

A.1.1. Διάκριση και τύποι μελιών

Το μέλι μπορεί να διακριθεί βάσει της προέλευσής του σε δύο κατηγορίες, σε μέλι ανθέων και μέλι μελιτώματος. Τα ανθόμελα και τα μέλια μελιτώματος παράγονται από τις μέλισσες από νέκταρ και μελιτώματα, αντίστοιχα. Τα μελιτώματα αποτελούν εκκρίσεις που

παράγονται από ορισμένα φυτά, όπως πεύκο, έλατο, βελανιδιά και άλλα, ή εκκρίσεις μυζητικών εντόμων στα ζωντανά μέρη των φυτών (Pita-Calvo & Vázquez, 2016). Η μεγάλη παραλλακτικότητα στη σύνθεση και στις οργανοληπτικές ιδιότητες μεταξύ δειγμάτων από την ίδια πηγή, καθώς και η συχνή εμφάνιση μελιών που προκύπτουν από μείγμα μελιού ανθέων και μελιτώματος, δυσχεραίνουν τη διαφοροποίηση (Soria, González, de Lorenzo, Martínez-Castro, & Sanz, 2004).

Στον Πίνακα Α.1.1.1 παρατίθενται τα κριτήρια και τα ανώτατα όρια της κάθε παραμέτρου σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (2001) και την Ευρωπαϊκή Οδηγία (Council of the European Union, 2002) για το μέλι. Σημειώνεται πως τα όρια διαφέρουν για το μέλι ζαχαροπλαστικής και υφίστανται ορισμένες εξαιρέσεις για κάποια είδη μελιού ανάλογα με τη χώρα.

Πίνακας Α.1.1.1. Χαρακτηριστικά σύστασης μελιού και ανώτατα όρια όπως ορίζονται από τον Codex Alimentarius και την Ευρωπαϊκή Οδηγία.

Χαρακτηριστικά σύστασης μελιού	Μέλι ανθέων	Μέλι μελιτώματος*
Υγρασία (%)	<20	<20
Φρουκτόζη + Γλυκόζη (%)	>60	>45
Σακχαρόζη	<5	<5
Μη υδατοδιαλυτές ουσίες (%)	<0,1	<0,1
Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm)	<0,8	>0,8
Ελεύθερη οξύτητα (meq/Kg)	<50	<50
Δείκτης διαστάσης DN**	>8	>8
HMF (mg/Kg)**	<40	<40

*Μέλι μελιτώματος και μείγμα μελιών μελιτώματος και ανθέων.

**Προσδιορισμός μετά την επεξεργασία και την ανάμειξη.

A.1.2. Χημική σύσταση μελιού

Η σύσταση των διαφόρων μελιών ποικίλει διότι εξαρτάται κυρίως από τη βοτανική τους προέλευση (Persano Oddo & Piro, 2004). Σημαντικό ρόλο παίζουν και ορισμένοι εξωτερικοί παράγοντες, όπως η εποχή του έτους που πραγματοποιήθηκε ο τρύγος του μελιού, αλλά και η περιοχή προέλευσης (Χαριζάνης, 2017). Η μέση σύσταση του μελιού παρουσιάζεται στον Πίνακα

A.1.2.1 Το μέλι είναι ένα υπερκορεσμένο διάλυμα σακχάρων, που αποτελείται κυρίως από φρουκτόζη και γλυκόζη. Σημειώνεται ότι οι υδατάνθρακες, που αποτελούν το κύριο συστατικό του μελιού, αναλογούν περίπου στο 95% του ξηρού βάρους του (Bogdanov, Jurendic, Sieber, & Gallmann, 2008). Περιέχει, επιπλέον, μέταλλα (κάλιο, νάτριο, ασβέστιο κ.λπ.), μικρές ποσότητες βιταμινών, πρωτεΐνες, ελεύθερα αμινοξέα και ένζυμα. Τα κυριότερα ένζυμα στο μέλι είναι η ιμπερτάση, που διασπά τη σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, η διαστάση (αμυλάση), που διασπά το άμυλο, και η οξειδάση της γλυκόζης, με την οποία παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου και γλυκονικό οξύ από τη γλυκόζη (Alvarez-Suarez, Tulipani, Romandini, Bertoli, & Battino, 2010).

Πίνακας A.1.2.1. Μέση σύσταση μελιού (g/100 g) (White, 1992).

Συστατικό	Μέσος όρος	Διακύμανση
Υγρασία	17,2%	12,2 – 22,9%
Φρουκτόζη	38,4%	30,9 – 44,3%
Γλυκόζη	30,3%	22,9 – 40,7%
Σακχαρόζη	1,3%	0,2 – 7,6%
Ανάγοντες δισακχαρίτες (υπολογισμένοι ως μαλτόζη)	7,3%	2,7 – 16,0%
Ανώτερα σάκχαρα (πολυσακχαρίτες)	1,4%	0,1 – 3,8%
Ελεύθερα οξέα	0,43%	0,13 – 0,92%
Λακτόνη	0,14%	0,0 – 0,37%
Συνολικά οξέα	0,57%	0,17 – 1,17%
Τέφρα	0,169%	0,02 – 1,028%
Άζωτο	0,041%	0,00 – 0,133%
pH	3,91%	3,42 – 6,10%

Η ποιότητα του μελιού μπορεί να υποστεί αλλαγές με την αποθήκευση για μεγάλο χρονικό διάστημα και την παρατεταμένη θέρμανση, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (HMF) (Mouhoubi-Tafinine, Ouchemoukh, Bachir bey, Louaileche, & Tamendjari, 2018). Η HMF είναι ένωση που σχηματίζεται ως ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης Maillard, από την αφυδάτωση των σακχάρων υπό όξινες συνθήκες

(καραμελοποίηση) (Pasias, Kiriakou, & Proestos, 2017). Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (2001) και την Οδηγία 2001/L10 σχετικά με το μέλι της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το ανώτατο νομικό όριο HMF είναι 40 mg/kg (Council of the European Union, 2002).

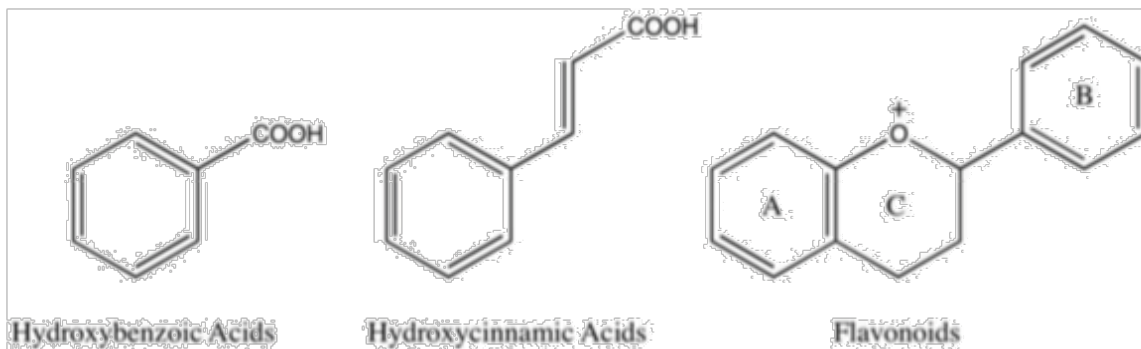
A.1.3. Περιεκτικότητα μελιού σε φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Αυτές οι ενώσεις, οι οποίες μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε υποομάδες, όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, είναι διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο και συνδέονται στενά με τη θρεπτική αξία των φρέσκων και επεξεργασμένων φυτικών τροφίμων. Στη μεγάλη υποκατηγορία των φλαβονοειδών υπάγονται οι φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες, χαλκόνες και ισοφλαβόνες. Τα φαινολικά οξέα, που έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα δείγματα μελιού σε όλο τον κόσμο, διακρίνονται σε υδροξυβενζοϊκά οξέα (όπως γαλλικό, ελλαγικό, πρωτοκατεχικό οξύ) και υδροξυκινναμικά οξέα (όπως χλωρογενικό, καφεϊκό, κουμαρικό, φερούλικό οξύ) (Lowag, Lim, Joshi, Hammer, & Locher, 2022). Η φαινολική σύσταση του μελιού εξαρτάται κυρίως από την ανθική του προέλευση. Στην πραγματικότητα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο ταξινόμησης και πιστοποίησης, ειδικά στην περίπτωση μονοανθικών ποικιλιών. Οι πιο κοινές φαινολικές ενώσεις στο μέλι φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας A.1.3.1).

Πίνακας A.1.3.1. Συνήθη φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή σε μέλια.

Φλαβονοειδή	Φαινολικά οξέα
Απιγενίνη	2 – <i>cis</i> , 4 – <i>trans</i> -αμπισισικό οξύ
Κατεχίνη	2 – υδροξυκινναμικό οξύ
Χρυσίνη	Καφεϊκό οξύ
Γαλανγίνη	Χλωρογενικό οξύ
Γενιστεΐνη	Κινναμικό οξύ
Ισοραμνετίνη	Ελλαγικό οξύ
Καμφερόλη	Φερούλικό οξύ
Λουτεολίνη	Γαλλικό οξύ
Μυρικετίνη	π – κουμαρικό οξύ
Πινομπασκίνη	π – υδροξυβενζοϊκό οξύ
Πινοσεμπρίνη	Πρωτοκατεχικό οξύ
Κερκετίνη	Σιναπικό οξύ
Ρουτίνη	Συριγγικό οξύ
	Βανιλικό οξύ

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριες υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική δράση του μελιού, αφού λειτουργούν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και παρεμποδίζουν, με αυτόν τον τρόπο, την οξείδωση άλλων σημαντικών μορίων. Αναλυτικότερα, οι φαινολικές ενώσεις δίνοντας ένα πρωτόνιο σε ελεύθερη ρίζα, την καθιστούν αδρανή, και δίνουν άλλες, μη δραστικές ρίζες που σταθεροποιούνται μέσω δομών συντονισμού (Cianciosi et al., 2018).



Εικόνα Α.1.3.1. Βασικές δομές φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων.

A.1.4. Συμβολή στην ανθρώπινη υγεία

Πολυάριθμες έρευνες αναφέρονται στα οφέλη του μελιού στην υγεία του ανθρώπου. Είναι γνωστό πως το μέλι αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για τον οργανισμό. Θεωρείται δυναμωτικό μείγμα, που μπορεί να συμβάλλει στην άμεση πρόσληψη ενέργειας και τη βελτίωση των επιδόσεων των αθλητών σε σωματική άσκηση, αλλά και να μειώσει σημαντικά τον χρόνο αποκατάστασης του σώματος, συντελώντας στη θεραπεία τραυματισμένων ιστών (Iia, Simulescu, Merghes, & Varan, 2020). Επίσης, η καθημερινή, έμμετρη κατανάλωση μελιού, δύναται να συνεισφέρει στη μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης, της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και των επιπέδων ολικής χοληστερόλης, αυξάνοντας παράλληλα τα επίπεδα χοληστερόλης λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας ή αλλιώς «καλής» χοληστερόλης (HDL) (Iia et al., 2020).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το μέλι έχει αντιφλεγμονώδη δράση, αφού συμβάλλει στη μείωση της δραστηριότητας της κυκλοοξυγενάσης – 1 και της κυκλοοξυγενάσης – 2, ενώ δεν συνοδεύεται από ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως σχηματισμό γαστρεντερικών ελκών. Αντίθετα,

χρησιμοποιείται για τη θεραπεία και την προστασία από γαστρεντερικές λοιμώξεις (Arawwawala & Hewageegana, 2017).

Το μέλι, όπως αποδεικνύεται από πληθώρα μελετών, προσφέρει ισχυρά αντιοξειδωτικά οφέλη, που σχετίζονται με την περιεκτικότητά του σε φαινολικές ενώσεις. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί πως τα σκουρόχρωμα μέλια έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά και, κατά συνέπεια, υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση (Cianciosi et al., 2018). Σημειώνεται πως τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες καθιστώντας τις ανενεργές. Με άλλα λόγια, εξουδετερώνουν ή μειώνουν την ικανότητα των ελεύθερων ριζών να βλάπτουν τα κύτταρα και τα βιομόρια, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Επομένως, το μέλι χρησιμεύει στην αναστολή του οξειδωτικού στρες και στη διαχείριση χρόνιων ασθενειών που συνήθως σχετίζονται με αυτό (Terzo, Mulè, & Amato, 2020). Για παράδειγμα, συντελεί στη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων, για την εμφάνιση των οποίων αποτελεί παράγοντα κινδύνου η παραγωγή ελευθέρων ριζών στο σώμα (Arawwawala & Hewageegana, 2017).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει προξενήσει και η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του μελιού. Όπως αναφέρεται, παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι περίπου 60 ειδών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων αερόβιων και αναερόβιων, θετικών και αρνητικών κατά Gram, όπως επίσης, και έναντι ορισμένων ζυμών. Έχει, επιπλέον, παρατηρηθεί η αντιμυκητιακή δράση του σε είδη των γενών *Aspergillus* και *Penicillium*, καθώς και σε όλα τα κοινά δερματόφυτα. Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού έχει αναφερθεί ότι οφείλεται στην ωσμωτικότητα, την οξύτητα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και φυτοχημικούς παράγοντες (Aurongzeb & Kamran Azim, 2011).

A.1.5. Στατιστικά στοιχεία

Η σημασία του μελιού και άλλων μελισσοκομικών προϊόντων στη διατροφή και υγεία του ανθρώπου έχει καθορίσει τη συνεχή αύξηση της κατανάλωσής τους. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα τελευταία χρόνια, καταναλώνονται κατά μέσο όρο, κατά κεφαλήν, 250 - 300 g ανά έτος (Root, 2019).

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία που έχουν δημοσιευτεί το 2020 η παγκόσμια παραγωγή μελιού ξεπέρασε τους 1,66 εκατομμύρια τόνους, σημειώνοντας συνεχή αύξηση, με το

μεγαλύτερο ποσοστό (27%) να προέρχεται από την Κίνα, και την Ευρωπαϊκή Ένωση να διατηρεί τη δεύτερη θέση (13%) (European Commission, 2022). Ωστόσο, η εγχώρια αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κατέχοντας τη θέση του κορυφαίου καταναλωτή μελιού, συγκεκριμένα αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 20% της συνολικής παγκόσμιας κατανάλωσης το 2019, παρουσίαζε αυτάρκεια μόνο κατά το 60% (Popescu, Dinu, Stoian, & Serban, 2021).

Στον Ευρωπαϊκό χάρτη, σημειώνεται πως η Ελλάδα ανήκει στους πέντε μεγαλύτερους παραγωγούς μελιού, επιτυγχάνοντας το 2019 να παράγει 22,84 χιλιάδες τόνους (Popescu et al., 2021). Επίσης, συγκαταλέγεται στις χώρες με τον μεγαλύτερο αριθμό κυψελών ανά μελισσοκόμο, με την κατάταξη το 2018, να είναι η εξής: Ελλάδα (147), Ισπανία (103) και Ρουμανία (80), ενώ ο αντίστοιχος μέσος όρος στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπολογιζόταν πολύ χαμηλότερος (29,7) (European Commission, 2021).

Οι επιδόσεις στην παραγωγή μελιού διαφέρουν από χώρα σε χώρα, καθώς αποτελεί συνάρτηση πολλών παραγόντων μεταξύ των οποίων οι σημαντικότεροι είναι: η γεωγραφική θέση, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, η άγρια χλωρίδα, η δομή των γεωργικών καλλιεργειών και οπωροφόρων δέντρων, και η παράδοση στη μελισσοκομία.

Στην Ελλάδα, που διαθέτει ποιοτικό πλεονέκτημα έναντι άλλων Ευρωπαίων παραγωγών, καθώς περίπου το 90% του μελιού της προέρχεται από ακαλλιέργητους βιοτόπους, μη επιβαρυσμένους από γεωργικά λιπάσματα και φυτοφάρμακα, θεωρείται πως υπάρχουν πολλά περιθώρια για αύξηση των εξαγωγών (Hope, 2022). Συνάμα, πλεονέκτημα εμφανίζει το ελληνικό μέλι, καθώς παρασκευάζεται από μια μεγάλη ποικιλία πηγών: αγριολούλουδα, οπωροφόρα δέντρα, θάμνοι, αρωματικά φυτά (όπως θυμάρι και φασκόμηλο), πεύκα, έλατα, βελανιδιές, καστανιές και άλλα.

A.1.6. Μέλι βελανιδιάς

Οι μελιτώδεις εκκρίσεις που συλλέγονται και αξιοποιούνται από τις μέλισσες παράγονται από πολλά κωνοφόρα δέντρα, όπως τα είδη του γένους *Quercus*, και τους ξενιστές τους (Karabagias, Karabournioti, Karabagias, & Badeka, 2020). Το μέλι βελανιδιάς είναι το αποτέλεσμα της συλλογής σακχαρωδών ουσιών που διαρρέουν τη βελανιδιά υπό διάφορες συνθήκες (πίεσης, υγρασίας και θερμοκρασίας) ή από πεπτικά υποπροϊόντα διαφόρων μυζητικών εντόμων που βρίσκονται σε φύλλα βελανιδιάς (Can et al., 2015). Διακρίνεται για την παχύρρευστη

υφή και, όπως διαφαίνεται στην Εικόνα Α.1.6.1, για το σκούρο κεχριμπαρένιο χρώμα του (Seijo, Escuredo, & Rodríguez-Flores, 2019).



Εικόνα Α.1.6.1. Μέλι βελανιδιάς.

Α.1.6.1. Βελανιδιά

Τα δέντρα του γένους *Quercus*, τα οποία είναι αειθαλή ή φυλλοβόλα, ανήκουν στην οικογένεια Fagaceae. Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 450 είδη και είναι ευρέως διαδεδομένο στην Ευρώπη, την Ασία, τη Βόρεια Αφρική, τη Βόρεια, Κεντρική και Νότια Αμερική, καθώς αναπτύσσεται σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Burlacu, Nisca, & Tanase, 2020). Συναντάται κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο, σε εύκρατα, ξηρά δάση, και τείνει να διανέμεται σε καλά στραγγιζόμενες ορεινές περιοχές, αν και ορισμένα είδη είναι σε θέση να αναπτύσσονται και σε υγρά εδάφη (*Q. lyrata* και *Q. laurifolia*). Τα πιο κοινά φυλλοβόλα πλατύφυλλα είναι τα *Q. ilex*, *Q. dentata*, *Q. acutissima*, *Q. variabilis*, *Q. acuta*, *Q. glauca*, *Q. serrata* και *Q. salicina*. Στην Ελλάδα, μάλιστα, όπου συναντώνται 11 διαφορετικά είδη *Quercus*, φυλλοβόλα και αειθαλή, υπολογίζεται πως αποτελούν περίπου το 23% των συνολικών δασικών περιοχών (Bantis, Radoglou, & Brüggemann, 2018). Στα είδη που έχουν καταγραφεί στα ελληνικά δάση, συμπεριλαμβάνονται τα *Quercus ilex*, *Q. macrolepis*, *Q. pedunculiflora*, *Q. pubescens*,

Q. trojana (Radoglou, 1996), *Q. frainetto*, *Q. cerris*, *Q. petraea* (Pantera, Papadopoulos, & Papanastasis, 2018), *Q. euboica* (Kartsonas & Papafotiou, 2007).

Λόγω της παγκόσμιας διάδοσης του γένους, πολλά είδη χρησιμοποιούνταν για αιώνες σε παραδοσιακές θεραπευτικές μεθόδους ή και στη διαδικασία ωρίμανσης του κρασιού. Το ξύλο βελανιδιάς κατέχει ιδιαίτερο ρόλο στην ποτοποιία (ωρίμανση του κρασιού σε δρύινα βαρέλια), αλλά και στη βιομηχανία ξύλου λόγω του χρώματός του και της ανθεκτικότητάς του.

Είναι σημαντικό να τονισθεί πως έχουν επιβεβαιωθεί από μελετητές οι αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές δράσεις, που παρέχονται από τη φυτοχημική σύσταση των ειδών του γένους *Quercus*. Θεωρείται πως οι κύριες βιοδραστικές φυτοχημικές ουσίες που έχουν βρεθεί είναι οι φαινολικές ενώσεις. Άλλες ενώσεις που έχουν αναφερθεί είναι οι βιταμίνες (ιδιαίτερα η βιταμίνη E), οι στερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες και τα λιπαρά οξέα (Burlacu et al., 2020).

Η διερεύνηση των φαινολικών ενώσεων των ειδών *Quercus* δείχνει την παρουσία τους σε όλα τα μέρη (φύλλα, φλοιός και βελανίδι). Ο καρπός (βελανίδι) που παράγουν, συνδυαστικά με τον φλοιό και τα φύλλα, έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική, ως αντισηπτικό ή σε γαστρεντερικές διαταραχές. Παραδοσιακά, τα βελανίδια χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές, ωστόσο η θρεπτική αξία και η υψηλή περιεκτικότητα σε φυτοχημικές ενώσεις με βιολογική δραστηριότητα οδήγησαν στη χρήση των βελανιδιών στη διατροφή του ανθρώπου (Vinha, Barreira, Ferreira, & Oliveira, 2019).

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις που προσδιορίζονται στα εκχυλίσματα βελανιδιών είναι τα φαινολικά οξέα (γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ), τα φλαβονοειδή (κερκετίνη, κατεχίνη, ναρινγίνη) και οι ταννίνες. Επίσης, αναφέρεται ότι τα βελανίδια έχουν σημαντική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, αμινοξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και διάφορες στερόλες (Lopes & Bernardo-Gil, 2005). Τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα που περιέχουν είναι το παλμιτικό, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βελανίδια μπορεί επίσης να περιέχουν βιταμίνες (βιταμίνη E και προβιταμίνη A) (Vinha, Barreira, Costa, & Oliveira, 2016). Οι τερπενοειδείς μεταβολίτες εμπλέκονται στην ανάπτυξη των φυτών, αλλά κυρίως είναι σημαντικοί σε πιο εξειδικευμένες χημικές αλληλεπιδράσεις, όπως και την προστασία στο αβιοτικό και βιοτικό περιβάλλον (Tholl, 2015).

Στα εκχυλίσματα του φλοιού βελανιδιάς οι κύριες φαινολικές ενώσεις που αναγνωρίζονται είναι τα φαινολικά οξέα (π.χ. καφεϊκό οξύ, ελλαγικό οξύ, γαλλικό οξύ και

πρωτοκατεχικό οξύ), ταννίνες και φλαβονοειδή. Παράλληλα, στα φύλλα του είδους *Quercus*, οι κύριες φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται είναι τα φαινολικά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γεντισικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ, καφεϊκό οξύ, π-κουμαρικό οξύ και φερουλικό οξύ), φλαβονοειδή (π.χ. ρουτίνη, κερκετίνη, επικατεχίνη, ναριγγενίνη, εσπερετίνη, φορμονονετίνη, ναρινγίνη, καμφερόλη) και ταννίνες.

A.2. Αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (MS)

Τα πτητικά κλάσματα δειγμάτων μελιού έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες ποιότητας για την αυθεντικότητα της βοτανικής προέλευσης (Bianchi, Careri & Musci, 2005· Guyot, Scheirman, & Collin, 1999). Παράλληλα, συντελούν στην αποτροπή προσπάθειας αναντιστοιχίας αναγραφόμενης και πραγματικής σύστασης του προϊόντος, με στόχο την υπερίμισή του (Bianchi et al., 2005). Ωστόσο, η ποσοτική ανάλυση των παρατηρούμενων πτητικών ενώσεων σε δείγματα μελιού θεωρείται ιδιαίτερος απαιτητική, λόγω της πολύπλοκης χημικής σύστασης του πτητικού κλάσματος. Ορισμένες από τις πτητικές ουσίες που υπάρχουν στο μέλι έχουν περιγραφεί ως χαρακτηριστικές της βοτανικής προέλευσής του, ενώ άλλες ενώσεις, όπως κάποιες αλκοόλες, διακλαδισμένες αλδεΐδες και παράγωγα φουρφουράλης, ενδέχεται να σχετίζονται με τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης του μελιού (Pérez, Sánchez-Brunete, Calvo, & Tadeo, 2002).

Η τεχνική ανάλυσης GC – MS είναι ένας συνδυασμός δύο αναλυτικών τεχνικών: αέριας χρωματογραφίας (GC), που διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος, και φασματομετρίας μαζών (MS), που παρέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για τον δομικό προσδιορισμό κάθε συστατικού (Mădaş et al., 2019). Προτείνεται ως μια κατάλληλη τεχνική προκειμένου να προσδιοριστούν πτητικές ενώσεις με υψηλή ακρίβεια (Soria, Martínez-Castro, & Sanz, 2009· Moniruzzaman et al., 2014). Δεδομένου ότι στο μέλι υπάρχουν πτητικές ενώσεις σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, θεωρείται πως το GC-MS αποτελεί μια χρήσιμη τεχνική ανάλυση, διότι συνδυάζει συγχρόνως υψηλή ικανότητα διαχωρισμού και ευαισθησία (Cuevas-Glory et al., 2007).

Για την παραλαβή του πτητικού κλάσματος γίνεται χρήση διαφόρων τεχνικών, από τις οποίες η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME) έχει αναφερθεί ως προτιμότερη (Moniruzzaman et al., 2014). Η τεχνική SPME παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλες παραδοσιακές τεχνικές. Σε αυτά συγκαταλέγεται η δυνατότητα ποσοτικοποίησης ικανού αριθμού μορίων και αποφυγής της χρήσης τοξικών

διαλυτών. Παράλληλα, διευκολύνει την ανάλυση, καθώς αξιολογείται ως αρκετά απλή, επιλεκτική, με μικρότερες απαιτήσεις σε χρονική διάρκεια, ελαχιστοποιώντας ή εξαλείφοντας τις διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος (Pontes, Marques, & Câmara, 2007).

A.3. Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FTIR, spectroscopy)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier (FTIR) έχει χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα αποτελεσματική τεχνική στον έλεγχο της ποιότητας τροφίμων, καθώς διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα. Ανάμεσα στις δυνατότητές της συμπεριλαμβάνονται η ελάχιστη απαιτούμενη προετοιμασία του δείγματος, ο ταχύς προσδιορισμός διαφορετικών χαρακτηριστικών του και το μειωμένο κόστος που προσφέρει για τη διαδικασία της ανάλυσης. Παράλληλα, η αυξημένη χρήση της φασματοσκοπίας FTIR αποδίδεται στην αυξανόμενη ζήτηση των τελευταίων ετών για την πραγματοποίηση αναλύσεων υψηλής ακρίβειας, αλλά και την απαίτηση για χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (Valand, Tanna, Lawson, & Bengtström, 2019). Θεωρείται ικανοποιητική τεχνική για την αξιολόγηση διαφορετικών συστατικών τροφίμων και προτείνεται να συνδυάζεται με χημειομετρικά εργαλεία (Anjos et al., 2014). Στα δείγματα τροφίμων, για τα οποία αναφέρεται ως αποδεδειγμένα κατάλληλη η εφαρμογή της, συγκαταλέγονται το μέλι (Xagoraris et al., 2021), το ελαιόλαδο (Georgouli, Martinez Del Rincon, & Koidis, 2017), το κρασί (Cozzolino, Holdstock, Damberg, Cynkar, & Smith, 2009), οι ξηροί καρποί (Valasi, Kokotou, & Pappas, 2021), αλλά και τα βότανα (Black, Haughey, Chevallier, Galvin-King, & Elliott, 2016; Petrakis & Polissiou, 2017). Μέσω των υπέρυθρων φασμάτων, που λαμβάνονται με τη χρήση φασματοσκοπίας FTIR, παρέχονται πληροφορίες αναφορικά με τις λειτουργικές ομάδες ενώσεων σε σύνθετες μήτρες τροφίμων (Valasi & Pappas, 2021).

A.3.1. Τεχνική της αποσβένουσας ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

Η χρήση της τεχνικής αποσβένουσας ανάκλασης (ATR) ανήκει στις πλέον διαδεδομένες, καθώς επιτρέπει την καταγραφή φασμάτων στερεών, υγρών, ημιστερεών και λεπτών μεμβρανών (Rodriguez-Saona & Allendorf, 2011). Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται η απλούστευση της διαδικασίας καταγραφής φασμάτων και η δυνατότητα λήψης αυτών με μεγάλη επαναληψιμότητα, καθώς και η ελαχιστοποίηση προετοιμασίας δειγμάτων (Anguebes et al., 2016).

Η λειτουργία της τεχνικής βασίζεται στην ολική εσωτερική ανάκλαση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, όταν αυτή εισάγεται από ένα μέσο μεγάλου δείκτη διάθλασης (κρύσταλλος ή πρίσμα) σε μέσο με μικρότερο δείκτη διάθλασης (δείγμα). Η ανάκλαση μπορεί να είναι μία όταν χρησιμοποιείται πρίσμα ή πολλές διαδοχικές αν χρησιμοποιείται κρύσταλλος. Η διεπαφή των δύο μέσων (δείγμα και κρύσταλλος) με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης προκαλεί ένα φθίνον κύμα που διεισδύει στο δείγμα. Η αλληλεπίδραση αυτή του δείγματος με το φθίνον κύμα συνεπάγεται την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από το δείγμα, η οποία και μετράται (Urbaniak-Domagala, 2012).

A.4. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη δοκιμή Folin – Ciocalteu

Η δοκιμή Folin – Ciocalteu, θεωρείται ταχεία και δημοφιλής, για τον υπολογισμό της συνολικής περιεκτικότητας φαινολών σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Μάλιστα, η χρήση του αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu σε αλκαλικές συνθήκες χαρακτηρίζεται ως μέθοδος ποσοτικοποίησης φαινολών με αυξημένη ευαισθησία και επαναληψιμότητα (Platzer, Kiese, Herfellner, Schweiggert-Weisz, & Eisner, 2021). Κατά την διαδικασία της δοκιμής αυτής, το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu, που αποτελεί μείγμα φωσφοβολφραμικού οξέος ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφομολυβδικού οξέος ($H_3PMo_{12}O_{40}$), αντιδρά με φαινόλες. Από την οξειδοαναγωγική αντίδραση αυτήν εμφανίζεται κυανός χρωματισμός, ανάλογος με τη συγκέντρωση των φαινολών (Lamuela-Raventós, 2017).

A.5. Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτική ικανότητα στα τρόφιμα αναφέρεται ως η ικανότητα μορίων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες ή οξειδωτικές ενώσεις παρεμποδίζοντας τη δράση τους (Choe & Min, 2009).

Οι φασματοφωτομετρικές δοκιμές ABTS (2, 2' – azino – bis – 3 – ethylbenzthiazoline – 6 – sulphonic acid) και DPPH (1, 1 – diphenyl – 2 – picrylhydrazyl), ανήκουν σε αυτές που έχουν υιοθετηθεί ευρέως και βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, παρατηρώντας τη μείωση του χρώματος του οξειδωτικού. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η δοκιμή ABTS, δημιουργείται ένα διάλυμα $ABTS^{\cdot+}$ γαλαζοπράσινου χρώματος, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί και σε υδρόφιλες, αλλά και σε λιπόφιλες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών η ένταση του χρώματος του διαλύματος $ABTS^{\cdot+}$ μειώνεται (Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011). Επίσης, όπως αναφέρεται η δοκιμή DPPH βασίζεται στον αποχρωματισμό του ιώδους διαλύματος $DPPH^{\cdot}$ παρουσία υδρόφοβων αντιοξειδωτικών ενώσεων (Kim, Lee, Lee, & Lee, 2002).

A.6. Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-QTOF-MS)

Ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων στις μελέτες αυθεντικότητας του μελιού μπορεί να έχει διττό ρόλο. Συγκεκριμένα, οι φαινολικές ενώσεις δύναται να αξιοποιηθούν, βάσει μελετών, τόσο ως χαρακτηριστικές ενώσεις – δείκτες μονοποικιλιακών μελιών, όσο και για την αξιολόγηση της θρεπτικής αξίας των μελιών λόγω της βιοδραστικότητας (Habib, Kheadr, & Ibrahim, 2021). Όπως υποστηρίζεται, το φαινολικό προφίλ των τροφίμων, μπορεί να προσδιοριστεί με υψηλή ακρίβεια με χρήση της υγρής χρωματογραφίας συνδυασμένης με τετραπολικό αναλυτή χρόνου πτήσης φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer, LC-QTOF-MS) (Hong, Wang, Barrow, Dunshea, & Suleria, 2021). Η υγρή χρωματογραφία συνδυαστικά με τη φασματομετρία μαζών παρέχει υψηλότερο επίπεδο ευαισθησίας και εκλεκτικότητας, σε πολλές περιπτώσεις, σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές. Μέσω της τεχνικής αυτής, δίδεται η δυνατότητα προσδιορισμού πολλαπλών αναλυτών ταυτόχρονα, ενώ άλλες τεχνικές περιορίζονται στον προσδιορισμό μιας αναλυόμενης ουσίας τη φορά (Himmelsbach, 2012). Παράλληλα, θεωρείται πως ο αναλυτής Q-

TOF παρέχει γρήγορη ανάλυση με υψηλή διαχωριστική ικανότητα, ευαισθησία και εκλεκτικότητα (Revelou, Xagoraris, Alissandrakis, Pappas, & Tarantilis, 2022). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες, το QTOF-MS πλεονεκτεί σημαντικά, καθώς δεν περιορίζεται αποκλειστικά στα γνωστά πρότυπα ουσιών, αλλά παρέχει ανίχνευση του συνόλου των ενώσεων που εξάγονται από το μέλι. Έτσι, κορυφές και εκτός των προτύπων ουσιών, που μπορεί να είναι χαρακτηριστικές για ορισμένα είδη μελιού, δύναται να αναγνωριστούν πιο εύκολα και να εντοπιστούν ταχύτερα. Δεδομένου ότι το φασματόμετρο μάζας υψηλής ανάλυσης καθορίζει πάντα ακριβείς σχετικές μοριακές μάζες, το λογισμικό μπορεί να προτείνει έναν κατάλληλο μοριακό τύπο (Trautvetter, Koelling-Speer, & Speer, 2009). Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παραμέτρους, διαφαίνεται πως η διαδικασία αναζήτησης μιας μοριακής δομής, διευκολύνεται σημαντικά μέσω του LC-QTOF-MS.

A.7. Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης

Η αντιμικροβιακή δράση του μελιού έχει συνδεθεί παραδοσιακά με την υψηλή ωσμωτικότητα, την οξύτητα του μητρικού υλικού (Bose, 1982) και άλλα δευτερεύοντα συστατικά, κυρίως υπεροξείδιο του υδρογόνου, φαινολικές ενώσεις και παράγωγά τους (Russell et al., 1990). Οι φαινολικές ενώσεις, ιδιαίτερα τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, θεωρούνται τα πιο σημαντικά συστατικά του μελιού (Prasain, Wang, & Barnes, 2004). Η συγκέντρωση των συστατικών αυτών καθορίζει το χρώμα του μελιού. Είναι υπεύθυνα για αισθητηριακά χαρακτηριστικά που αντικατοπτρίζουν την ποιότητα του μελιού και τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά του (Alvarez-Suarez et al., 2010· Sergiel, Pohl, & Biesaga, 2014). Σύμφωνα με τη μελέτη των Estevinho, Pereira, Moreira, Dias και Pereira (2008), τα εκχυλίσματα φαινολικών ουσιών που λαμβάνονται από δείγματα σκουρόχρωμων μελιών έχουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση συγκριτικά με δείγματα διαυγών μελιών.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη της χημικής σύστασης του δείγματος μελιού βελανιδιάς, προκειμένου να εμπλουτιστεί η βιβλιογραφία με περισσότερα δεδομένα. Επιπλέον, εστιάζοντας στο μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος, διενεργήθηκε ανίχνευση των φαινολικών του συστατικών, προσδιορισμός της περιεκτικότητάς του σε φαινολικές ενώσεις, καθώς και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και της αντιμικροβιακής δράσης του.

Για την επίτευξη του σκοπού:

- Προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του.
- Παραλήφθηκε το πτητικό κλάσμα του δείγματος με την τεχνική SPME και μελετήθηκε με την τεχνική GC –MS.
- Πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση του δείγματος μελιού χρησιμοποιώντας υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier (FTIR).
- Παραλήφθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα από το μέλι βελανιδιάς με την τεχνική SPE, ώστε να πραγματοποιηθεί:
 - i. Χρωματογραφική ανάλυση με χρήση της τεχνικής LC – QTOF – MS.
 - ii. Φασματοσκοπική ανάλυση με χρήση της τεχνικής FTIR.
 - iii. Μελέτη της περιεκτικότητάς του σε φαινολικά με τη δοκιμή Folin – Ciocalteu και της αντιοξειδωτικής του ικανότητας με τις δοκιμές DPPH και ABTS.
 - iv. Μελέτη της αντιμικροβιακής του δράσης.

Μέρος Β: Πειραματικό μέρος

Β.1. Δείγμα μελιού

Για το παρόν πείραμα, μελετήθηκε δείγμα μελιού, δηλωθέν από τον παραγωγό ως μέλι βελανιδιάς, που προερχόταν από την Περιφερειακή Ενότητα Τρικάλων. Η συλλογή του έγινε το 2021. Μετά την παράδοσή του στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, διατηρήθηκε σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C) έως την ανάλυσή του. Διενεργήθηκαν φυσικοχημικές αναλύσεις στο Εργαστήριο Ποιότητας και Ασφάλειας Αγροτικών Προϊόντων, Τοπίου και Περιβάλλοντος του Τμήματος Γεωπονίας του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων, όντως αντιστοιχεί σε μέλι βελανιδιάς.



Εικόνα Β.1.1 Δείγμα μελιού που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη.

B.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δείγματος μελιού βελανιδιάς

Τα αποτελέσματα για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος, σύμφωνα με το Εργαστήριο Ποιότητας και Ασφάλειας Αγροτικών Προϊόντων του Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου, παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.2.1.

Πίνακας Β.2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Υγρασία (%)	16,1
Αγωγιμότητα (mS/cm)	1,21
pH	4,7
Ελεύθερη οξύτητα (meq/Kg)	39
Χρώμα (mm Pfund)	135
HMF (mg/Kg)	0,00

Στο δείγμα προσδιορίστηκαν η περιεκτικότητα του δείγματος σε υγρασία (16,1%), η ηλεκτρική αγωγιμότητα (1,21 mS/cm), το pH (4,4), η ελεύθερη οξύτητα (39 meq/Kg) και η HMF (0,00 mg/Kg). Το χρώμα του ήταν σκούρο κεχριμπάρι (135 mm Pfund).

Οι μετρήσεις αυτές καταδεικνύουν πως το δείγμα συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις της νομοθεσίας. Συγκεκριμένα, στα μέλια μελιτώματος η αγωγιμότητα πρέπει να ξεπερνά τα 0,8 mS/cm. Όπως αναφέρεται, θα πρέπει η αγωγιμότητα να είναι μεγαλύτερη από 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm και 1,1 mS/cm, για το μέλι πεύκου, ελάτης και καστανιάς, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του υπό μελέτη δείγματος υποδεικνύει μέλι μελιτώματος. Αναφορικά με την περιεκτικότητα σε HMF, ως ανώτατη τιμή έχουν οριστεί τα 40 mg/kg, ενώ για την ελεύθερη οξύτητα το όριο είναι τα 50 meq/kg (Council of the European Union, 2002).

Για το μέλι βελανιδιάς (*Quercus ilex*) έχει προσδιορισθεί σε μελέτη δειγμάτων που διεξήχθη από τους Seijo et al. (2019) περιεκτικότητα σε υγρασία $16,7 \pm 1,0\%$, ηλεκτρική αγωγιμότητα $1,1 \pm 0,2$ mS/cm, pH $4,4 \pm 0,2$, HMF $0,3 \pm 0,6$ mg/100 g και χρώμα 120 ± 19 . Σε άλλη μελέτη των Rodríguez-Flores, Escuredo, Míguez και Seijo (2019), για δείγματα μελιού βελανιδιάς έχει καταγραφεί περιεκτικότητα σε υγρασία $17,4 \pm 1,0\%$, ηλεκτρική αγωγιμότητα $1,1 \pm 0,2$ mS/cm, pH $4,5 \pm 0,3$, HMF $0,1 \pm 0,2$ mg/100 g και χρώμα $133 \pm 17,8$ mm Pfund.

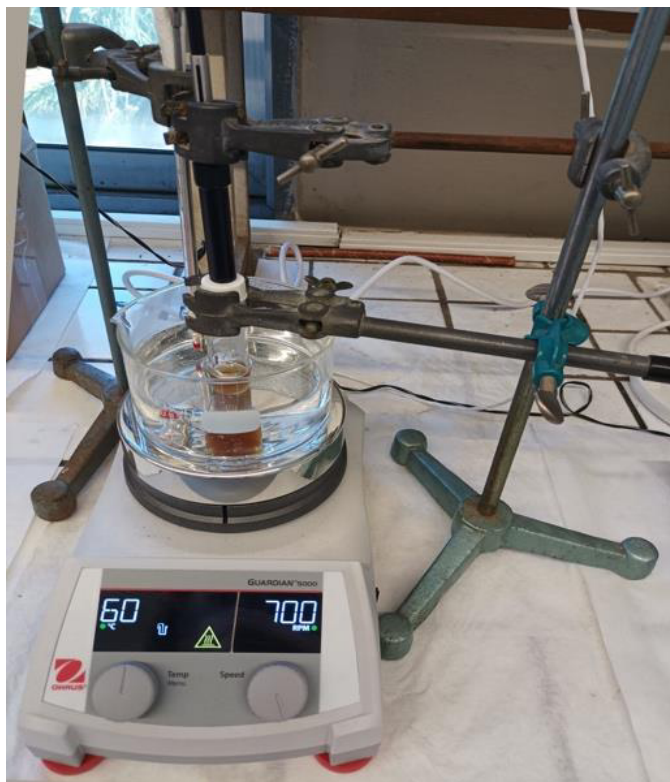
Οι μετρήσεις αυτές συνάδουν με τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του δείγματος (Πίνακας Β.2.1.) καθώς οι μικρές αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν, σύμφωνα με τους Persano-Oddo και Piro (2004) είναι δυνατόν να ερμηνευτούν από την διαφοροποίηση των ειδών εντόμων, που μυζούν τα μελιτώματα, και των φυτών ξενιστών.

B.3. Παραλαβή πτητικών συστατικών μελιού βελανιδιάς με την τεχνική SPME και ανάλυση με GC - MS

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται τα στάδια: α) παραλαβής πτητικού κλάσματος του υπό μελέτη δείγματος μελιού με την τεχνική SPME, β) διαχωρισμού και ταυτοποίησης των ενώσεων του περιεχομένου του με τη χρήση του GC – MS.

B.3.1. Πειραματική πορεία

Χρησιμοποιώντας την τεχνική SPME παρελήφθη πτητικό κλάσμα συστατικών του δείγματος μελιού. Για τον σκοπό αυτόν, αρχικά, πραγματοποιήθηκε η διάλυση 7 g μελιού βελανιδιάς σε απιονισμένο νερό (3110 μL). Με τη χρήση αριθμημένου σιφωνίου ελήφθησαν 6 mL από το μίγμα, ώστε να μεταφερθούν σε γυάλινο περιέκτη των 15 mL με βιδωτό πάμα και διάφραγμα PTFE/σιλικόνης. Σε αυτό προστέθηκε διάλυμα βενζοφαινόνης (20 μL) συγκέντρωσης 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε μεθανόλη. Ακολούθησε η θέρμανση του δείγματος, υπό ανάδευση, στους 60 $^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο, για 30 min. Συγχρόνως, πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση της ίνας SPME στο GC – MS στους 260 $^{\circ}\text{C}$, για 15 min. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ίνα τριπλής φάσης (DVB/CAR/PDMS) (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane), κατέστη δυνατή η απομόνωση πτητικών ουσιών διαφορετικής πολικότητας (πολικές, μέτριας πολικότητας, άπολες). Έτσι, με την έκθεση της ίνας της βελόνας εντός του φιαλιδίου, στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος, για 30 min, ως απαραίτητος χρόνος για να αποκατασταθεί η ισορροπία, προσροφήθηκαν πτητικά συστατικά του δείγματος.



Εικόνα B.3.1.1. Εκχύλιση με την τεχνική SPME.

Με τη χρήση αέριου χρωματογράφου Trace Ultra (GC) (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) εξοπλισμένου με φασματόμετρο μαζών (MS) (DSQII, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA), τη χαμηλής πολικότητας στήλη Restek Rtx – 5MS (30 m μήκος, 0,25 mm ID, 0,25 μm πάχος φιλμ) και αέριο ήλιο καθαρότητας 99,999%, ως φέρον αέριο, με ρυθμό ροής 1 mL/min, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των χημικών ενώσεων στο πτητικό κλάσμα. Ο προγραμματισμός της θερμοκρασίας του κλιβάνου έγινε ως εξής: 40 °C για 6 min, αύξηση με ρυθμό 5 °C/min έως τους 120 °C, αύξηση κατά 3 °C/min έως 160 °C και έως 250 °C με ρυθμό 15 °C/min και τέλος διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στους 250 °C για 1 min. Οι θερμοκρασίες στο σημείο έγχυσης και στη γραμμή μεταφοράς ήταν 220 °C και 290 °C αντιστοίχως. Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης, ο εισαγωγέας τέθηκε σε λειτουργία μη διαμοιρασμού για 3 min και έπειτα σε λειτουργία διαμοιρασμού με λόγο 1:50 μέχρι το τέλος.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων του δείγματος επιτεύχθηκε συγκρίνοντας τα δεδομένα (τον χρόνο συγκράτησης και τα ιοντικά θραύσματα) του φάσματος μαζών κάθε πτητικής ένωσης με τα

καταχωρημένα φάσματα μάζας στη βιβλιοθήκη του GC – MS: NIST (National Institute OF Standards and Technology). Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των πτητικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε βενζοφαινόνη ως εσωτερικό πρότυπο.

Στο δείγμα μελιού διενεργήθηκαν τρεις μετρήσεις και έγινε υπολογισμός της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των επαναλήψεων.



Εικόνα B.3.1.2. Σύστημα GC – MS.

B.3.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, ταυτοποιήθηκαν, συνολικά, 36 πτητικές ενώσεις από δείγμα μελιού βελανιδιάς, οι οποίες ανήκουν σε διάφορες χημικές τάξεις (υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, εστέρες, τερπένια, καρβοξυλικά οξέα, κετόνες). Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναληπτικές μετρήσεις, που παρουσιάζονται στα κάτωθι χρωματογραφήματα (Σχήμα B.3.2.1). Στον Πίνακα B.3.2.1. καταγράφονται οι πτητικές ενώσεις, εκφρασμένες σε $\mu\text{g/g}$ μελιού, που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από το δείγμα.

Πίνακας Β.3.2.1. Πτητικές ενώσεις δείγματος μελιού βελανιδιάς που απομονώθηκαν.

Αρ.	Πτητικές ενώσεις	Χρόνος συγκράτησης - RT (min)	Μέσος όρος (μg/g)	Τυπική απόκλιση
1	2,5-διμεθυλοφουράνιο	3,24	0,02	0,02
2	Επτανάλη	3,88	0,01	0,01
3	2-μεθυλο-1-βουτανόλη	3,97	0,04	0,02
4	2-μεθυλο-2-βουτεν-1-όλη	5,03	0,01	0,01
5	3-μεθυλο-2-επτανόλη	5,35	0,02	0,01
6	2,3-βουτανοδιόλη	5,72	0,02	0,02
7	Οκτάνιο	5,91	0,07	0,01
8	2-φουρανομεθανόλη	8,37	0,03	0,00
9	Εννεάνιο	10,21	0,02	0,00
10	1-(2-φουρανυλο)αιθανόνη	10,57	0,01	0,02
11	N-ακετυλοπυρρόλιο	12,32	0,07	0,00
12	Βενζαλδεΐδη	12,57	0,09	0,02
13	Δεκάνιο	14,12	0,06	0,01
14	ο-κυμένιο	14,91	0,02	0,01
15	2-αιθυλο-1-εξανόλη	15,12	0,01	0,01
16	φαινυλακεταλδεΐδη	15,58	0,01	0,01
17	<i>trans</i> -οξείδιο της λιναλοόλης	16,52	0,09	0,01
18	<i>cis</i> -οξείδιο της λιναλοόλης	17,06	0,09	0,01
19	Ενδεκάνιο	17,54	0,27	0,03
20	2-φαινυλοαιθανόλη	17,94	0,02	0,01
21	Οκτανοϊκός μεθυλεστέρας	18,25	0,03	0,00
22	1-εννεανόλη	19,77	0,13	0,01
23	Οκτανοϊκό οξύ	19,96	0,01	0,01
24	α-τερπινεόλη	20,46	0,02	0,00
25	Δεκανάλη	20,78	0,02	0,01
26	Εννεανοϊκός μεθυλεστέρας	21,28	0,05	0,02
27	2-(4-μεθυλο-3-κυκλοεξεν-1-υλο)προπανάλη	21,74	0,02	0,00
28	1-δεκανόλη	22,74	0,09	0,00
29	Καρβακρόλη	23,26	0,06	0,01
30	Θυμόλη	23,53	0,01	0,01
31	Δεκανοϊκός μεθυλεστέρας	24,22	0,02	0,01
32	β-δαμασκηνόνη	26,00	0,01	0,00
33	Δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	30,84	0,01	0,01
34	Δεκατετρανοϊκός μεθυλεστέρας	37,06	0,01	0,01
35	Φθαλικός δισοβουτυλεστέρας	38,98	0,04	0,01
36	Παλμιτικός μεθυλεστέρας	39,69	0,05	0,02

Αναφορικά με τη σημασία των πτητικών ενώσεων στη διάκριση των μελιών βάσει της βοτανικής προέλευσής τους, κάποιοι συγγραφείς προτείνουν ορισμένες ενώσεις (τερπένια, νορισοπρενοειδή, αρωματικές ενώσεις) ως χαρακτηριστικές μιας δεδομένης βοτανικής προέλευσης. Δεδομένου του ότι αυτές οι ενώσεις βρίσκονται μόνο σε συγκεκριμένα είδη μελιού, σε ορισμένες περιπτώσεις θεωρούνται ως «δείκτες» (Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2003· Alissandrakis, Tarantilis, Harizanis, & Polissiou, 2005). Σε άλλες περιπτώσεις, η βοτανική προέλευση καθορίζεται από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ορισμένων ενώσεων σε κάποια είδη μελιού από ό,τι σε άλλα ή από την απουσία συγκεκριμένων ενώσεων (Soria, Martínez-Castro, & Sanz, 2003· Bianchi et al., 2005). Όπως έχει διαπιστωθεί, όμως, υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ συγγραφέων σχετικά με το ποιες ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για ένα δεδομένο είδος μελιού.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν πολυάριθμες πτητικές ενώσεις, η πλειονότητα των οποίων ανιχνεύτηκε, ωστόσο, σε χαμηλή συγκέντρωση.

Από τους εστέρες εντοπίστηκαν κατά φθίνουσα σειρά: ο εννεανοϊκός μεθυλεστέρας και ο παλμιτικός μεθυλεστέρας, ο φθαλικός δυσοβουτυλεστέρας, ο οκτανοϊκός μεθυλεστέρας, ο δεκανοϊκός μεθυλεστέρας, ο δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας και ο δεκατετρανοϊκός μεθυλεστέρας. Όπως αναφέρεται σε μελέτες, οι περισσότερες ενώσεις από αυτές απαντώνται συχνά σε μέλια μελιτωμάτων σε χαμηλές, συνήθως, συγκεντρώσεις (Pontes et al., 2007· Janoskova, Vyviurska, & Španik, 2014). Σημειώνεται πως οι Karabagias, Karabagias, Nayik, Gatzias και Badeka (2022) ταυτοποίησαν από ελληνικό μέλι βελανιδιάς τους αντίστοιχους αιθυλεστέρες και προτείνουν τον δεκατετρανοϊκό αιθυλεστέρα ως μια εκ των ενώσεων δεικτών για το μέλι βελανιδιάς. Ωστόσο, στο παρόν πείραμα, η ένωση αυτή δεν απομονώθηκε από το υπό μελέτη δείγμα μελιού. Αναφορικά με τον φθαλικό δυσοβουτυλεστέρα, έχει αναφερθεί η ανίχνευσή του σε φθινοπωρινό μέλι ερείκης (Xagoraris et al., 2021).

Από τις αλκοόλες, η 1-εννεανόλη ανιχνεύθηκε, στο συγκεκριμένο δείγμα, δεύτερη σε συγκέντρωση από το σύνολο των πτητικών ενώσεων που απομονώθηκαν, ακολουθούμενη από την 1-δεκανόλη (Πίνακας B.3.2.1). Αξίζει να σημειωθεί πως οι Karabagias et al. (2022) έχουν, επίσης, εντοπίσει στα δείγματα που μελέτησαν την 1-εννεανόλη και την 1-δεκανόλη, προτείνοντας, μάλιστα, τη χρήση της 1-δεκανόλης ως δείκτη για το ελληνικό μέλι βελανιδιάς. Η 1-εννεανόλη, ωστόσο, θεωρείται πως αποτελεί κοινό συστατικό διαφόρων μελιών (Pontes et al., 2007). Επιπλέον, η 2,3-βουτανοδιόλη, που ανιχνεύθηκε στο δείγμα (Πίνακας B.3.2.1), έχει

προταθεί ως δείκτης ελέγχου της ταυτότητας των μελιών μελιτώματος από τους μελετητές Soria et al. (2004). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί, από τους Castro-Vázquez, Díaz-Maroto και Pérez-Coello (2006), πως ανιχνεύθηκε, σε υψηλές συγκεντρώσεις, η αλκοόλη 2-φαινυλοαιθανόλη σε δείγματα μελιών βελανιδιάς, πουρναριού και δάσους, καθώς και οι αλκοόλες α-τερπινεόλη και θυμόλη, ενώσεις που εντοπίστηκαν στο δείγμα του παρόντος πειράματος (Πίνακας Β.3.2.1) .

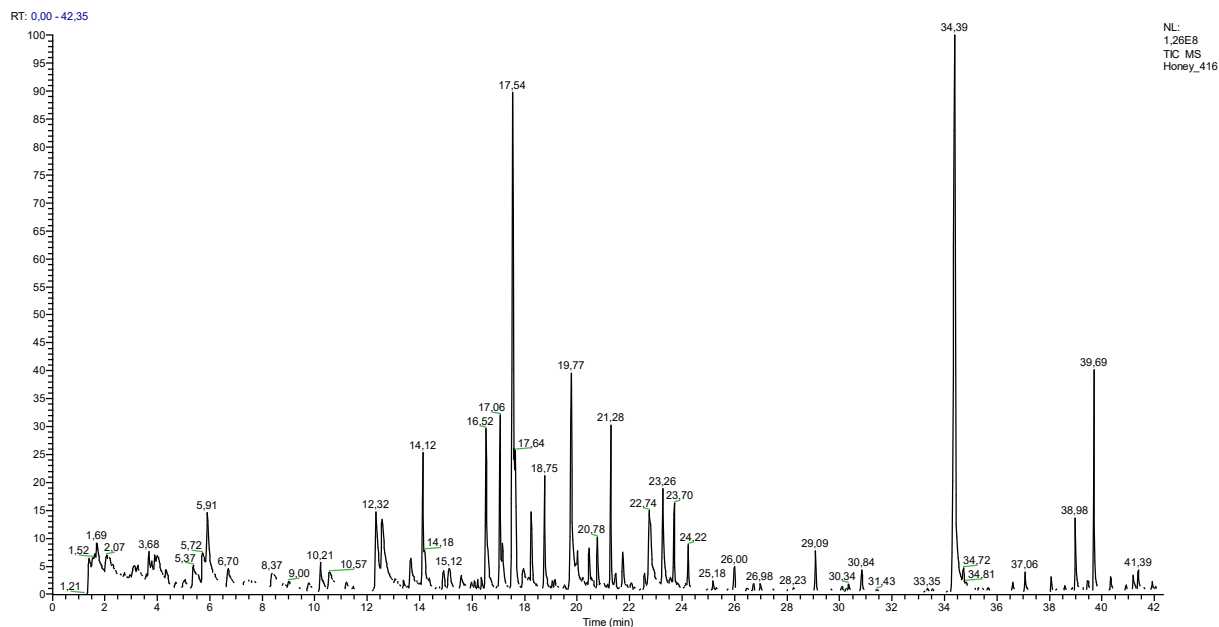
Όπως φαίνεται και στον Πίνακα Β.3.2.1, από τις κυρίαρχες πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν είναι το *trans*-οξειδίο της λιναλοόλης και το *cis*-οξειδίο της λιναλοόλης, τα οποία έχουν βρεθεί σε μέλια μελιτωμάτων (Castro-Vázquez et al., 2006). Αξίζει να αναφερθεί πως το *cis* - οξειδίο της λιναλοόλης έχει ταυτοποιηθεί και σε πρόσφατη μελέτη δείγματος ελληνικού μελιού βελανιδιάς (Karabagias et al., 2022), αλλά και σε άλλα μέλια, όπως ακακίας, ερείκης, καστανιάς, πορτοκαλιάς, θυμαριού, δεντρολίβανου (Machado, Miguel, Vilas-Boas, & Figueiredo, 2020). Παράλληλα, σημειώνεται, ότι τα παράγωγα φουρανίου, όπως το 2,5-διμεθυλοφουράνιο και η 2-φουρανομεθανόλη που εντοπίστηκαν, υποστηρίζεται πως, συχνά, προέρχονται από τη θερμική επεξεργασία ή την αποθήκευση μελιού (Soria et al., 2004).

Οι αλδεΐδες, στην παρούσα μελέτη, εντοπίστηκαν σε χαμηλές σχετικά συγκεντρώσεις, με εξαίρεση τη βενζαλδεΐδη (Πίνακας Β.3.2.1). Αντίστοιχα, στη μελέτη δειγμάτων μελιού βελανιδιάς, πουρναριού και δάσους των Castro-Vázquez et al. (2006) η βενζαλδεΐδη βρέθηκε, επίσης, σε υψηλή συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα. Μάλιστα, ενώσεις όπως η βενζαλδεΐδη και η φαινυλακεταλδεΐδη, που ανιχνεύτηκαν στο παρόν πείραμα, υποστηρίζεται από ορισμένους μελετητές ότι μπορεί να είναι χαρακτηριστικές για τα μέλια μελιτώματος (Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, & Pérez-Coello, 2007), ενώ άλλοι τις αποδίδουν ως δείκτες μελιών ανθέων (Serra Bonvehí & Ventura Coll, 2003). Επιπλέον, η επτανάλη δεν μπορεί να θεωρηθεί ως χαρακτηριστικός δείκτης της βοτανικής προέλευσης για το παρόν δείγμα, καθώς έχει ανιχνευθεί σε διάφορα μονοποικιλιακά μέλια (Machado et al., 2020). Σημειώνεται πως μελέτη των Karabagias et al. (2022) ταυτοποίησε σε δείγμα ελληνικού μελιού βελανιδιάς τις ενώσεις: βενζαλδεΐδη, 2-φαινυλακεταλδεΐδη, δεκανάλη, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στο παρόν πείραμα (Πίνακας Β.3.2.1).

Οι κετόνες και τα καρβοξυλικά οξέα εντοπίστηκαν σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες χημικές κατηγορίες. Συγκεκριμένα, οι 1-(2-φουρανυλο)αιθανόνη, β-δαμασκηνόνη και οκτανοϊκό οξύ, οι οποίες και απομονώθηκαν, θεωρείται πως αποτελούν κοινό συστατικό διαφόρων μελιών (Castro-Vázquez et al., 2006· Pontes et al., 2007). Στη μελέτη των

Karabagias et al. (2022) το μέλι βελανιδιάς χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία κετονών.

Από τους υδρογονάνθρακες παρατηρήθηκε πως το ενδεκάνιο αποτελεί την κυρίαρχη ένωση του δείγματος. Ωστόσο, τα γραμμικά αλκάνια C8 έως C15 θεωρούνται ενώσεις κοινές για πολυάριθμα μέλια (Jerkonić, Marijanović, Tuberoso, Bubalo, & Kezić, 2009). Επομένως, οι ανιχνευθείσες ενώσεις ενδεκάνιο, οκτάνιο, δεκάνιο και εννεάνιο δε θα μπορούσαν να οριστούν ως δείκτες του τύπου μελιού που μελετήθηκε.



Σχήμα B.3.2.1. Χρωματογράφημα δείγματος μελιού βελανιδιάς.

B.3.3. Συμπεράσματα

Όπως παρατηρήθηκε, οι πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν από το δείγμα της παρούσας μελέτης εμφανίζουν αρκετές διαφορές σε σχέση με αυτές που έχουν δημοσιευθεί σε μελέτες για το μέλι μελιτωμάτων (Castro-Vázquez et al., 2006· Janoskova et al., 2014· Karabagias et al., 2022). Μεγαλύτερη αντιστοιχία προκύπτει ανάμεσα στις ανιχνευθείσες ενώσεις του συγκεκριμένου πειράματος με τις ενώσεις που απομόνωσαν οι Karabagias et al. (2022) κατά τη μελέτη δείγματος ελληνικού μελιού από βελανιδιά (*Quercus ilex*), η οποία κρίνεται πως, πιθανότατα, οφείλεται στην κοινή τους προέλευση. Γενικότερα, οι διαφορές που παρουσιάζονται, αποδίδονται στην ενδεχόμενη διαφορετική φυτική ποικιλία, στη μη ταύτιση γεωγραφικής προέλευσης, αλλά και στην ανομοιότητα των μελισσοκομικών πρακτικών που εφαρμόζονται στην εκάστοτε περίπτωση.

B.4. Φασματοσκοπική μελέτη μελιού βελανιδιάς με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η φασματοσκοπική μελέτη, που διενεργήθηκε για το δείγμα μελιού βελανιδιάς, με την τεχνική ATR της φασματοσκοπίας FTIR.

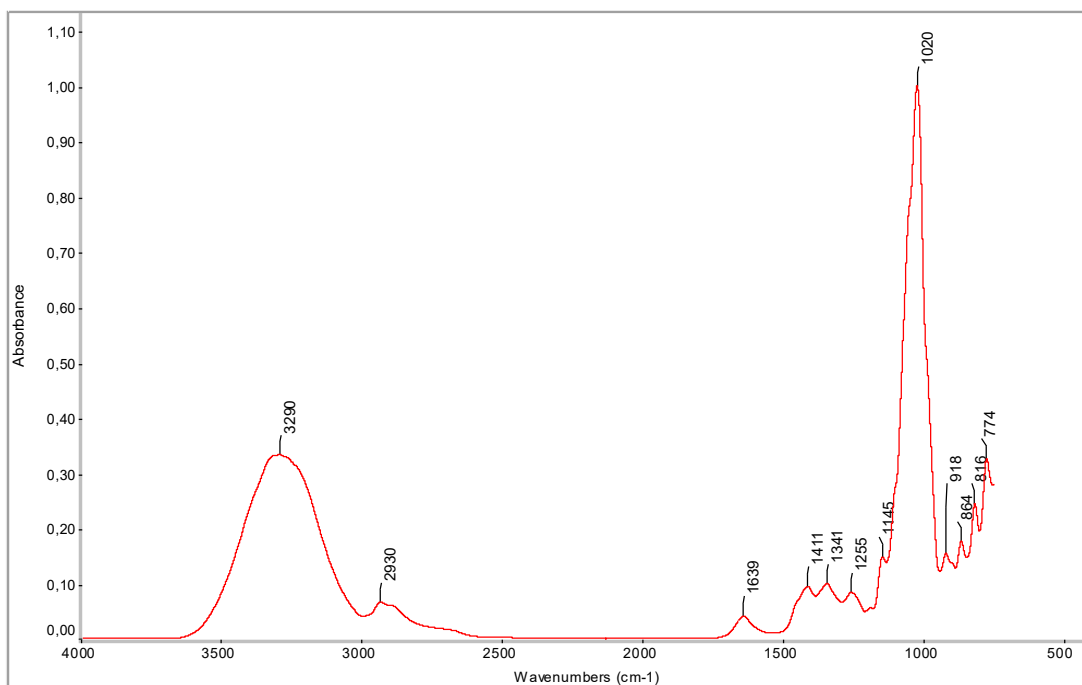
B.4.1. Πειραματική πορεία

Για τη λήψη των φασμάτων FTIR χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο IROS 05 της εταιρείας Ostec. Τα φάσματα καταγράφηκαν με την τεχνική ATR με υποδοχέα δείγματος πρίσμα διαμαντιού. Αρχικά, ελήφθη φάσμα υποβάθρου (background) με τη χρήση μόνο του κρυστάλλου ATR. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε προσεκτικά μικρή ποσότητα μελιού στον διαμαντένιο κρύσταλλο ATR και ελήφθη το φάσμα του δείγματος (διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} , 64 σαρώσεις). Συνολικά, καταγράφηκαν τρία φάσματα για το δείγμα και πριν από κάθε λήψη, γινόταν καταγραφή του υποβάθρου (background).

Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού OMNIC 8.2.0387. Στα φάσματα εφαρμόστηκαν τα όρια: 4000 έως 750 cm^{-1} , σε όλη την πειραματική διαδικασία. Έγινε αποκοπή της κορυφής του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), εφαρμόστηκε η λειτουργία της αυτόματης εξομάλυνσης, καθώς και η λειτουργία της αυτόματης διόρθωσης των βασικών γραμμών των φασμάτων. Ακολούθησε ο υπολογισμός του μέσου όρου των τριών ληφθέντων φασμάτων και η κανονικοποίηση της κλίμακάς του (απορρόφηση από 0 έως 1).

B.4.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στο Σχήμα B.4.2.1 παρατίθεται το φάσμα ATR-FTIR του μελετώμενου δείγματος μελιού βελανιδιάς και στον Πίνακα B.4.2.1 αναγράφονται οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος σε αντιστοιχία με τις αποδόσεις τους. Σημειώνεται πως η ζώνη απορρόφησης μεταξύ 4000 και 1500 cm^{-1} αποτελεί την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων, ενώ η ζώνη απορρόφησης μεταξύ 1500 και 750 cm^{-1} θεωρείται περιοχή «δακτυλικού αποτυπώματος», αφού είναι χαρακτηριστική κάθε δείγματος (Svečnjak, Prđun, Rogina, Bubalo, & Jerković, 2017· Xagoraris et al., 2021).



Σχήμα Β.4.2.1. Φάσμα ATR – FTIR δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Οι κορυφές που εμφανίστηκαν στα 3290 cm^{-1} και 1639 cm^{-1} αποδίδονται σε δόνηση τάσης του O-H και δόνηση παραμόρφωσης του O-H του νερού, αντίστοιχα (Anjos et al., 2014), ενώ η κορυφή που παρατηρήθηκε στα 2930 cm^{-1} , βάσει μελέτης των Tewari και Irudayaraj (2004), αντιστοιχίζεται στις δονήσεις τάσης του C-H των καρβοξυλικών οξέων, και N-H των αμινομάδων των ελεύθερων αμινοξέων, ενώσεων που υπάρχουν στο μέλι σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η πιο ισχυρή κορυφή του φάσματος, που εντοπίζεται στα 1020 cm^{-1} , αποδόθηκε σε δόνηση τάσης του C-O της γλυκόζης, ενώ η κορυφή στα 1341 cm^{-1} έχει συνδεθεί με κάμψη του O-H της φρουκτόζης (Anjos et al., 2014· Svečnjak et al., 2017).

Σε συνδυασμό των δονήσεων τάσης του C-O-H της γλυκόζης και του C-H των αλκενίων, σύμφωνα με μελέτη των Xagoraris et al. (2021), αποδίδεται, η κορυφή που παρουσιάστηκε στα 1411 cm^{-1} . Επιπλέον, θεωρείται πως η κορυφή στα 1255 cm^{-1} που παρατηρήθηκε, οφείλεται στις δονήσεις κάμψης των CH_2 της γλυκόζης και CH_2 της φρουκτόζης (Svečnjak et al., 2017), καθώς και της δόνησης τάσης του C-C του σκελετού των σακχάρων. Ακόμα, η κορυφή στα 918 cm^{-1} , που εντοπίστηκε, αντιστοιχεί στην κάμψη του C-H των σακχάρων και κυρίως της γλυκόζης (Nayik, Dar, & Nanda, 2015· Svečnjak et al., 2017).

Η κορυφή στα 864 cm^{-1} αποδόθηκε σε δόνηση τάσης του C-C του σκελετού της φρουκτόζης. Επίσης, η κορυφή στα 816 cm^{-1} αντιστοιχίστηκε στη δόνηση τάσης του C-C-H της φρουκτόζης, ενώ η κορυφή στα 774 cm^{-1} στη δόνηση παραμόρφωσης του C-C-H της φρουκτόζης (Svečnjak et al., 2017· Xagoraris et al., 2021). Γενικότερα, το φάσμα ATR – FTIR του υπό μελέτη δείγματος αποδίδεται ως ένα τυπικό φάσμα μελιού, όπως παρατηρείται από τη σύγκριση με φάσματα μελιών άλλων ποικιλιών (Tahir et al., 2017· Xagoraris et al., 2021).

Πίνακας B.4.2.1. Οι βασικές κορυφές του φάσματος ATR – FTIR δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Κυματάρηθμοί (cm^{-1})	Λειτουργική ομάδα	Αποδόσεις	Τύπος Δόνησης
~3290	O-H	Σάκχαρα, Νερό, Φαινολικά	Τάση
~2930	C-H	Καρβοξυλικά οξέα	Τάση
~1639	O-H	Νερό	Παραμόρφωση
~1411	C-O-H	Γλυκόζη	Τάση
	-CH ₂ , C-H	Αλκένια	
~1341	O-H(C-OH)	Φρουκτόζη	Κάμψη
~1255	-CH ₂ -	Γλυκόζη, Φρουκτόζη	Κάμψη
	C-C	Σάκχαρα	Τάση
~1145	C-O, C-O-C	Σάκχαρα	Κάμψη, Τάση
~1020	C-O	Γλυκόζη	Τάση
~918	C-H	Σάκχαρα, Γλυκόζη	Κάμψη
~864	C-C	Φρουκτόζη	Τάση
~816	C-C-H	Φρουκτόζη	Τάση
~774	C-C-H	Φρουκτόζη	Παραμόρφωση

B.4.3. Συμπεράσματα

Μέσω της ανάλυσης ATR-FTIR αποδόθηκαν οι χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες του υπό μελέτη δείγματος μελιού βελανιδιάς. Από τη σύγκριση του φάσματος του δείγματος της παρούσας εργασίας με φάσματα μελιών διαφορετικών ποικιλιών σε άλλες μελέτες, διαπιστώθηκε πως πρόκειται για ένα τυπικό φάσμα μελιού. Οι ενώσεις που αντιστοιχίστηκαν με τις βασικές κορυφές του φάσματος ήταν: νερό, σάκχαρα, φαινολικά συστατικά και καρβοξυλικά οξέα.

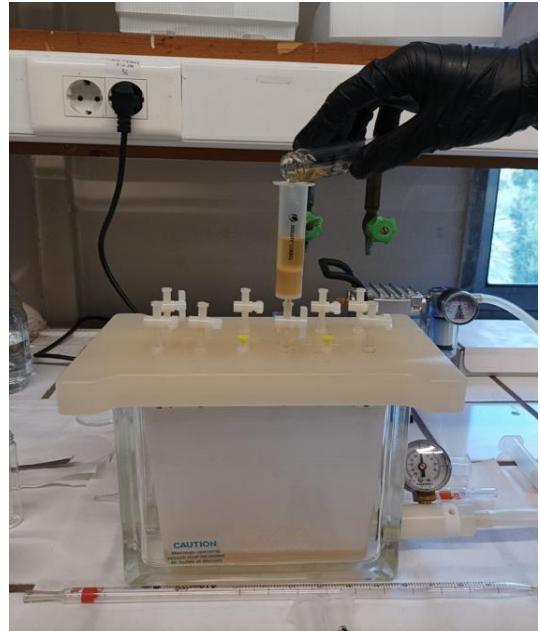
B.5. Ανάλυση φαινολικών συστατικών μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς

B.5.1. Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Αρχικά, έγινε ζύγιση 30 g μελιού σε κωνική φιάλη και προστέθηκαν 35 mL υπερκάθαρου νερού με ογκομετρικό κύλινδρο. Στη συνέχεια, ομογενοποιήθηκε το μίγμα σε λουτρό υπερήχων, της εταιρείας Grant instruments, για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε η διήθηση του διαλύματος υπό κενό, ώστε να κατακρατηθούν τυχόν στερεά σωματίδια από το διηθητικό χαρτί. Με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος 0,1 M έγινε ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 2.

Προκειμένου να παραληφθεί το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος διενεργήθηκε η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Χρησιμοποιήθηκαν στήλες Isolute C18 (EC) 2 g/15 mL συζευγμένες με αντλία κενού. Αφού ενεργοποιήθηκαν οι στήλες με 3 mL οξινισμένης, με υδροχλωρικό οξύ 0,1 M, μεθανόλης και 9 mL υπερκάθαρου νερού, τοποθετήθηκε το δείγμα. Ακολούθησε το ξέπλυμα των στηλών με 12 mL οξινισμένου, με υδροχλωρικό οξύ 0,1 M, υπερκάθαρου νερού, ώστε να απομακρυνθούν σάκχαρα του δείγματος. Η παραλαβή των φαινολικών συστατικών έγινε με 3 mL οξινισμένης μεθανόλης. Για τον καθαρισμό του διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα Millex – LCR (PTFE) 0,45 μm. Η διαδικασία επαναλήφθηκε πέντε φορές, δηλαδή συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 150 g του δείγματος μελιού.

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του διαλύτη της εκχύλισης από το συνολικό παραληφθέν διάλυμα, δηλαδή της μεθανόλης HPLC (99,5 %), με τη χρήση περιστρεφόμενου εξατμιστήρα κενού, συνδεδεμένου με υδατόλουτρο. Με αυτόν τον τρόπο, επιτεύχθηκε συμπύκνωση του διαλύματος μέχρι ξηρού. Ακολούθησε η διάλυση του παρεληφθέντος στερεού σε 10 mL μεθανόλης LC – MS (99,9 %). Στη συνέχεια, αποθηκεύτηκε το διάλυμα, αφού περιτυλίχθηκε ο περιέκτης με αλουμινόχαρτο, σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C), για τη διεξαγωγή περαιτέρω αναλύσεων.



Εικόνα B.5.1.1. Τεχνική SPE παραλαβής μεθανολικού εκχυλίσματος από μέλι βελανιδιάς.
Α. Όργανα και αντιδραστήρια (αριστερά). Β. Προσθήκη δείγματος στο στηλάκι (δεξιά).

B.5.2. Χρωματογραφική μελέτη φαινολικών ενώσεων δείγματος μελιού βελανιδιάς με LC – QTOF – MS

Στον παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η ανάλυση των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος του υπό μελέτη δείγματος με τη χρήση υγροχρωματογραφίας συζευγμένη με φασματόμετρο μαζών.

B.5.2.1. Πειραματική πορεία

Για τη χημική ανάλυση των φαινολικών συστατικών του δείγματος μελιού χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μαζών Agilent 6530 Accurate – Mass Q – TOF LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) συζευγμένο με υγρό χρωματογράφο Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) εξοπλισμένο με στήλη NUCLEOSHELL Bluebird RP 18, πάχους επένδυσης 2,7 μm , μήκους 100 mm και διαμέτρου 4,6 mm (Macherey – Nagel, Duren, Germany). Το σύστημα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο νερό με οξικό οξύ 0,1% (v/v) (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο με οξικό οξύ 0,1% (v/v) (διαλύτης B). Ο ρυθμός ροής ήταν 1,0 mL/min και η πίεση 600 bar. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα B.5.2.1.1. Διενεργήθηκε αυτόματη δειγματοληψία ορισμένου όγκου (10 μL).

Πίνακας B.5.2.1.1. Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης.

Χρόνος (min)	A (%)	B (%)
0,0	90	10
8,0	70	30
12,0	60	40
16,0	50	50
18,0	90	10
33,0	90	10

Το πείραμα εκτελέστηκε υπό συνθήκες αρνητικού ιονισμού με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI). Για τη βαθμονόμηση του συστήματος κατά τον αρνητικό ιονισμό ως διορθωτικός παράγοντας εφαρμόστηκε συνεχής διοχέτευση διαλύματος κατάλληλων ιόντων αναφοράς ($m/z = 112,9856$ και $1033,9881$). Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου καταγράφονται στον Πίνακα B.5.2.1.2. Για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Agilent MassHunter Quantitative Analysis B.07.00-E2 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

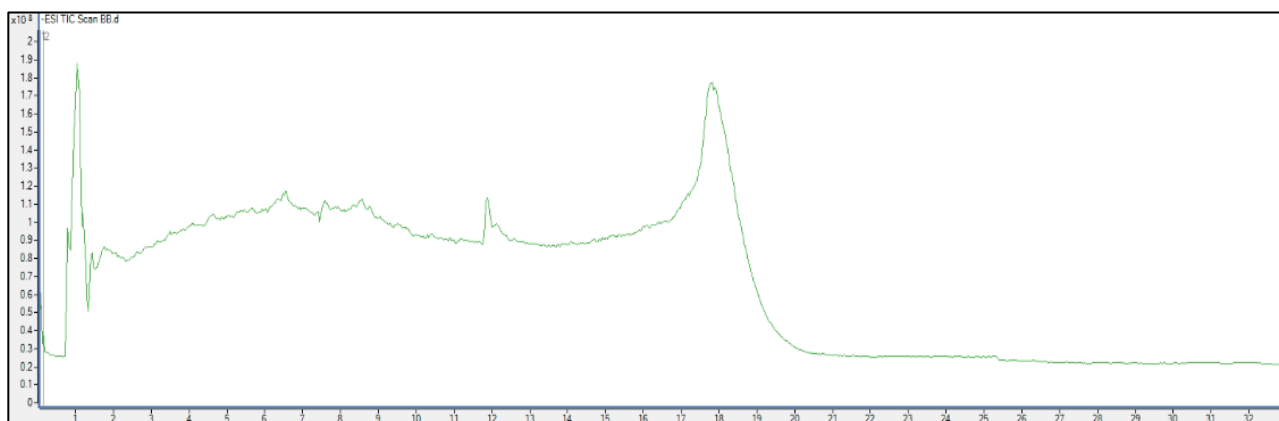
Πίνακας B.5.2.1.2. Συνθήκες λειτουργίας του οργάνου.

Θερμοκρασία αερίου αποδιαλύτωσης	300 °C
Ροή αερίου αποδιαλύτωσης	10 L/min
Πίεση αερίου εκνεφωτή	40 psig
Δυναμικό τριχοειδούς	3500 V
Δυναμικό θραυσματοποίησης	150 V
Δυναμικό αποκορυφωτή / διαχωριστή ιόντων	65 V

B.5.2.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Προκειμένου να διασφαλίζεται η αυθεντικότητα του μελιού και να αποφεύγεται η νοθεία και οι εμπορικές απάτες, πραγματοποιείται γυρεοσκοπική ανάλυση. Ωστόσο, λόγω των περιορισμών στον χαρακτηρισμό του μελιού μέσω αυτής, χρήσιμη θεωρείται, η επιπρόσθετη αξιολόγηση του φαινολικού προφίλ των διαφόρων τύπων μελιού και καθίσταται σημαντική η καθιέρωση κατάλληλων φαινολικών ενώσεων «δεικτών» για την πιστοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μελιών (Hernanz et al., 2023). Όπως επισημαίνεται, η μελέτη του αποτυπώματος των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη διερεύνηση τόσο της προέλευσης, όσο και της πιθανής βιοδραστικότητας των διαφόρων τύπων μελιού (Koulis et al., 2022).

Στην παρούσα μελέτη, από την ανάλυση του δείγματος μελιού βελανιδιάς ταυτοποιήθηκαν, με τη χρήση προτύπων ενώσεων, τα εξής φαινολικά συστατικά: αμπισισικό οξύ, βανιλικό οξύ, γαλλικό οξύ, γεντισικό οξύ, ελλαγικό οξύ, καφεϊκό οξύ, *π*-κουμαρικό οξύ, *trans*-κινναμωμικό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 2-(4-υδροξυφαινυλο)οξικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, απιγενίνη, ισοραμεντίνη, ναριγγενίνη, πινοσεμπρίνη, χρυσίνη και φλωρογλυκινόλη (Πίνακας B.5.2.2.1). Παράλληλα ελέγχθηκαν με τη χρήση προτύπων, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν, οι εξής φαινολικές ενώσεις: ομογεντσικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, σιναπικό οξύ, συριγγικό οξύ, φερουλικό οξύ, γλωρογενικό οξύ, συριγγικός μεθυλεστέρας, κατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, καμφερόλη, λουτεολίνη, μυρικετίνη και μυρισιτρίνη (Πίνακας B.5.2.2.1, Σχήμα B.5.2.2.1).



Σχήμα B.5.2.2.1. Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Πίνακας Β.5.2.2.1. Φαινολικά συστατικά του δείγματος μελιού βελανιδιάς που ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση προτύπων ενώσεων.

Φαινολικά Συστατικά	Μοριακός Τύπος	Χρόνος έκλυσης (min)	Θεωρητικό m/z	Πειραματικό m/z	Σφάλμα μάζας (ppm)
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	1,5	169,0142	169,0150	-4,45
Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	2,1	153,0193	153,0193	0,20
Φλωρογλυκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	2,1	125,0244	125,0246	-1,45
Γεντισικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	2,9	153,0193	153,0198	-3,05
4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	3,2	137,0245	137,0245	-0,59
2-(4- υδροξυφαινυλο)οξικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₃	3,3	151,0401	151,0403	-1,53
Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	3,8	179,0350	179,0352	-1,21
Βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	4,9	167,0350	167,0355	-3,09
π-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	5,3	163,0401	163,0401	-0,19
Ελλαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈	6,2	300,9990	300,9988	0,64
Αμπισισικό οξύ	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	8,5	263,1289	263,1289	-0,06
<i>trans</i> -Κινναμωμικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₂	9,3	147,0452	147,0450	1,05
Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	11,5	269,0455	269,0455	0,18
Ισοραμνετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	11,52	315,0510	315,0506	1,36
Ναριγγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	11,9	271,0612	271,0611	0,36
Χρυσίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	14,8	253,0506	253,0515	-3,42
Πινοσεμπρίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	14,8	255,0663	255,0659	1,50

Όπως προκύπτει, ενώσεις που ανιχνεύτηκαν στο παρόν πείραμα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες ανάλυσης φαινολικών ενώσεων δειγμάτων μελιού βελανιδιάς. Ανάμεσά τους είναι το πρωτοκατεχικό οξύ, που οι Sahin, Kaltalioglu, Erisgin, Coskun-Cevhe και Kolayli (2019) έχουν ανιχνεύσει χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (RP – HPLC – DAD), χαρακτηρίζοντας το ως το κύριο συστατικό στα προερχόμενα από διάφορες φυτογεωγραφικές ζώνες της Τουρκίας δείγματα μελιού βελανιδιάς. Επίσης, οι ενώσεις καφεϊκό οξύ και γαλλικό οξύ, που ταυτοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, όπως αναφέρεται από τους Kolayli, Can, Çakir, Okan και Yildiz (2018), έχουν εντοπισθεί σε όλα τα δείγματα μελιού βελανιδιάς τουρκικής προέλευσης της μελέτης τους. Ωστόσο, το καφεϊκό οξύ έχει ανιχνευθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ το γαλλικό σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Αντίστοιχα, για ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο υπό μελέτη δείγμα, συγκεκριμένα, το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, αλλά και το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, αναφέρεται στην ανάλυση των φαινολικών ενώσεων των Can et al. (2015), που έχει πραγματοποιηθεί μέσω της τεχνικής RP-HPLC, πως βρίσκονται ως κύριες ενώσεις σε δείγματα μελιού βελανιδιάς (n=3). Μάλιστα, το γαλλικό οξύ, προτείνεται από τους ερευνητές αυτούς, ως χημικός δείκτης για τη διαφοροποίηση των μελιών βελανιδιάς από πεύκου, διότι έχει ανιχνευτεί μόνο στο μέλι βελανιδιάς και σε σχετικά υψηλή ποσότητα. Σύμφωνα με τη μελέτη τους, το πρωτοκατεχικό οξύ μπορεί, επίσης, να θεωρηθεί εν δυνάμει δείκτης, γιατί έχει βρεθεί σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα μέλια βελανιδιάς από ό,τι στα μέλια πεύκου. Επιπλέον, τα επίπεδα του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος έχουν εμφανιστεί υψηλότερα στα μέλια βελανιδιάς, ενώ έχει διαπιστωθεί η παρουσία του καφεϊκού οξέος σε σημαντικές ποσότητες στο μέλι βελανιδιάς. Παράλληλα, η μη ανίχνευση των ενώσεων κατεχίνη και καμφερόλη, που ελέγχθηκαν στο παρόν πείραμα, συνάδει με τα αποτελέσματα της μελέτης τους, καθώς επισημαίνεται πως έχουν προσδιοριστεί στο πευκόμελο, αλλά δεν έχουν εντοπιστεί στο μέλι βελανιδιάς.

Οι ενώσεις ναριγγενίνη, πινοσεμπρίνη, χρυσίνη, *trans*-κινναμωμικό, που ταυτοποιήθηκαν στο παρόν δείγμα, αναφέρεται πως συχνά ανιχνεύονται σε δείγματα μελιού βελανιδιάς (Oroian, Rorciuc, Buculei, Paduret, & Todosi, 2016· Kolayli et al., 2018· Koulis et al., 2022). Επίσης, από τα δείγματα των διαφόρων μελιών βελανιδιάς που έχουν εξετασθεί από τους Can et al. (2015) απουσιάζουν το χλωρογενικό οξύ, καμφερόλη και η μυρικετίνη, ενώσεις που ελέγχθηκαν, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν ούτε στο δείγμα του παρόντος πειράματος. Ωστόσο, οι φαινολικές ενώσεις

βανιλικό οξύ, απιγενίνη και ισοραμνετίνη, οι οποίες στη μελέτη τους δεν έχουν ανιχνευθεί, εντοπίστηκαν στο παρόν δείγμα που μελετήθηκε.

Σε μελέτη δειγμάτων μελιού βελανιδιάς των Kodayli et al. (2018) αναφέρεται η μη ανίχνευση κατεχίνης, συριγγικού οξέος, λουτεολίνης, όπως και στο υπό μελέτη δείγμα, ενώ έχουν ανιχνευθεί μικρές συγκεντρώσεις επικατεχίνης και φερουλικού οξέος, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος που παρατηρήθηκε απουσία των ενώσεων αυτών. Σχετικά με το π-κουμαρικό οξύ, που έχει αναφερθεί ως μία από τις κύριες φαινολικές ενώσεις στα μέλια βελανιδιάς από τους ίδιους μελετητές, διαπιστώθηκε η ύπαρξή του στο δείγμα του συγκεκριμένου πειράματος. Αναφορικά με το αμπσιικό οξύ, που ταυτοποιήθηκε στο υπό μελέτη δείγμα, σημειώνεται πως έχει χαρακτηριστεί ως κύρια φαινολική ένωση των μελιτωδών μελιών (Recklies, Peukert, Kölling-Speer, & Speer, 2021).

Από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς ταυτοποιήθηκαν, χωρίς τη χρήση προτύπων ενώσεων, τα φαινολικά συστατικά που καταγράφονται στον Πίνακα Β.5.2.2.2.

Πίνακας Β.5.2.2.2. Φαινολικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς που ανιχνευθήκαν χωρίς τη χρήση προτύπων ενώσεων.

Μοριακός Τύπος	Μοριακό βάρος	Χρόνος έκλουσης (min)	Φαινολικά Συστατικά
C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178,0636	9,7	κωνιφερυλική αλδεΐδη
C ₂₀ H ₂₆ O ₇	378,1678	6,4	Δεν ταυτοποιήθηκε
C ₁₀ H ₈ O ₅	208,0373	3,4	φραξετίνη

Σχετικά με την ένωση κωνιφερυλική αλδεΐδη, που ανιχνεύθηκε στον παρόν πείραμα, αξίζει να αναφερθεί πως έχει διαπιστωθεί από τους Vasić et al. (2018) η παρουσία της σε μέλια μελιτωμάτων. Επιπλέον, σημειώνεται πως, μελετώντας διάφορους τύπους ελληνικών μελιών, οι Koulis et al. (2022) έχουν εντοπίσει την ένωση με μοριακό τύπο C₂₀H₂₆O₇, ουσία που ανιχνεύθηκε στο δείγμα μελιού βελανιδιάς της παρούσας μελέτης, ωστόσο την προτείνουν ως μία εκ των «δεικτών» για το μέλι πεύκου.

Αναφορικά με την ένωση φραξετίνη, που επίσης ταυτοποιήθηκε στο υπό μελέτη δείγμα, έχει αποδειχτεί από πρόσφατες χημικές και φαρμακευτικές έρευνες ότι οι κουμαρίνες μπορούν να θεωρηθούν σημαντικά συστατικά της πρόπολης (Lončar et al., 2020). Επιπρόσθετα, στην έρευνα

των Hroboňová, Lehotay, Čižmárik και Sáděcká (2013), όπου έχουν διενεργηθεί αναλύσεις σε δείγματα πρόπολης, τα οποία έχουν συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Σλοβακίας, μία εκ των κουμαρινών που έχουν ανιχνευθεί, είναι η φραζετίνη. Μάλιστα, μεταξύ των δειγμάτων πρόπολης έχουν παρατηρηθεί μικρές διαφορές στην περιεκτικότητά τους σε κουμαρίνες και αποδίδονται στα διαφορετικά κλιματικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά, την προέλευση των δειγμάτων, τη χλωρίδα που περιβάλλει την κυψέλη και άλλους παράγοντες. Όπως αναφέρεται, επιπλέον, η ένωση φραζετίνη έχει ταυτοποιηθεί στη μελέτη των Winstel, Gautier και Marchal (2020), όπου εξετάζεται εκχύλισμα ξύλου βελανιδιάς για την παρουσία διαφόρων κουμαρινών χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία συζευγμένης με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS). Οι ερευνητές έχουν εντοπίσει, κατά τη διενέργειά της μελέτης αυτής, πέντε κουμαρίνες, για τις οποίες ήταν ήδη γνωστό ότι υπάρχουν στο ξύλο βελανιδιάς, καθώς και τη φραζετίνη, ένωση που δεν είχε ανιχνευθεί προηγουμένως.

B.5.2.3. Συμπεράσματα

Στοχεύοντας στην αξιολόγηση του φαινολικού προφίλ του δείγματος, παρελήφθη το μεθανολικό του εκχύλισμα με την τεχνική SPE προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση LC – QTOF – MS. Με τη χρήση προτύπων ενώσεων ταυτοποιήθηκαν 17 φαινολικά συστατικά. Επισημαίνεται πως μεταξύ των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν βρίσκεται το πρωτοκατεχικό οξύ και το γαλλικό οξύ, που έχουν προταθεί ως εν δυνάμει δείκτες για τη διάκριση του μελιού βελανιδιάς από το μέλι πεύκου από τους Can et al. (2015). Επίσης, έχει αναφερθεί η παρουσία του καφεϊκού και του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη, ως χαρακτηριστική σε δείγματα μελιού βελανιδιάς (Kolaylı et al., 2018· Can et al., 2015). Σχετικά με τις ενώσεις κωνιφερυλική αλδεΰδη, φραζετίνη και την ένωση με μοριακό τύπο $C_{20}H_{26}O_7$, που ταυτοποιήθηκαν χωρίς τη χρήση προτύπων, είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί πως η παρουσία της φραζετίνης διαπιστώθηκε για πρώτη φορά σε μελέτη δείγματος μελιού.

B.5.3. Φασματοσκοπική μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος μελιού βελανιδιάς με χρήση της φασματοσκοπίας FTIR

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η φασματοσκοπική μελέτη, που διενεργήθηκε για το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού βελανιδιάς, με την τεχνική ATR της φασματοσκοπίας FTIR.

B.5.3.1. Πειραματική πορεία

Προκειμένου να αναλυθεί μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού μέσω της τεχνικής ATR-FTIR, ελήφθησαν τρία φάσματα, με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου IROS 05 της εταιρείας Ostec, τα οποία καταγράφηκαν με την τεχνική ATR με υποδοχέα δείγματος πρίσμα διαμαντιού και με τις συνθήκες που περιγράφονται στο B.4.1. Ο όγκος του διαλύματος ήταν 20 μL . Για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία, προηγήθηκε η τοποθέτηση του διαλύματος, σταδιακά, στον υποδοχέα και η ξήρανσή του σε κλίβανο στους 49 $^{\circ}\text{C}$ για 15 min, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα μεθανόλης. Η επεξεργασία των φασμάτων περιγράφεται στο B.4.1

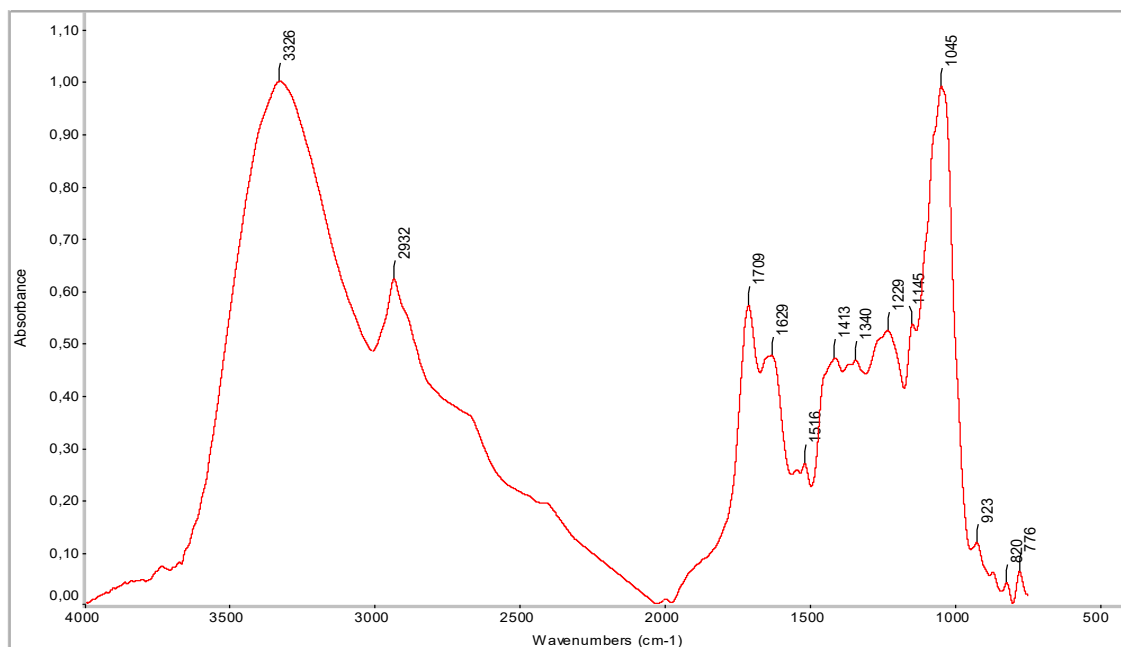
B.5.3.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στο Σχήμα B.5.3.2.1 παρατίθεται το ATR-FTIR φάσμα του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος, και στον Πίνακα B.5.3.2.1 καταγράφονται οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος με τις αντίστοιχες αποδόσεις τους.

Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα 776 cm^{-1} και 820 cm^{-1} θεωρείται πως μπορούν να συσχετιστούν με τις δονήσεις παραμόρφωσης και τάσης του C–H των αρωματικών δακτυλίων των φαινολικών ενώσεων, αντίστοιχα, ενώ η κορυφή στα 2932 cm^{-1} υποστηρίζεται πως οφείλεται σε δονήσεις τάσης του C–H των ομάδων CH_2 και CH_3 των φαινολικών συστατικών (Da Silva, Prasniewski, Calegari, de Lima, & Oldoni, 2018). Επιπλέον, η κορυφή που εντοπίστηκε στα 923 cm^{-1} υποστηρίζεται προέρχεται από δόνηση τάσης του C–H των αρωματικών δακτυλίων των φαινολικών συστατικών (Grasel, Ferrão, & Wolf, 2016).

Σύμφωνα με τον Socrates (2001) οι κορυφές που εντοπίστηκαν στα 1229 cm^{-1} και 1340 cm^{-1} , αποδίδονται σε δονήσεις τάσης του C–O συνδυαστικά με δονήσεις παραμόρφωσης του O–H των φαινολικών συστατικών, ενώ η ευρεία και ισχυρή κορυφή στα 3326 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση τάσης του O–H των φαινολικών ενώσεων και νερού. Σημειώνεται πως η ύπαρξη του νερού δικαιολογείται, καθώς δεν απομακρύνθηκε εξ ολοκλήρου με τη χρήση του περιστρεφόμενου εξατμιστήρα κενού.

Η ισχυρή κορυφή που εμφανίστηκε στα 1045 cm^{-1} , καθώς και η κορυφή στα 1145 cm^{-1} , αποδίδονται από τους Masek, Chrzescijanska, Kosmalska και Zaborski, (2014) και Tahir et al. (2017), σε δονήσεις τάσης του C–O των φαινολικών συστατικών, ενώ η κορυφή που παρατηρήθηκε στα 1629 cm^{-1} , θεωρείται πως προέρχεται από τη δόνηση τάσης των καρβονυλικών ομάδων (C=O) και C=C των φαινολικών ενώσεων (Tahir et al., 2017· Da Silva et al., 2018). Επίσης, όπως αναφέρεται από τους (Darabdhara et al., 2016), η κορυφή, που παρατηρήθηκε, στα 1516 cm^{-1} , οφείλεται στην τάση του C=C του αρωματικού δακτυλίου των φαινολικών ενώσεων, ενώ στα 1709 cm^{-1} , βρίσκεται η κορυφή τάσης για το C=O και στα 1413 cm^{-1} η δόνηση κάμψης του C–O–H των φαινολικών.



Σχήμα B.5.3.2.1. Φάσμα ATR – FTIR μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Πίνακας Β.5.3.2.1. Οι βασικές κορυφές του φάσματος ATR – FTIR του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Λειτουργική ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης
~3326	O-H	Νερό, φαινολικά	Τάση
~2932	C-H	Καρβονυλικές ομάδες των φαινολικών	Τάση
~1709	C=O	Φαινολικά	Τάση
~1629	C=O, C=C	Αρωματικός δακτύλιος των φαινολικών	Τάση
~1516	C=C	Αρωματικός δακτύλιος των φαινολικών	Τάση
~1413	C-O-H, -CH ₂ , C-H	Φαινολικά	Κάμψη
~1340	O-H	Φαινολικά	Παραμόρφωση
	C-O		Τάση
~1229	O-H	Φαινολικά	Παραμόρφωση
	C-O		Τάση
~1145	C-O	Φαινολικά	Τάση
~1045	C-O(C-OH), C-O	Φαινολικά	Τάση
~923	C-H	Αρωματικοί δακτύλιοι των φαινολικών	Παραμόρφωση
~820	C-H	Αρωματικοί δακτύλιοι των φαινολικών	Τάση
~776	C-H	Αρωματικοί δακτύλιοι των φαινολικών	Παραμόρφωση

B.5.3.3. Συμπεράσματα

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας ATR – FTIR για τη μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς αποδόθηκε με άμεσο και απλό τρόπο μία αρχική προσέγγιση του προφίλ του μεθανολικού εκχυλίσματος σε φαινολικές ενώσεις. Ιδιαίτερα χαρακτηριστική εμφανίστηκε η κορυφή στα 3326 cm^{-1} που αντιστοιχίστηκε σε δόνηση τάσης της υδροξυλικής ομάδας των φαινολικών ενώσεων και του νερού.

B.5.4. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά με τη δοκιμή Folin – Ciocalteu

Στον παρόν κεφάλαιο, περιγράφονται τα βήματα της δοκιμής Folin – Ciocalteu που ακολουθήθηκαν, για να προσδιορισθεί η περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος από το δείγμα μελιού βελανιδιάς.

B.5.4.1. Πειραματική πορεία

Για την πραγματοποίηση της δοκιμής, αρχικά, παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα Folin – Ciocalteu 0,2 M. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν 7,5 g ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, όπου προστέθηκε απιονισμένο νερό έως τη χαραγή. Από το αποθηκευμένο, σε συνθήκες κατάψυξης, διάλυμα (μεθανολικό εκχύλισμα) έγινε αραίωση με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 2 mL και προέκυψε το διάλυμα 0,05 mL μεθανολικού εκχυλίσματος/mL διαλύματος. Σε περιέκτη τοποθετήθηκαν 400 μL διαλύματος που προέκυψε από την παραπάνω αραίωση, 100 μL απιονισμένου νερού και 2,5 mL διαλύματος Folin – Ciocalteu 0,2 M. Μετά από 5 min, προστέθηκαν 2 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Ακολούθησε έντονη ανάδευση του περιεχομένου του περιέκτη σε Vortex και τοποθέτηση των περιεκτών σε σκοτεινό μέρος για 1,5 h. Κάθε 30 min γινόταν εκ νέου ανάδευση στη συσκευή Vortex. Αντίστοιχα, για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά πως στον περιέκτη αντί για 400 μL διαλύματος, που προέκυψε από αραίωση του δείγματος, τοποθετήθηκαν 400 μL μεθανόλης. Η απορρόφηση μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο UV – VIS (VWR, μοντέλο V – 1200) στα 765 nm. Ο μηδενισμός της απορρόφησης του οργάνου έγινε με το τυφλό διάλυμα. Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν με τρεις επαναλήψεις.

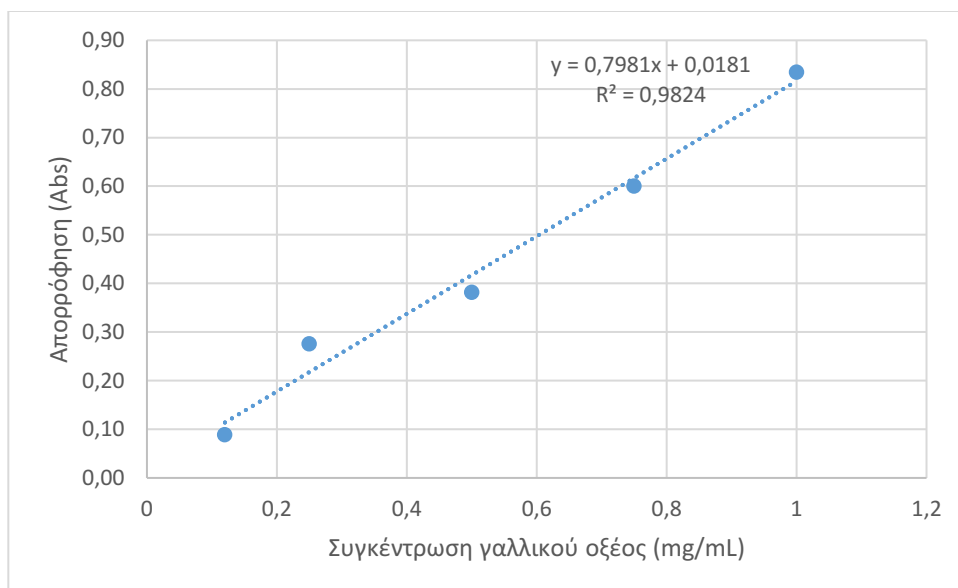


Εικόνα B.5.4.1.1. Αραιωμένο διάλυμα μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος (περιεκτικότητα 0,05 mL /mL) έπειτα από προσθήκη των αντιδραστηρίων της δοκιμής Folin – Ciocalteu και παραμονή σε σκοτεινό μέρος, σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα.

Προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη βαθμονόμησης με βάση το γαλλικό οξύ, παρασκευάστηκε διάλυμα γαλλικού οξέος σε μεθανόλη (μητρικό διάλυμα) με συγκέντρωση 1 mg/mL. Έπειτα, με αραιώσεις, σε τελικό όγκο 2 mL, παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων: 0,012, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1 mg/mL. Για καθεμία εκ των συγκεντρώσεων αυτών εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία: σε περιέκτη προστέθηκαν 400 μ L διαλύματος, 100 μ L απιονισμένου νερού, 2,5 mL διαλύματος Folin – Ciocalteu 0,2 M και, μετά από 5 min, προστέθηκαν 2 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Ακολούθως, αναδεύθηκαν τα μίγματα σε συσκευή Vortex και οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 1,5 h. Ανά 30 min πραγματοποιείται εκ νέου ανάδευση στη συσκευή Vortex. Για καθεμία από τις αραιώσεις έγιναν τρεις επαναλήψεις. Η απορρόφηση μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο στα 765 nm.

Το περιεχόμενο του μεθανολικού εκχυλίσματος σε φαινολικά συστατικά προσδιορίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Αρχικά, οι φαινολικές ενώσεις υπολογίστηκαν σε mg γαλλικού οξέος ανά mL εκχυλίσματος και έπειτα, εκφράστηκαν σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE) ανά g δείγματος μελιού βελανιδιάς.

$$A_{\text{Folin-Ciocalteu}} = (0,7981 \times \text{GAE}) + 0,0181, R^2 = 0,9824 \text{ (Εξίσωση B.5.4.1.1)}$$



Σχήμα Β.5.4.1.1. Καμπύλη βαθμονόμησης πρότυπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος.

Β.5.4.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας τη δοκιμή Folin – Ciocalteu, προσδιορίστηκε πως το περιεχόμενο του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς σε φαινολικά συστατικά εκφράζεται ως 42,2 mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος ανά 100 g μελιού.

Συγκρίνοντας την τιμή του περιεχόμενου σε φαινολικά, που παρατηρήθηκε στο παρόν πείραμα για το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού βελανιδιάς, σε σχέση με τα μεθανολικά εκχυλίσματα διαφόρων δειγμάτων ισπανικών μελιών, διαπιστώθηκε πως υπερτερεί σημαντικά. Συγκεκριμένα, σε έρευνα των Alevia et al. (2021) 15 δειγμάτων μελιού μελιτωμάτων και ανθέων (*Echium sp.*, *Calluna vulgaris*, *Genista sp.*) από την Ισπανία τα ολικά φαινολικά στα δείγματα ακατέργαστου μελιού κυμαίνονται μεταξύ 24 και 242 mg GA/100 g, ενώ στα μεθανολικά εκχυλίσματα η διακύμανση ήταν μεταξύ 4,9 και 25 mg GA/100 g. Σημειώνεται πως, όπως αναμενόταν, παρουσιάζονται, στην παραπάνω μελέτη, υψηλότερες τιμές συνολικών φαινολικών στα ακατέργαστα μέλια συγκριτικά με τα αντίστοιχα μεθανολικά εκχυλίσματά τους.

Είναι σημαντικό, παράλληλα, να αναφερθεί πως σε έρευνα για την αξιολόγηση του φαινολικού περιεχομένου 64 ακατέργαστων μελιών μελιτωμάτων διαφορετικής βοτανικής προέλευσης χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα μέλια βελανιδιάς εμφάνισαν την υψηλότερη τιμή ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά (119 – 160 mg GAE/100 g μελιού), ενώ τα μέλια της λευκής

ελάτης και των κωνοφόρων σημείωσαν χαμηλότερες τιμές (61 και 57 mg GAE/100 g μελιού, αντίστοιχα) (Vasić et al., 2018). Επίσης, οι Jara-Palacios et al. (2019) εξέτασαν 59 δείγματα μελιού βελανιδιάς που συλλέχθηκαν από επαρχίες της Ισπανίας και αναφέρουν πως όλα τα δείγματα παρουσίασαν υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 50,04 και 243,86 mg GAE/100 g μελιού.

B.5.4.3. Συμπεράσματα

Η τιμή της περιεκτικότητας σε μεθανολικά φαινολικά συστατικά, που προσδιορίστηκε με τη δοκιμή Folin – Ciocalteu για το δείγμα, εμφανίστηκε υψηλή. Αξίζει να επισημανθεί πως η απόκλιση στην τιμή της περιεκτικότητας σε φαινολικά του παρόντος πειράματος, συγκριτικά με άλλες μελέτες, όπως οι αναφερόμενες ενδεικτικά, θεωρείται αναμενόμενη, καθώς εστιάζουν σε αναλύσεις μελιών κι όχι στο μεθανολικό εκχύλισμα αυτών.

B.5.5. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας δείγματος μελιού βελανιδιάς με εφαρμογή των δοκιμών DPPH και ABTS

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται οι δοκιμές DPPH και ABTS που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιορισθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

B.5.5.1. Δοκιμή DPPH

Πειραματική πορεία

Από το αποθηκευμένο σε συνθήκες κατάψυξης διάλυμα (μεθανολικό εκχύλισμα) ελήφθησαν συγκεκριμένες ποσότητες οι οποίες αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 2 mL, ώστε να προκύψουν τα διαλύματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα B.5.5.1.1.

Πίνακας B.5.5.1.1. Περιεκτικότητες διαλυμάτων που προέκυψαν από αραιώση του δείγματος (mL δείγματος/mL διαλύματος).

Περιεκτικότητα (Vδείγματος/Vδιαλύματος)
0,05
0,125
0,25
0,5
0,75

Με τη χρήση αναλυτικού ζυγού ακριβείας ζυγίστηκαν 3,2 mg DPPH και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, όπου αραιώθηκαν με την προσθήκη μεθανόλης έως τη χαραγή. Έπειτα, σε περιέκτη τοποθετήθηκαν 4 mL διαλύματος DPPH (τυφλό), ενώ σε άλλον περιέκτη έγινε ανάμιξη 100 μ L δείγματος και 4 mL διαλύματος DPPH. Μετά από την έντονη ανάδευση του μίγματος για 30 s σε Vortex, οι περιέκτες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 30 min. Οι απορροφήσεις του τυφλού και των διαλυμάτων, διαφορετικών περιεκτικότητων δείγματος,

μετρήθηκαν στα 515 nm με τη χρήση φασματοφωτομέτρου UV – VIS (VWR, μοντέλο V – 1200), αφού είχε προηγηθεί μηδενισμός της απορρόφησης του οργάνου με μεθανόλη. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

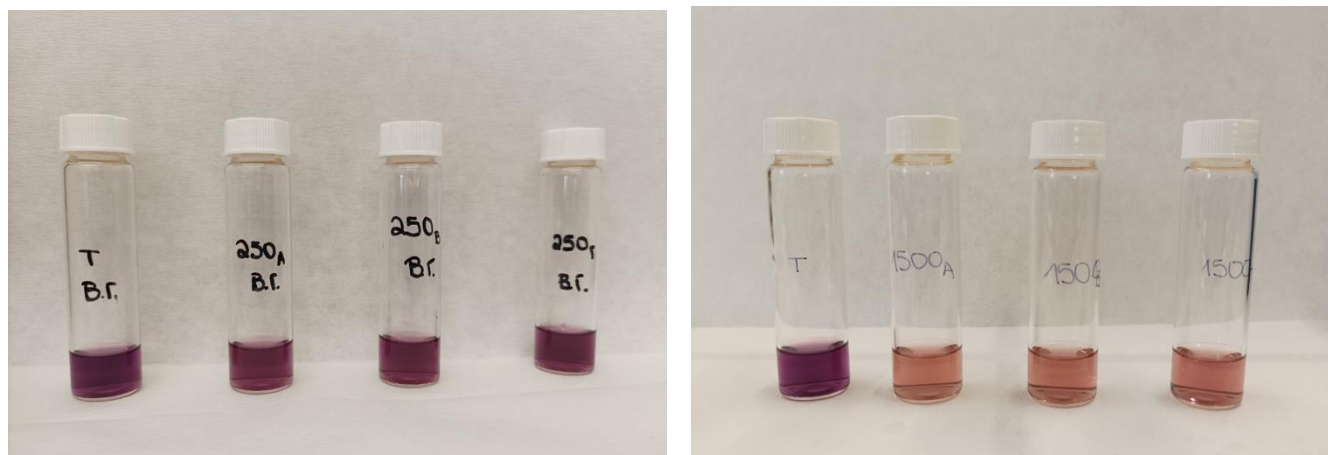
Για τον υπολογισμό του ποσοστού παρεμποδιστικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση B.5.5.1.1 και έτσι υπολογίστηκε το IC₅₀.

$$I\% = \frac{A_{515 \text{ τυφλό}} - A_{515 \text{ δείγμα}}}{A_{515 \text{ τυφλό}}} * 100 \text{ (Εξίσωση B.5.5.1.1),}$$

όπου I%: το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης της ελεύθερης ρίζας,

A₀: η απορρόφηση του τυφλού στα 515 nm,

A: η απορρόφηση του δείγματος στα 515 nm.



Εικόνα B.5.5.1.1. Ενδεικτικά διαλύματα που προέκυψαν από αραιώση του δείγματος με περιεκτικότητες 0,125 mL /mL (δεξιά) και 0,75 mL /mL (αριστερά) έπειτα από αντίδραση με τη ρίζα DPPH, σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα.

B.5.5.2. Δοκιμή ABTS

Πειραματική πορεία

Για τη δοκιμή ABTS έγινε χρήση φασματοφωτομέτρου UV – VIS, VWR, μοντέλο V – 1200. Αρχικά, ζυγίστηκαν 96 mg ABTS και προστέθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL, όπου αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή. Παράλληλα, 37,9 mg K₂S₂O₈ διαλύθηκαν σε 1

mL απιονισμένου νερού. Από το διάλυμα που προέκυψε ελήφθησαν 440 μ L και προστέθηκαν στο διάλυμα του ABTS. Το μείγμα που προέκυψε, διατηρήθηκε σε σκοτεινό χώρο για 18 h, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C), ώστε να σταθεροποιηθεί. Προτού χρησιμοποιηθεί το διάλυμα, διενεργήθηκε αραιώσή του με μεθανόλη έως ότου η τιμή της απορρόφησής του, στα 734 nm, γίνει $0,700 \pm 0,005$.

Από το αποθηκευμένο σε συνθήκες κατάψυξης διάλυμα (μεθανολικό εκχύλισμα) έγιναν αραιώσεις σε τελικό όγκο 2 mL και προέκυψαν έξι διαλύματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα B.5.5.2.1.

Πίνακας B.5.5.2.1. Περιεκτικότητες διαλυμάτων που προέκυψαν από αραιώση του δείγματος (mL δείγματος/mL διαλύματος).

Περιεκτικότητα (Vδείγματος/Vδιαλύματος)
0,025
0,050
0,10
0,20
0,25
0,30

Σε περιέκτη τοποθετήθηκαν 2 mL διαλύματος ABTS αραιωμένου με μεθανόλη (τυφλό), ενώ σε άλλον περιέκτη αναμίχθηκαν 100 μ L από κάθε διάλυμα που προέκυψε από αραιώση του δείγματος και 2 mL διαλύματος ABTS αραιωμένου με μεθανόλη. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος για 30 s σε συσκευή Vortex και τοποθέτηση των περιεκτών σε σκοτεινό μέρος για 6 min. Οι απορροφήσεις του τυφλού και των διαλυμάτων με διαφορετικές περιεκτικότητες δείγματος μετρήθηκαν στα 734 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο UV – VIS, αφού είχε προηγηθεί μηδενισμός της απορρόφησης του οργάνου με μεθανόλη. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση B.5.5.2.1 και έτσι υπολογίστηκε το IC₅₀.

$$I\% = \frac{A_{734 \text{ τυφλό}} - A_{734 \text{ δείγμα}}}{A_{734 \text{ τυφλό}}} * 100 \text{ (Εξίσωση B.5.5.2.1),}$$

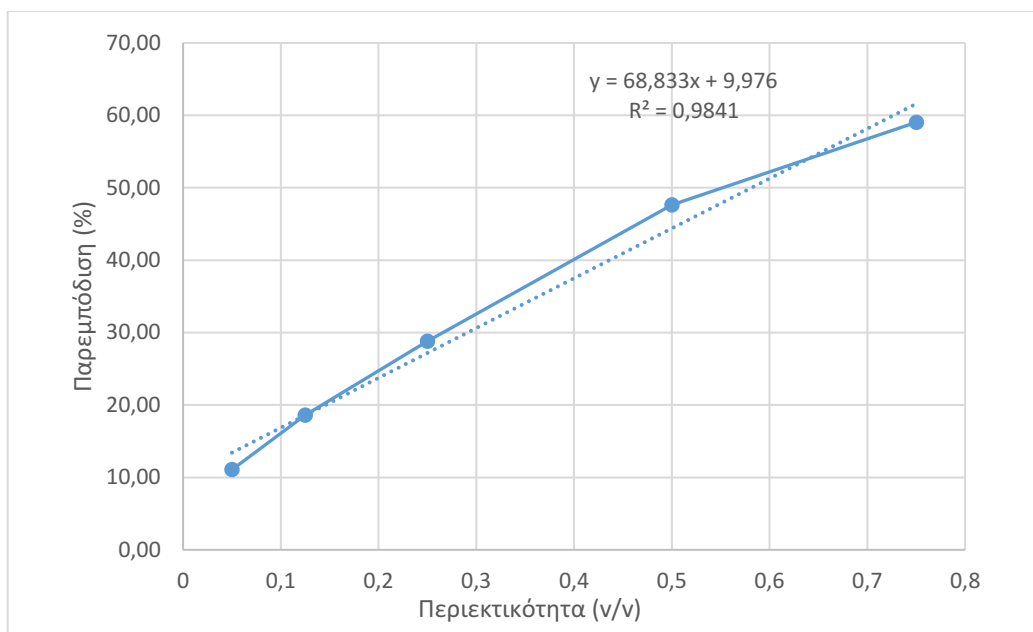
όπου I%: το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης της ελεύθερης ρίζας,

A₀: η απορρόφηση του τυφλού στα 734 nm,

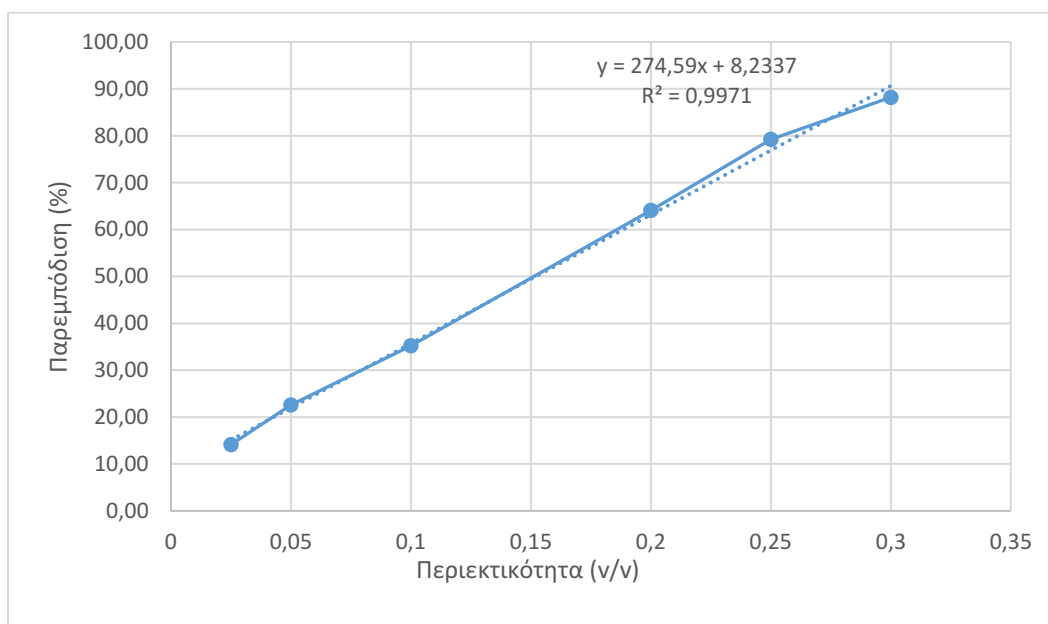
A: η απορρόφηση του δείγματος στα 734 nm.

B.5.5.3. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στα Σχήματα B.5.5.3.1 και B.5.5.3.2 αποτυπώνεται το ποσοστό της παρεμποδιστικής δράσης των ελευθέρων ριζών DPPH και ABTS, που υπολογίστηκε, από το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού βελανιδιάς στις διάφορες αραιώσεις. Σημειώνεται πως η τιμή IC₅₀ αντιπροσωπεύει τη δέσμευση του 50% της ρίζας DPPH ή ABTS από το διάλυμα. Οι χαμηλότερες τιμές IC₅₀ υποδεικνύουν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης των ριζών (Kolaylı et al., 2018). Στο παρόν πείραμα, ήταν εμφανής η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος, καθώς οι τιμές των IC₅₀ του εκχυλίσματος για τις δοκιμές DPPH και ABTS υπολογίστηκαν 0,039 mL εκχυλίσματος/g μελιού και 0,010 mL εκχυλίσματος/g μελιού, αντίστοιχα. Διαπιστώνεται πως το εκχύλισμα παρουσιάζει μικρότερο IC₅₀ με τη δοκιμή του ABTS. Συμπεραίνεται, επομένως, πως οι υδατοδιαλυτές ενώσεις του εκχυλίσματος είναι πιο δραστικές, καθώς υποστηρίζεται πως τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά αποτυπώνονται καλύτερα με τη δοκιμή ABTS σε σχέση με τη δοκιμή DPPH (Floegel et al., 2011). Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί αποτελέσματα μέσω της ίδιας μεθόδου, που ακολουθήθηκε, σε δημοσιευμένες μελέτες, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ακριβής σύγκριση των αποτελεσμάτων.



Σχήμα B.5.5.3.1. Ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας DPPH από το μεθανολικό εκχύλισμα δείγματος μελιού βελανιδιάς.



Σχήμα B.5.5.3.2. Ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας ABTS από το μεθανολικό εκχύλισμα δείγματος μελιού βελανιδιάς.

Όπως έχει παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες, τα πιο σκούρα μέλια, όπως το μέλι βελανιδιάς, έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε ολικά

φαινολικά συστατικά (Pita-Calvo & Vázquez, 2018). Σε μελέτη ελληνικών μελιών από τον Ταΰγετο και την Πίνδο, διαπιστώθηκε πως το μείγμα μελιού βελανιδιάς – δάσους είχε την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, ακολουθούμενο από το μέλι μείγμα ελάτης – βανίλιας και το μέλι βελανιδιάς, συγκριτικά με μέλια ανθέων, σύμφωνα με τη δοκιμή DPPH (Patouna, Vardakas, Skaperda, Spandidos, & Kouretas, 2023). Οι Kolayli et al. (2018) σε έρευνα μελιών βελανιδιάς της Τουρκίας παρατήρησαν, επίσης, υψηλή δεσμευτική δράση των ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DPPH, τα IC₅₀ των δειγμάτων υπολογίστηκαν μεταξύ 8,09 ± 0,17 mg/mL και 27,89 ± 0,66 mg/mL.

Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση του μελιού βελανιδιάς έχει αποδειχτεί, επιπλέον, και σε μελέτη κατά την οποία, μέσω της δοκιμής DPPH, έγινε σύγκριση με άλλα είδη μελιών, όπως καστανιάς, ερείκης, πεύκου (Can et al., 2015). Παράλληλα, στην έρευνα των Sahin et al. (2019) διαπιστώθηκε, με τη χρήση των δοκιμών DPPH και ABTS, πως το μέλι βελανιδιάς έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα μέλια καστανιάς και ροδόδεντρου. Σε μελέτη που εξετάστηκαν 59 διαφορετικά δείγματα μελιού βελανιδιάς τα οποία συλλέχθηκαν από διαφορετικές επαρχίες της Ισπανίας υποστηρίζεται πως τα ληφθέντα αποτελέσματα δείχνουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση, που θα μπορούσε να σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα σε φαινολικά (Jara-Palacios et al., 2019).

B.5.5.4. Συμπεράσματα

Η υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα του παρόντος δείγματος μεθανολικού εκχυλίσματος μελιού βελανιδιάς, που διαφαίνεται από τα αποτελέσματα των δοκιμών DPPH και ABTS, έχει επιβεβαιωθεί για δείγματα μελιού βελανιδιάς, σύμφωνα με μελέτες (Kolayli et al., 2018· Patouna et al., 2023). Ωστόσο, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για μεθανολικό εκχύλισμα μελιών, ώστε να πραγματοποιηθεί αυτή η επιπρόσθετη σύγκριση από τον παραλληλισμό τους με το υπό μελέτη δείγμα εκχυλίσματος μελιού βελανιδιάς. Αναφορικά με την παρατηρούμενη χαμηλότερη τιμή του IC₅₀ με τη δοκιμή ABTS από την τιμή IC₅₀ με τη δοκιμή DPPH, όπως αναφέρεται από τους Floegel et al. (2011), προκύπτει λόγω της μεγαλύτερης εκλεκτικότητας που εμφανίζει το DPPH σε υδρόφοβα συστήματα.

B.5.6. Εκτίμηση αντιμικροβιακής δράσης δείγματος μελιού βελανιδιάς με εφαρμογή της Μεθόδου των Ζωνών Αναστολής

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η αντιμικροβιακή ικανότητα του μεθανολικού εκχυλίσματος από το δείγμα μελιού βελανιδιάς έναντι μερικών κλασσικών βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, των θετικών κατά Gram στελεχών βακτηρίων *Staphylococcus aureus* B134 και *Bacillus subtilis* B109, και των αρνητικών κατά Gram στελεχών βακτηρίων *Escherichia coli* B16 και *Pseudomonas fluorescens* B29. Από τα επιλεγμένα στελέχη τα *S. aureus* B134 και *E. coli* B16 αποτελούν παθογόνα στελέχη, ενώ τα *B. subtilis* B109 και *P. Fluorescens* B29 αποτελούν αλλοιογόνα στελέχη της μικροχλωρίδας των τροφίμων, με τον τελευταίο να αποτελεί επιπλέον τον πιο συνήθη ψυχρότροφο αλλοιογόνο μικροοργανισμό των τροφίμων (Montville & Matthews, 2022).

B.5.6.1. Πειραματική πορεία

Προετοιμασία Πειράματος

Τα μικροβιολογικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία προήλθαν από τη συλλογή βακτηριακών στελεχών που έχουν απομονωθεί και διατηρούνται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συντήρηση των μικροοργανισμών γίνεται σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C), σε Nutrient broth, με γλυκερόλη σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου για προστασία της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού.

Αρχικά, έγινε ανανέωση των βακτηρίων υπό ασηπτικές συνθήκες. Ελήφθησαν 100 μL κυττάρων από κάθε μικροοργανισμό και προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 mL Tryptone Soy Broth (15 g σε 500 mL απιονισμένου νερού). Η επώαση έγινε στην κατάλληλη για κάθε μικροοργανισμό θερμοκρασία για 24 h (Πίνακας B.5.6.1.1).

Πίνακας B.5.6.1.1. Θερμοκρασία και χρόνος επώασης των επιλεγμένων μικροοργανισμών (Μπαλατσούρας, 2006).

Μικροοργανισμοί	Θερμοκρασία Επώασης (°C)	Χρόνος Επώασης (h)
<i>Staphylococcus aureus</i> B134	37	18 – 24
<i>Bacillus subtilis</i> B109	37	18 – 24
<i>Escherichia coli</i> B16	37	18 – 24
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29	25	24 – 48

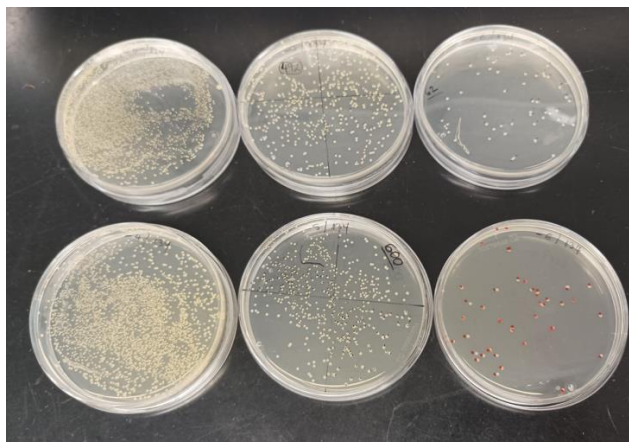
Ακολούθως, προκειμένου να διαπιστωθεί η καθαρότητα και ζωτικότητα των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking), με δύο επαναλήψεις ανά μικροοργανισμό, σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA) (37 g σε 1 L απιονισμένου νερού). Έτσι, μετά την επώαση στις κατάλληλες συνθήκες για τον κάθε μικροοργανισμό (Πίνακας B.5.6.1.1), σχηματίστηκαν μεμονωμένες και ευδιάκριτες αποικίες. Εν συνεχεία, έγινε και δεύτερη ανανέωση των μικροοργανισμών, οπότε ο αναμενόμενος βακτηριακός πληθυσμός ήταν 10^7 με 10^6 CFU/mL.



Εικόνα B.5.6.1.1. Τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA).

Έπειτα, σε ασηπτικές συνθήκες, εκτελέστηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η καταμέτρηση των μικροοργανισμών. Μεταφέροντας 1 mL από το αρχικό πυκνό διάλυμα κυττάρων του εκάστοτε μικροοργανισμού σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 mL Ringer, επιτυγχάνεται η πρώτη δεκαδική αραιώση (10^{-1}). Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις έως την 10^{-6} αραιώση. Στη συνέχεια, έγινε εμβολιασμός 100 μ L από τις αραιώσεις 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , για κάθε μικροοργανισμό σε δύο επαναλήψεις, σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα

TSA με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique). Μετά την επώαση των βακτηρίων για 24 h στην κατάλληλη θερμοκρασία, όπως αναγράφεται στον Πίνακα B.5.6.1.1, έγινε η καταμέτρηση των μικροοργανισμών (Πίνακες B.5.6.1.2 και B.5.6.1.3).



Εικόνα B.5.6.1.2. Καταμέτρηση αποικιών του μικροοργανισμού *Staphylococcus aureus* B134 (αραιώσεις από αριστερά προς τα δεξιά: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).

Πίνακας B.5.6.1.2. Καταμέτρηση θετικών κατά Gram μικροοργανισμών.

(+) κατά Gram στελέχη βακτηρίων			
<i>Staphylococcus aureus</i> B134		<i>Bacillus subtilis</i> B109	
Αραιώσεις	CFU/mL	Αραιώσεις	CFU/mL
10^{-6}	$54 \pm 11,3$	10^{-6}	$0,5 \pm 0,7$
10^{-5}	$546 \pm 76,4$	10^{-5}	$5,5 \pm 0,7$
Πυκνό εμβόλιο	$5,4 \cdot 10^7$	Πυκνό εμβόλιο	$5,5 \cdot 10^5$

Πίνακας B.5.6.1.3. Καταμέτρηση αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών.

(-) κατά Gram στελέχη βακτηρίων			
<i>Escherichia coli</i> B16		<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29	
Αραιώσεις	CFU/mL	Αραιώσεις	CFU/mL
10^{-6}	$208 \pm 11,3$	10^{-6}	$53 \pm 14,1$
10^{-5}	$792 \pm 67,9$	10^{-5}	$356 \pm 135,7$
Πυκνό εμβόλιο	$7,9 \cdot 10^7$	Πυκνό εμβόλιο	$3,5 \cdot 10^7$

Όπως φαίνεται από τους Πίνακες B.5.6.1.2 και B.5.6.1.3, τα πυκνά εμβόλια των μικροοργανισμών *S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens* περιείχαν 10^7 CFU/mL, ενώ του *B. subtilis* 10^5 CFU/mL. Έπειτα από προ – πείραμα που διενεργήθηκε, επιλέχθηκε να διερευνηθεί η αντιμικροβιακή δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς και έναντι των παραπάνω πυκνών εμβολίων των μικροοργανισμών, αλλά και έναντι αραιότερων εμβολίων με βακτηριακό πληθυσμό 10^5 CFU/mL. Στην τελευταία περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε η αραιώση 10^{-2} από το αρχικό πυκνό διάλυμα κυττάρων (10^7 CFU/ml) για τους μικροοργανισμούς *S. aureus*, *E. coli* και *P. fluorescens*, ως αραιότερο εμβόλιο.

Μέθοδος Ζωνών Αναστολής

Σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα TSA επιστρώθηκαν 100 μ L εναιωρήματος καθαρής καλλιέργειας από το κάθε βακτήριο και αφήθηκαν να στεγνώσουν. Στο υπόστρωμα κάθε τρυβλίου δημιουργήθηκαν τρία βοθρία διαμέτρου 0,5 cm περίπου, όπου και τοποθετήθηκαν 15 μ L του μεθανολικού εκχυλίσματος από το δείγμα μελιού βελανιδιάς. Η διαδικασία αυτή εκτελέστηκε με τρεις επαναλήψεις. Για κάθε έναν μικροοργανισμό χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμα τρυβλίο ως τυφλό, όπου στα βοθρία τοποθετήθηκε μόνο μεθανόλη, ώστε να εξακριβωθεί αν η μεθανόλη έχει επίδραση στην εξάπλωση των αποικιών. Η επώαση έγινε στις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας – χρόνου για καθένα από τα βακτήρια, όπως αναγράφεται στον Πίνακα B.5.6.1.1. Μετά το πέρας των 24 h, μετρήθηκαν, όπου υπήρχαν, οι ζώνες αναστολής στα τρυβλία.

B.5.6.2. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του μελιού θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μεμονωμένες ή συνεργιστικές επιδράσεις της υψηλής ωσμωτικότητας (Kwakman & Zaat, 2012), της ενζυματικής παραγωγής, κατά την οξείδωση της γλυκόζης, του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Sousa et al., 2016) και της παρουσίας άλλων δευτερευουσών ενώσεων (Güneş, Şahin, Demir, Borum, & Tosunoğlu, 2016). Αρκετοί συγγραφείς έχουν αναφερθεί στην αντιμικροβιακή δράση τόσο του μελιού στο σύνολό του, όσο και μεμονωμένων ενώσεων του (Alvarez-Suarez et al., 2010). Στη μελέτη των Leyva-Jimenez, Lozano-Sanchez, Borrás-Linares, Cadiz-Gurrea και Mahmoodi-Khaledi (2018) αξιολογήθηκε η ευεργετική αυτή ιδιότητα σε πλήρη μέλια, αλλά και σε

απομονωμένα φαινολικά κλάσματα από τα μέλια αυτά, και διαπιστώθηκε πως η πλειονότητα των φαινολικών εκχυλισμάτων εμφάνισε τιμές Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC – Minimum Inhibitory Concentration) ίσες ή υψηλότερες από το πλήρες μέλι.

Στην παρούσα μελέτη, όπου εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών του μεθανολικού εκχυλίσματος δείγματος μελιού βελανιδιάς, παρατηρήθηκε αναστολή ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram στελεχών βακτηρίων: *Escherichia coli* B16 (Εικόνα B.5.6.2.2) και *Pseudomonas fluorescens* B29 (Εικόνα B.5.6.2.3), καθώς και του θετικού κατά Gram *Staphylococcus aureus* B134 (Εικόνα B.5.6.2.4). Συγκεκριμένα, ο μικροοργανισμός *E. coli* αξιολογήθηκε ως ο πιο ευαίσθητος. Αντίθετα, δεν φάνηκε οποιαδήποτε ανασταλτική επίδραση του υπό μελέτη υλικού έναντι του βακτηρίου: *Bacillus subtilis* B109 (Εικόνα B.5.6.2.1). Όπως ήταν αναμενόμενο, το μεθανολικό εκχύλισμα είχε αποτελεσματικότερη δράση στην αναστολή της εξάπλωσης των μικροοργανισμών στα τρυβλία που είχαν επιστρωθεί με το αραιό εμβόλιο, σε σχέση με τα αντίστοιχα των οποίων η επίστρωση είχε γίνει με το πυκνό εμβόλιο.

Πίνακας B.5.6.2.1. Ζώνες αναστολής (σε mm) (n=6).

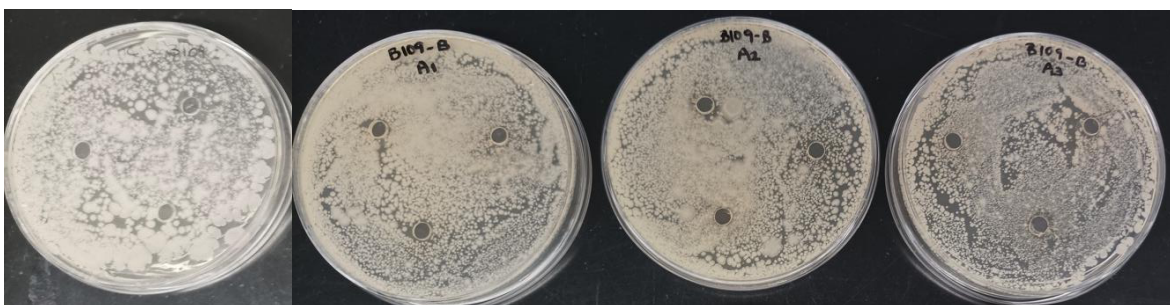
Μικροοργανισμοί	Μέση ζώνη αναστολής ± τυπική απόκλιση (mm)	
	Αραιό εμβόλιο (10 ⁵ CFU/ml)	Πυκνό εμβόλιο (10 ⁷ CFU/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> B134	8,03 ± 0,99	7,56 ± 1,30
<i>Bacillus subtilis</i> B109*	μη αναστολή	μη αναστολή
<i>Escherichia coli</i> B16	9,28 ± 2,37	9,01 ± 1,87
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B29	8,47 ± 0,68	7,78 ± 0,82

*Χρησιμοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις η ίδια συγκέντρωση εμβολίου καθώς το πυκνό δεν ξεπέρασε τα 5.5×10⁵ CFU/ml.

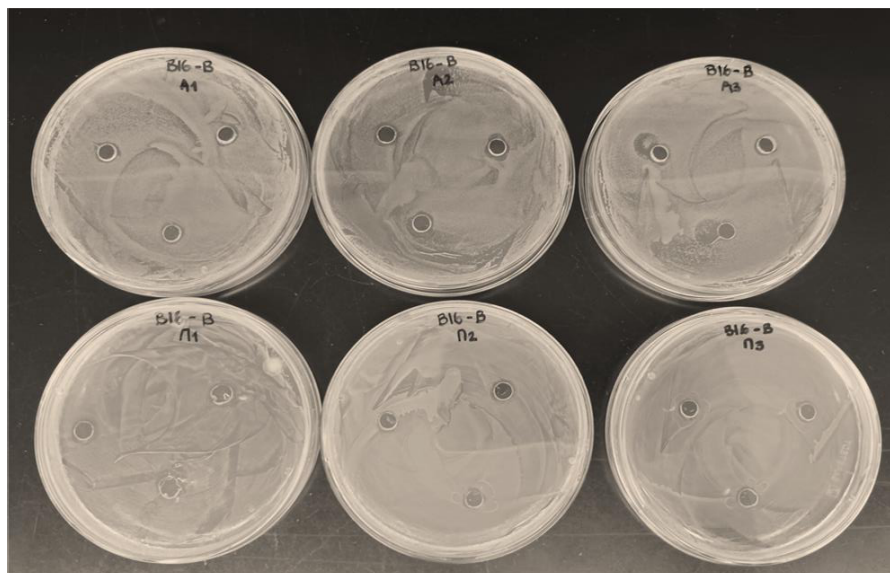
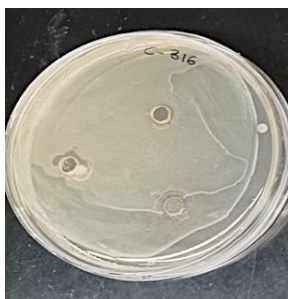
Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα δεδομένα που αναφέρουν οι Bulent και Yildirim (2020) στην έρευνά τους για την αντιμικροβιακή επίδραση των φαινολικών ενώσεων μελιών. Διαπίστωσαν πιο υψηλές αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά του μικροοργανισμού *E. coli* σε σχέση με τον *B. subtilis*. Σε αντιδιαστολή με την παρούσα μελέτη, όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή στην εξάπλωση του *S. aureus*, κατέγραψαν υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι του μικροοργανισμού αυτού. Το βακτήριο *E. coli* έχει χαρακτηριστεί ως λιγότερο ανθεκτικό σε σχέση με το βακτήριο *S. aureus* και στη μελέτη των Leyva-Jimenez et al. (2018) σε

φαινολικά εκχυλίσματα σε μέλια ποικίλων βοτανικών και γεωγραφικών πηγών. Ωστόσο, οι Estevinho et al. (2008) αναφέρουν πως τα θετικά κατά Gram βακτήρια ήταν πιο ευαίσθητα από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια στα φαινολικά εκχυλίσματα πορτογαλικών μελιών.

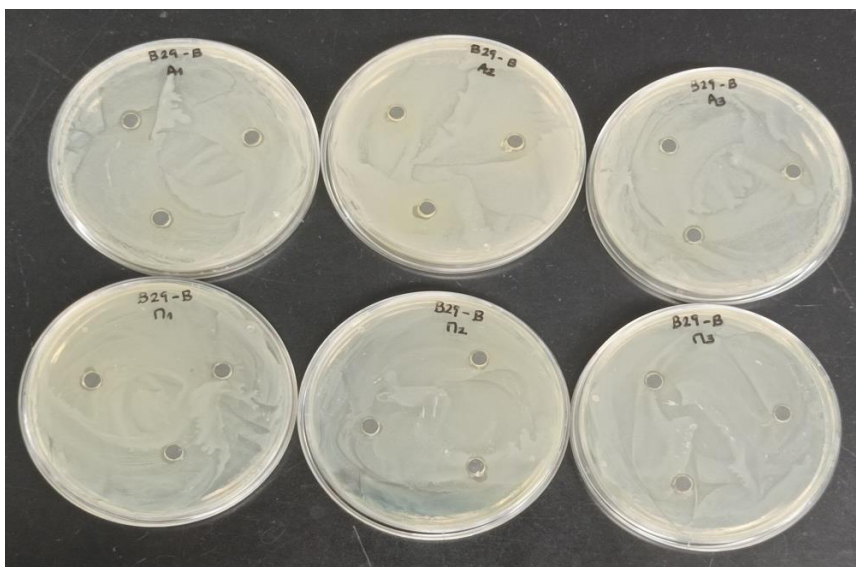
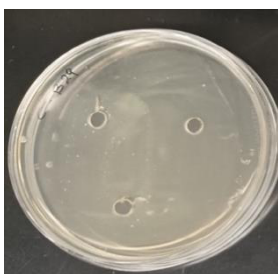
Στο παρόν πείραμα, η εφαρμογή μόνο μεθανόλης δεν επηρέασε την ανάπτυξη κανενός από τους επιλεγμένους μικροοργανισμούς. Οι διαφορές που εντοπίστηκαν, όπως προαναφέρεται, ανάμεσα στα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των φαινολικών ενώσεων του υπό μελέτη δείγματος μελιού έναντι των συγκεκριμένων μικροοργανισμών, σε σχέση με άλλες παρεμφερείς μελέτες, πιθανόν να οφείλονται στη συγκριτικά με αυτές μεγαλύτερη αραίωση του φαινολικού εκχυλίσματος σε μεθανόλη.



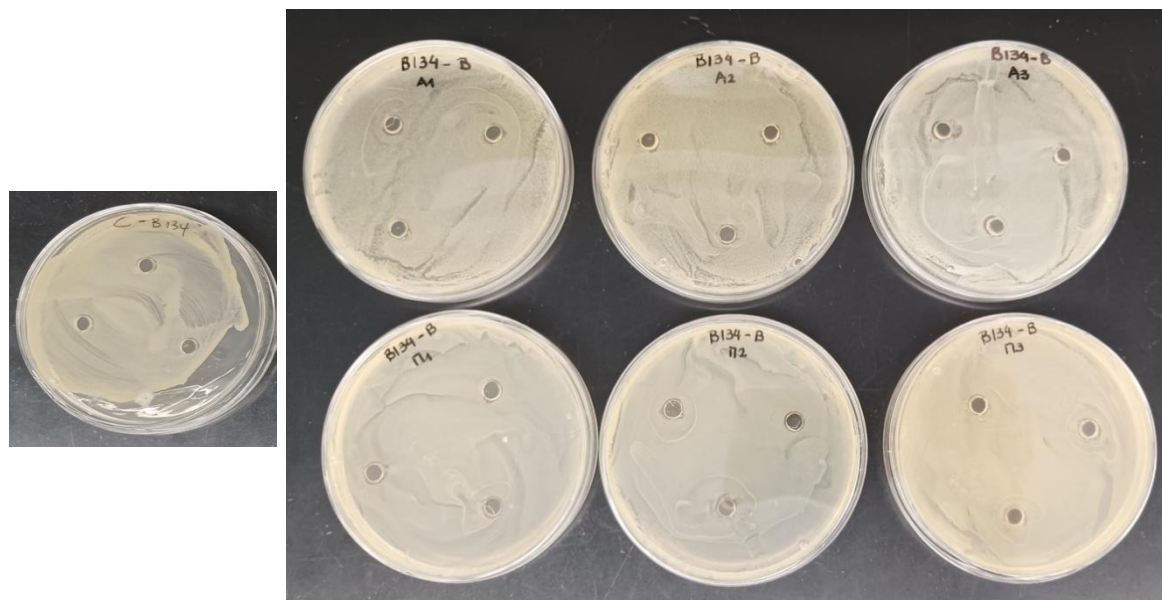
Εικόνα B.5.6.2.1. Απουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα με το στέλεχος *Bacillus subtilis* B109 τρυβλία και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά).



Εικόνα B.5.6.2.2. Παρουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα τρυβλία με αραιό (άνω σειρά) και πυκνό (κάτω σειρά) εμβόλιο του στελέχους *Escherichia coli* B16 και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά).



Εικόνα B.5.6.2.3. Παρουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα τρυβλία με αραιό (άνω σειρά) και πυκνό (κάτω σειρά) εμβόλιο του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* B29 και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά).



Εικόνα B.5.6.2.4. Παρουσία ζωνών αναστολής στα επιστρωμένα τρυβλία με αραιό (άνω σειρά) και πυκνό (κάτω σειρά) εμβόλιο του στελέχους *Staphylococcus aureus* B134 και σύγκριση με το τυφλό (αριστερά).

B.5.6.3. Συμπεράσματα

Στο βακτήριο *E. coli* B16 σημειώθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία από την ανασταλτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς, συγκριτικά με αυτή που εμφανίστηκε στα βακτήρια: *P. fluorescens* B29 και *S. aureus* B134. Αντίθετα, δεν σημειώθηκε κάποια επίδραση στην ανάπτυξη του *B. subtilis* B109. Παρατηρήθηκε, επιπλέον, πως η εφαρμογή της επίστρωσης των τρυβλίων με πυκνότερο εμβόλιο των μικροοργανισμών παρουσίασε μικρότερη αναστολή ανάπτυξης, σε σχέση με την εφαρμογή της επίστρωσης με αραιότερο εμβόλιο. Παράλληλα, εξακριβώθηκε πως η εφαρμογή της μεθανόλης δεν επιδρά στη ανάπτυξη των βακτηρίων. Επομένως, θεωρείται πως η αύξηση της πυκνότητας του μεθανολικού εκχυλίσματος, θα επηρέαζε αυξητικά την ανασταλτική επίδραση έναντι των βακτηρίων.

B.6. Γενικά Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με στόχο τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης δείγματος μελιού βελανιδιάς, ώστε να προστεθούν νέα στοιχεία στη βιβλιογραφία. Επικεντρώθηκε, παράλληλα, στον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου, καθώς και στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και της αντιμικροβιακής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος.

Όπως έχει επισημανθεί η προσεκτική ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για να προσδιοριστεί η βοτανική προέλευση του μελιού συνδυαστικά με τη γυρεοσκοπική ανάλυση, καθώς και την εξέταση άλλων συνήθων φυσικοχημικών παραμέτρων. Γενικότερα, ως δείκτες προτείνονται πτητικές ενώσεις, που είτε υπάρχουν αποκλειστικά σε ορισμένα είδη μελιού, είτε εντοπίζονται σε υψηλή συγκέντρωση σε κάποιο είδος. Μέσω της ανάλυσης GC – MS, που διενεργήθηκε για το παρεληφθέν πτητικό κλάσμα με την τεχνική SPME, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 36 πτητικές ενώσεις, οι οποίες υπάγονται στις χημικές τάξεις των υδρογονανθράκων, αλκοολών, αλδεϋδών, εστέρων, τερπενίων, καρβοξυλικών οξέων, κετονών. Για το παρόν δείγμα, οι κυρίαρχες ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν το ενδεκάνιο και η 1–εννεανόλη, οι οποίες, ωστόσο, έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους μελιών. Αντίθετα, η ένωση 1–δεκανόλη, η οποία εντοπίστηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως δείκτης για το ελληνικό μέλι βελανιδιάς, βάσει της βιβλιογραφίας. Άλλες ενώσεις, που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα σε μικρή ή μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως η 2,3-βουτανοδιόλη και η βενζαλδεϋδη, αντίστοιχα, έχουν προταθεί ως δείκτες ελέγχου της ταυτότητας των μελιών μελιτώματος. Όπως σημειώθηκε, διαπιστώθηκαν αρκετές διαφορές ανάμεσα στις ενώσεις που παρατηρήθηκαν στο υπό μελέτη δείγμα συγκριτικά με αυτές που αναφέρονται στη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Γεγονός που δικαιολογείται, καθώς το είδος των φυτών, η γεωγραφική προέλευση και οι μελισσοκομικές τεχνικές επηρεάζουν τη χημική σύσταση του μελιού. Περισσότερο παρεμφερή με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι τα δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί για δείγματα ελληνικού μελιού βελανιδιάς, αν και ελάχιστα.

Παραλαμβάνοντας μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος με την τεχνική SPE, ελέγχθηκε, μέσω της ανάλυσης LC –QTOF – MS, η παρουσία 31 ενώσεων με τη χρήση προτύπων και ταυτοποιήθηκαν 17 φαινολικές ενώσεις που, όπως διαπιστώθηκε, βρίσκονται σε αντιστοιχία με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για το μέλι βελανιδιάς. Μάλιστα, ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στο

παρόν πείραμα, όπως το πρωτοκατεχικό οξύ, το γαλλικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το καφεϊκό οξύ θεωρούνται χαρακτηριστικές για τον συγκεκριμένο τύπο μελιού. Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν, χωρίς τη χρήση προτύπων, οι ενώσεις: κωνιφερυλική αλδεΐδη, φραζετίνη και η ένωση με μοριακό τύπο $C_{20}H_{26}O_7$. Αξίζει να σημειωθεί πως η φραζετίνη ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε δείγμα μελιού, ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία της σε ξύλο βελανιδιάς και σε πρόπολη.

Για τον προσδιορισμό των βασικών συστατικών του δείγματος μελιού βελανιδιάς, διενεργήθηκε φασματοσκοπική μελέτη ATR – FTIR. Όπως παρατηρήθηκε, καταγράφηκε ένα τυπικό φάσμα μελιού. Συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές των λειτουργικών ομάδων του φάσματος που έχουν συνδεθεί με τις ενώσεις: νερό, σάκχαρα, φαινολικά συστατικά και καρβοξυλικά οξέα. Με επιπλέον ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος δόθηκε μια εικόνα για το συνολικό περιεχόμενό του σε φαινολικά συστατικά.

Η περιεκτικότητα του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος μελιού βελανιδιάς σε φαινολικές ενώσεις προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της δοκιμής Folin – Ciocalteu και τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν υψηλή περιεκτικότητα σε μεθανολικά φαινολικά συστατικά (42,2 mg GAE/100 g μελιού). Ωστόσο, όπως ήταν αναμενόμενο, η τιμή της περιεκτικότητας είναι χαμηλότερη από αυτή που θα αντιστοιχούσε σε δείγμα ακατέργαστου – πλήρους μελιού.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, μέσω των δοκιμών DPPH και ABTS, δείχνουν πως το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος μελιού βελανιδιάς παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, ελλείπει άλλων μελετών σε μεθανολικό εκχύλισμα μελιού, δεν είναι δυνατόν να καταγραφούν συγκριτικά στοιχεία. Σημειώνεται πως διαπιστώθηκε μικρότερη τιμή IC_{50} με τη δοκιμή ABTS συγκριτικά με την τιμή IC_{50} με τη δοκιμή DPPH, γεγονός που αποδίδεται στη μεγαλύτερη επιλεκτικότητα του DPPH σε υδρόφοβα συστήματα.

Από τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος του δείγματος παρουσιάστηκε αναστολή ανάπτυξης των στελεχών βακτηρίων: *Escherichia coli* B16, *Pseudomonas fluorescens* B29, *Staphylococcus aureus* B134, ενώ δεν εμφανίστηκε ανασταλτική επίδραση έναντι του *Bacillus subtilis* B109. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η ισχυρότερη αναστολή της εξάπλωσης των μικροοργανισμών στα τρυβλία με επίστρωση με το αραιότερο εμβόλιο, συγκριτικά με αυτά που είχαν επιστρωθεί με το πυκνότερο εμβόλιο. Επισημαίνεται πως,

ενδεχομένως, με τη χρήση πυκνότερου διαλύματος μεθανολικού εκχυλίσματος, να παρουσιάζονται πιο ισχυρή επίδραση έναντι των βακτηρίων.

B.7. Ερευνητικές προτάσεις

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου να προστεθούν δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με το μέλι βελανιδιάς. Για να δημιουργηθεί μια πληρέστερη βάση δεδομένων για τα πτητικά συστατικά και το φαινολικό προφίλ του μελιού βελανιδιάς προτείνεται να μελετηθούν περισσότερα δείγματα. Επιπλέον, κρίνεται σκόπιμο να διενεργηθούν επιπρόσθετες αναλύσεις για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών εκχυλισμάτων μελιού βελανιδιάς, αλλά και συγκρίσεις ανάμεσά τους, εφόσον ληφθούν δείγματα από διαφορετικές περιοχές του ελλαδικού χώρου. Σημαντικά στοιχεία θα ήταν δυνατόν να ληφθούν και με τη σύγκριση εκχυλισμάτων μελιού βελανιδιάς με εκχυλίσματα διαφόρων μελιών μελιτωμάτων, προερχόμενα από την ελληνική επικράτεια, αναφορικά με την αντιοξειδωτική ικανότητά τους και την αντιμικροβιακή τους δράση.

Βιβλιογραφία

Διεθνής

Alevia, M., Rasines, S., Cantero, L., Sancho, M. T., Fernández-Muiño, M. A., & Osés, S. M. (2021). Chemical extraction and gastrointestinal digestion of honey: Influence on its antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. *Foods*, *10*(6), 1412. Doi:10.3390/foods10061412.

Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Polissiou, M. (2005). Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(1), 91–97. Doi:10.1002/jsfa.1934.

Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(8-9), 2490–2499. Doi:10.1016/j.fct.2010.06.021.

Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *3*(1), 15–23. Doi:10.1007/s12349-009-0051-6.

Anguebes, F., Pat, L., Ali, B., Guerrero, A., Córdova, A. V., Abatal, M., & Garduza, J. P. (2016). Application of multivariable analysis and FTIR - ATR spectroscopy to the prediction of properties in campeche honey. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, *2016*(), 1–14. Doi:10.1155/2016/5427526.

Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2014). Application of ATR-FTIR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, *169*(), 218–223. Doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.138.

Arawwawala, L. D. A. M., & Hewageegana, H. G. S. P. (2017). Health benefits and traditional

uses of honey: A review. *Journal of Apitherapy*, 2(1), 9-14. Doi: 10.5455/ja.20170208043727.

Aurongzeb, M., & Kamran Azim, M. (2011). Antimicrobial properties of natural honey: A review of literature. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 44(3), 118-124.

Bantis, F., Radoglou, K., & Brüggemann, W. (2018). Differential ecophysiological responses to seasonal drought of three co-existing oak species in northern Greece. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 1–7. Doi:10.1080/11263504.2018.14929.

Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105(2), 822–828. Doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.060.

Black, C., Haughey, S. A., Chevallier, O. P., Galvin-King, P., & Elliott, C. T. (2016). A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach. *Food Chemistry*, 210(), 551–557. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.004.

Bianchi, F., Careri, M., & Musci, M. (2005). Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 89(4), 527–532. Doi:10.1016/j.foodchem.2004.03.009.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. Doi:10.1080/07315724.2008.10719745.

Bose, B. (1982). Honey or sugar in treatment of infected wounds? *The Lancet*, 319(8278), 963. Doi:10.1016/S0140-6736(82)91959-6.

Bulent, K., & Yildirim, A. (2020). Determination of the antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of the honey phenolic extract of five different regions of Bingol province. *Journal of Food Science and Technology*, (), –. Doi:10.1007/s13197-020-04783-x.

Burlacu, E., Nisca, A., & Tanase, C. (2020). A comprehensive review of phytochemistry and biological activities of *Quercus* species. *Forests*, 11(9), 904. Doi:10.3390/f11090904.

Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Akyuz Turumtay, E., Silici, S., & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180(), 133–141. Doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.024.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103(2), 601–606. Doi:10.1016/j.foodchem.2006.08.031.

Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4809–4813. Doi:10.1021/jf0604384.

Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 345–358. Doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x.

Cienciosi, D., Forbes-Hernández, T., Afrin, S., Gasparri, M., Reboredo-Rodríguez, P., Manna, P., Zhang, J., Lamas, L. B., Florez, S. M., Toyos, P. A, Quiles, J. L., Giampieri, F, & Battino, M. (2018). Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*, 23(9), 2322. Doi:10.3390/molecules23092322.

Codex Alimentarius (2001). Codex Alimentarius standard for honey 12-1981. *Revised Codex standard for honey. Standards and standard methods*, 11().

Council of the European Union (2002). Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 Relating to Honey. *Official Journal of the European Communities*, 10, 47-52.

Cozzolino, D., Holdstock, M., Damberg, R. G., Cynkar, W. U., & Smith, P. A. (2009). Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: a tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry*, 116(3), 761–765. Doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.022.

Cuevas-Glory L. F., Pino J. A., Santiago L. S., & Sauri-Duch E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032–1043. Doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.068.

Darabdhara, G., Boruah, P. K., Borthakur, P., Hussain, N., Das, M. R., Ahamad, T., Alshehri, S. M., Malgras, V., Wu, K. C.-W., & Yamauchi, Y. (2016). Reduced graphene oxide nanosheets decorated with Au–Pd bimetallic alloy nanoparticles towards efficient photocatalytic degradation of phenolic compounds in water. *Nanoscale*, 8(15), 8276–8287. Doi:10.1039/c6nr00231e.

Da Silva, C., Prasniowski, A., Calegari, M. A., de Lima, V. A., & Oldoni, T. L. C. (2018). Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR–FT-IR spectroscopy and chemometrics. *Food Analytical Methods*, 11(7), 2013–2021. Doi:10.1007/s12161-018-1161-x.

Estevinho, L., Pereira, A., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3774–3779. Doi:10.1016/j.fct.2008.09.062.

European Commission (2021). Honey Market Presentation. *Agriculture and Rural Development*. Retrieved from https://www.apiservices.biz/documents/articles-en/eu_honey_market_presentation.pdf. Accessed on November 30, 2022.

European Commission (2022). Honey Market Presentation. Expert Group for Agricultural

Markets. *Agriculture and Rural Development*. Retrieved from https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2022-04/market-presentation-honey_en_0.pdf. Accessed on November 30, 2022.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 1043–1048. Doi:10.1016/j.jfca.2011.01.008.

Georgouli, K., Martinez Del Rincon, J., & Koidis, A. (2017). Continuous statistical modelling for rapid detection of adulteration of extra virgin olive oil using mid infrared and Raman spectroscopic data. *Food Chemistry*, *217*(), 735–742. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.011.

Grasel, F. dos S., Ferrão, M. F., & Wolf, C. R. (2016). Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *153*, 94–101. Doi:10.1016/j.saa.2015.08.020.

Güneş, M. E., Şahin, S., Demir, C., Borum, E., & Tosunoğlu, A. (2016). Determination of phenolic compounds profile in chestnut and floral honeys and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Biochemistry*, *41*(3), 1–12. Doi:10.1111/jfbc.12345.

Guyot, C., Scheirman, V., & Collin, S. (1999). Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*, *64*(1), 3–11. Doi:10.1016/s0308-8146(98)00122-8.

Habib, H. M., Kheadr, E., & Ibrahim, W. H. (2021). Inhibitory effects of honey from arid land on some enzymes and protein damage. *Food Chemistry*, *364*, 130415. Doi:10.1016/j.foodchem.2021.130415.

Hernanz, D., Jara – Palacios, M. J., Santos, J. L., Heredia, F. J., Pajuelo, A. G. & Terrab, A. (2023). The profile of phenolic compounds by HPLC – MS in Spanish oak (*Quercus*) honeydew honey and their relationships with color and antioxidant activity. *LWT*, *180*(), 114724.

Doi:10.1016/j.lwt.2023.114724.

Himmelsbach, M. (2012). 10 years of MS instrumental developments – Impact on LC–MS/MS in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B*, 883-884(), 1–17.
Doi:10.1016/j.jchromb.2011.11.038.

Hong, Y., Wang, Z., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2021). High-throughput screening and characterization of phenolic compounds in stone fruits waste by LC-ESI-QTOF-MS/MS and their potential antioxidant activities. *Antioxidants*, 10(2), 234.
Doi:10.3390/antiox10020234.

Hope, K. (2022). Honey: The untapped potential of a Greek superfood. *Economia*. Retrieved from <https://www.economia.gr/en/honey-the-untapped-potential-of-a-greek-superfood/>. Accessed on November 30, 2022.

Hroboňová, K., Lehotay, J., Čižmárik, J., & Sádecká, J. (2013). Comparison HPLC and fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36(4), 486–503.
Doi:10.1080/10826076.2012.660724.

Iliá, G., Simulescu, V., Merghes, P., & Varan, N. (2020). The health benefits of honey as an energy source with antioxidant, antibacterial and antiseptic effects. *Science & Sports*, 36(4), 272.e1–272.e10. Doi:10.1016/j.scispo.2020.10.005.

Janoskova, N., Vyviurska, O., & Španik, I. (2014). Identification of volatile organic compounds in honeydew honeys using comprehensive gas chromatography. *Journal of Food and Nutrition*, 53(4), 353–362.

Jara-Palacios, M. J., Ávila, F. J., Escudero-Gilete, M. L., Gómez Pajuelo, A., Heredia, F. J., Hernanz, D., & Terrab, A. (2019). Physicochemical properties, colour, chemical composition, and

antioxidant activity of Spanish *Quercus* honeydew honeys. *European Food Research and Technology*. Doi:10.1007/s00217-019-03316-x.

Jerković, I., Marijanović, Z., Tuberoso, C. I. G., Bubalo, D., & Kezić, N. (2009). Molecular diversity of volatile compounds in rare willow (*Salix spp.*) honeydew honey: Identification of chemical biomarkers. *Molecular Diversity*, *14*(2), 237–248. Doi:10.1007/s11030-009-9164-6.

Karabagias, I. K., Karabagias, V. K., Nayik, G. A., Gatzias, I., & Badeka, A. V. (2022). A targeted chemometric evaluation of the volatile compounds of *Quercus ilex* honey in relation to its provenance. *LWL*, *154*(0), 112588. Doi:10.1016/j.lwt.2021.112588.

Karabagias, I. K., Karabournioti, S., Karabagias, V. K., & Badeka, A. V. (2020). Palynological, physico-chemical and bioactivity parameters determination, of a less common Greek honeydew honey: “dryomelo”. *Food Control*, *109*(0), 106940. Doi:10.1016/j.foodcont.2019.106940.

Kartsonas, E., & Papafotiou, M. (2007). Mother plant age and seasonal influence on in vitro propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *90*(1), 111–116. Doi:10.1007/s11240-007-9232-5.

Kaškonienė, V., & Venskutonis, P. R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(6), 620–634. Doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x.

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3713–3717. Doi:10.1021/jf020071c.

Kolayli, S., Can, Z., Çakir, H. E., Okan, O. T., & Yildiz, O. (2018). An investigation on Trakya region Oak (*Quercus spp.*) honeys of Turkey: their physico-chemical, antioxidant and phenolic compounds properties. *Turkish Journal of Biochemistry*, *43*(4), 362–374. Doi:10.1515/tjb-2017-0174.

Koulis, G. A., Tsagkaris, A. S., Katsianou, P.A., Gialouris, P.-L. P., Martakos, I., Stergiou, F., Fiore, A., Panagopoulou, E. I, Karabourioti, S. Baessmann, C., Borg, N., Dasenaki, M. E., Proestos, C, & Thomaidis, N. S. (2022). Thorough investigation of the phenolic profile of reputable Greek honey varieties: varietal discrimination and floral markers identification using Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *Molecules*, 27(14), 4444. Doi: 10.3390/molecules27144444.

Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *Life*, 64(1), 48–55. Doi:10.1002/iub.578.

Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In R., Apak, E., Capanoglu, F., Shahidi (Ed.). *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (6th chapter, pp. 107–115). New York, USA: John Wiley & Sons Ltd. Doi:10.1002/9781119135388.ch6.

Leyva-Jimenez, F. J., Lozano-Sanchez, J., Borrás-Linares, I., Cadiz-Gurrea, M. L., & Mahmoodi-Khaledi, E. (2018). Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *LWT – Food Science and Technology*,(),1-23. Doi:10.1016/j.lwt.2018.11.015.

Lončar, M., Jakovljević, M., Šubarić, D., Pavlić, M., Buzjak Služek, V., Cindrić, I., & Molnar, M. (2020). Coumarins in food and methods of their determination. *Foods*, 9(5), 645. Doi: 10.3390/foods9050645.

Lopes, I. M. G., & Bernardo-Gil, M. G. (2005). Characterisation of acorn oils extracted by hexane and by supercritical carbon dioxide. *European Journal of Lipid Science and Techonology*, 107(1), 12–19. Doi:10.1002/ejlt.200401039.

Lowag, I. L., Lim, L.-Y., Joshi, R., Hammer, K. A., & Locher, C. (2022). A comprehensive survey of phenolic constituents reported in monofloral honeys around the globe. *Foods*, *11*(8), 1152. Doi: 10.3390/foods11081152.

Machado, A. M., Miguel, M. G., Vilas-Boas, M., & Figueiredo, A. C. (2020). Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—A review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules*, *25*(2), 374. Doi:10.3390/molecules25020374.

Mădaş, N. M., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Bonta, V., Bobiş, O., Fauconnier, M.-L., Francis, F., Haubruge, E., & Nguyen, K. B. (2019). Volatile Profile and Physico-Chemical Analysis of Acacia Honey for Geographical Origin and Nutritional Value Determination. *Foods*, *8*(10), 445. Doi:10.3390/foods8100445.

Masek, A., Chrzescijanska, E., Kosmalska, A., & Zaborski, M. (2014). Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV–VIS, FTIR and GC–MS analysis. *Food Chemistry*, *156*, 353–361. Doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.005.

Moniruzzaman, M., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2014). Assessment of gas chromatography time-of-flight accurate mass spectrometry for identification of volatile and semi-volatile compounds in honey. *Talanta*, *129*, 505–515. Doi:10.1016/j.talanta.2014.06.019.

Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2022). *Μικροβιολογία Τροφίμων* (2η εκδ.) Αθήνα, Ελλάδα: Εκδοτικός Όμιλος ΙΩΝ.

Mouhoubi-Tafnine, Z., Ouchemoukh, S., Bachir bey, M., Louaileche, H., & Tamendjari, A. (2018). Effect of storage on hydroxymethylfurfural (HMF) and color of some Algerian honey. *International Food Research Journal*, *25*(3), 1044-1050.

Nayik, G. A., Dar, B.N., & Nanda, V. (2015). Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India. *Arabian Journal of Chemistry*, (). Doi:10.1016/j.arabjc.2015.08.017.

Nešović, M., Gašić, U., Tosti, T., Trifković, J., Baošić, R., Blagojević, S., Ignjatović, L., & Tešić, Ž. (2020). Physicochemical analysis and phenolic profile of polyfloral and honeydew honey from Montenegro. *RSC Advances*, 10(5), 2462–2471. Doi:10.1039/c9ra08783d.

Oroian, M., Ropciuc, S., Buculei, A., Paduret, S., & Todosi, E. (2016). Phenolic profile of honeydew honey from the North – East part of Romania. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 73(2), 105-110. Doi: 10.15835/buasvmcn-fst:12316.

Pantera, A., Papadopoulou, A., & Papanastasis, V. P. (2018). Valonia oak agroforestry systems in Greece: an overview. *Agroforestry Systems*, 92(4), 921–931. Doi:10.1007/s10457-018-0220-z.

Pasias, I.N., Kiriakou, I.K., & Proestos, C. (2017). HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. *Food Chemistry*, 229(), 425–431. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.084.

Patouna, A., Vardakas, P., Skaperda, Z., Spandidos, D.A., & Kouretas, D. (2023). Evaluation of the antioxidant potency of Greek honey from the Taygetos and Pindos mountains using a combination of cellular and molecular methods. *Molecular Medicine Reports*, 27(), 54. Doi:10.3892/mmr.2023.12941.

Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R. M., & Tadeo, J. L. (2002). Analysis of Volatiles from Spanish Honeys by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2633–2637. Doi:10.1021/jf011551r.

Persano Oddo, L., & Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(1), 38–S81. Doi:10.1051/apido:2004049.

- Petrakis, E. A., & Polissiou, M. G. (2017). Assessing saffron (*Crocus sativus L.*) adulteration with plant-derived adulterants by diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy coupled with chemometrics. *Talanta*, *162*(), 558–566. Doi:10.1016/j.talanta.2016.10.072.
- Pita-Calvo, C., & Vázquez, M. (2016). Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *59*(), 79–87. Doi:10.1016/j.tifs.2016.11.015.
- Pita-Calvo, C., & Vázquez, M. (2018). Honeydew honeys: A review on the characterization and authentication of botanical and geographical origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(11), 2523–2537. Doi:10.1021/acs.jafc.7b05807.
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2021). How does the phenol structure influence the results of the Folin-Ciocalteu assay? *Antioxidants*, *10*(5), 811. Doi:10.3390/antiox10050811.
- Pontes, M., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, *74*(1), 91–103. Doi:10.1016/j.talanta.2007.05.037.
- Popescu, A., Dinu, T. A., Stoian, E., & Serban, V. (2021). Honey production in the European Union in the period 2008 – 2019 – A statistical approach. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*, *21*(2), 461-474.
- Prasain, J. K., Wang, C.-C., Barnes, S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine*, *37*(9), 1324–1350. Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.026.
- Radoglou, K. (1996). Environmental control of CO₂ assimilation rates and stomatal conductance in five oak species growing under field conditions in Greece. *Annales Des Sciences Forestières*, *53*(2-3), 269–278. Doi:10.1051/forest:19960210.

Recklies, K., Peukert, C., Kölling-Speer, I., & Speer, K. (2021). Differentiation of honeydew honeys from blossom honeys and according to their botanical origin by electrical conductivity and phenolic and sugar spectra. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(4), 1329–1347. Doi:10.1021/acs.jafc.0c05311.

Revelou, P. – K., Xagoraris, M., Alissandrakis, E., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2022). Determination of 4(5)-methylimidazole in sugar–amino acid aqueous model systems by UPLC-Q-ToF-MS. *Biology and Life Sciences Forum*, 18(1), 58. Doi: 10.3390/Foods2022-12957.

Rodríguez-Flores, M. S., Escuredo, O., Míguez, M., & Seijo, M. C. (2019). Differentiation of oak honeydew and chestnut honeys from the same geographical origin using chemometric methods. *Food Chemistry*, 297(), 124979. Doi:10.1016/j.foodchem.2019.124.

Rodriguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 467–483. Doi:10.1146/annurev-food-022510-133750.

Root, A. I., (2019). 2018 Annual honey report, bee culture. *The magazine of American Beekeeping*. Retrieved from <https://www.beeculture.com/2018-annual-honey-report>. Accessed on November 30, 2022.

Russell, K. M., Molan, P. C., Wilkins, A. L., Holland, P. T., Wilkins, A. L., & Holland, P. T. (1990). Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 10–13. Doi:10.1021/jf00091a002.

Sahin, H., Kaltalioglu, K., Erisgin, Z., Coskun-Cevher, S., & Kolayli, S. (2019). Protective effects of aqueous extracts of some honeys against HCl/ethanol-induced gastric ulceration in rats. *Journal of Food Biochemistry*. Doi:10.1111/jfbc.13054.

Seijo, M. C., Escuredo, O., & Rodríguez-Flores, M. S. (2019). Physicochemical properties and pollen profile of oak honeydew and evergreen oak honeydew honeys from Spain: A comparative study. *Foods*, 8(4), 126. Doi:10.3390/foods8040126.

Sergiel, I., Pohl, P., & Biesaga, M. (2014). Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 145(), 404–408. Doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.068.

Serra Bonvehí, J., & Ventura Coll, F. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(4), 275–282. Doi:10.1002/jsfa.1308.

Socrates, G. (2001). *Infrared and Raman characteristic group frequencies* (3rd ed.) New York, USA:John Wiley & Sons LTD.

Soria, A. C., González, M., de Lorenzo, C., Martínez-Castro, I., & Sanz, J. (2004). Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry*, 85(1), 121–130. Doi:10.1016/j.foodchem.2003.06.012.

Soria, A. C., Martínez-Castro, I., & Sanz, J. (2003). Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 26(9-10), 793–801. Doi:10.1002/jssc.200301368.

Soria, A. C., Martínez-Castro, I., & Sanz, J. (2009). Study of the precision in the purge-and-trap–gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatile compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3300–3304. Doi:10.1016/j.chroma.2009.01.065.

Sousa, J. M., de Souza, E., Marques, G., Meireles, B., Cordeiro, Â., Gullón, B., Pintado, M. M., & Magnani, M. (2016). Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of

monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Food Research International*, 84(), 61-68. Doi:10.1016/j.foodres.2016.03.012.

Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enriquez, E., Carvalho, C., Villas – Boas, J., Marchini, L., Locatelli, J., Perasano-Oddo, L., Almeida-Muradian, L., Bogdanov, S., & Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia*, 31(), 867–875.

Svečnjak, L., Prđun, S., Rogina, J., Bubalo, D., & Jerković, I. (2017). Characterization of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) nectar-to-honey transformation pathway using ATR-FTIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 232(), 286–294. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.159.

Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X., Wang, S., & Mariod, A. A. (2017). Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, 202–211. Doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.024.

Terzo, S., Mulè, F., & Amato, A. (2020). Honey and obesity-related dysfunctions: A summary on health benefits. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 82(), 1-6. Doi:10.1016/j.jnutbio.2020.1084.

Tewari, J., & Irudayaraj, J. (2004). Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier Transform Infrared Microattenuated Total Reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3237–3243. Doi:10.1021/jf035176+.

Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 63–106. Doi:10.1007/10_2014_295.

Thrasyvoulou, A., Tananaki, C., Goras, G., Karazafiris, E., Dimou, M., Liolios, V., Kanelis, D., & Gounari, S. (2017). Legislation of honey criteria and standards. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 88–96. Doi:10.1080/00218839.2017.141111.

Trautvetter, S., Koelling-Speer, I., & Speer, K. (2009). Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie*, 40(2), 140–150. Doi:10.1051/apido/2008072.

Urbaniak-Domagala, W. (2012). The use of the spectrometric technique FTIR – ATR to examine the polymers surface. In M., Akhyar – Farrukh (Ed.). *Advanced Aspects of Spectroscopy* (3th chapter, pp. 85–106). Rijeka, Croatia:InTech.

Valand, R., Tanna, S., Lawson, G., & Bengtström, L. (2019). A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–20. Doi:10.1080/19440049.2019.16759.

Valasi, L., Kokotou, M. G., & Pappas, C. S. (2021). GC-MS, FTIR and Raman spectroscopic analysis of fatty acids of *Pistacia vera* (Greek variety “Aegina”) oils from two consecutive harvest periods and chemometric differentiation of oils quality. *Food Research International*, 148, 110590. Doi:10.1016/j.foodres.2021.110590.

Valasi, L., & Pappas, C. S. (2021). Chemometric differentiation of pistachios (*Pistacia vera*, Greek ‘Aegina’ variety) from two different harvest years using FTIR spectroscopy and DRIFTS and disk techniques. *AppliedChem*, 1(1), 62-74. Doi:10.3390/appliedchem1010006.

Vasić, V., Gašić, U., Stanković, D., Lušić, D., Vukić-lušić, D., Milojković-opšenica, D., Tešić, Ž., & Trifković, J. (2018). Towards better quality criteria of European honeydew honey: phenolic profile and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 274(), 629-641. Doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.045.

Vinha, A. F., Barreira, J. C. M., Costa, A. S. G., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). A new age for *Quercus spp.* fruits: review on nutritional and phytochemical composition and related biological activities of acorns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 947–981. Doi:10.1111/1541-4337.12220.

Vinha, A. F., Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Therapeutic, phytochemistry, and pharmacology of acorns (*Quercus* nuts): A review. *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts*, 1–15. Doi:10.1007/978-3-030-06120-3_4.

Xagoraris, M., Chrysoylaki, F., Revelou, P.-K., Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., & Pappas, C. S. (2021). Unifloral autumn heather honey from indigenous Greek *Erica manipuliflora* Salisb.: SPME/GC-MS characterization of the volatile fraction and optimization of the isolation parameters. *Foods*, 10, 2484. Doi: 10.3390/foods10102487.

Xagoraris, M., Revelou, P.-K., Dedegkika, S., Kanakis, C. D., Papadopoulos, G. K., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2021). SPME-GC-MS and ATR-FTIR spectroscopic study as a tool for unifloral common Greek honeys' botanical origin identification. *Applied Sciences*, 11(7), 3159. Doi:10.3390/app11073159.

White, J.W. 1992. Honey. In: J.M. Graham (ed.). *The Hive and the Honey Bee*. Hamilton. Illinois U.S.A.: Dadant & Sons. pp.1324.

Winstel, D., Gautier, E., & Marchal, A. (2020). Role of oak coumarins in the taste of wines and spirits: identification, quantitation, and sensory contribution through perceptive interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Doi:10.1021/acs.jafc.0c02619.

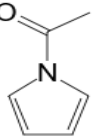
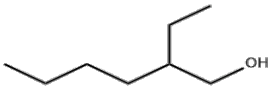
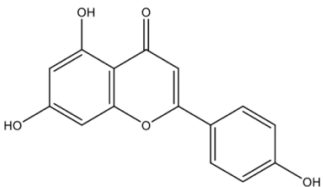
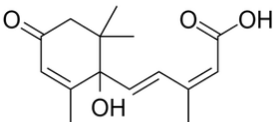
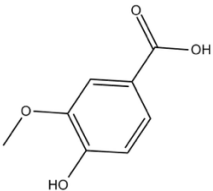
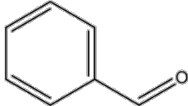
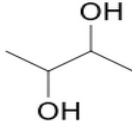
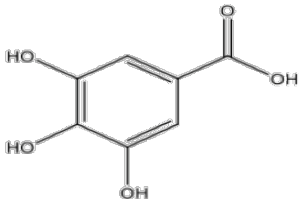
Ελληνική

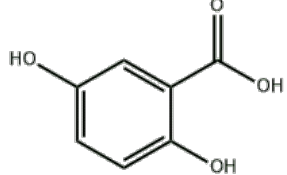
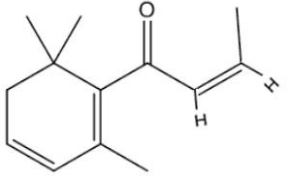
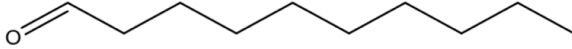

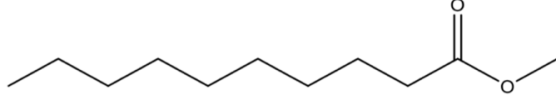


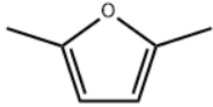
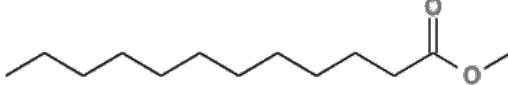
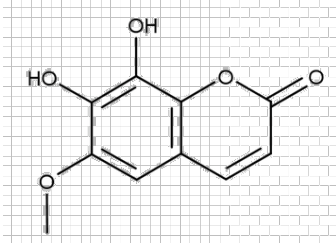
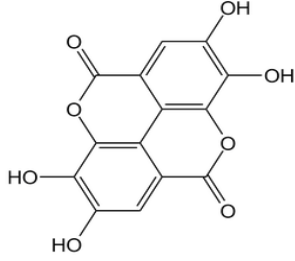
Μπαλατσούρας, Γ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα, Ελλάδα: Έμβρυο.

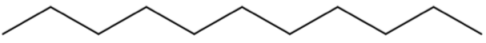

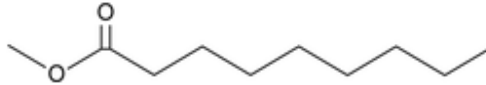

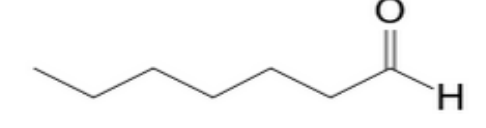
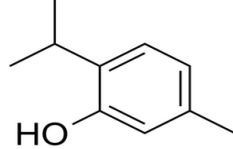
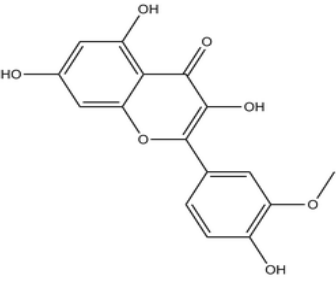
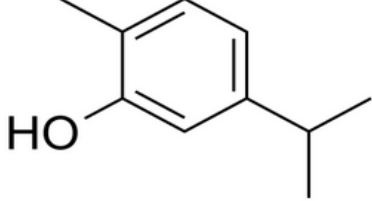
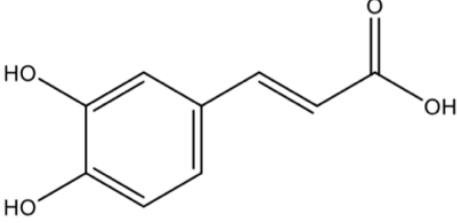
Χαριζάνης, Π. (2017). *Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική* (4η εκδ.). Θεσσαλονίκη, Ελλάδα: Μελισσοκομική Επιθεώρηση.

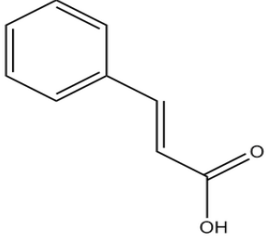
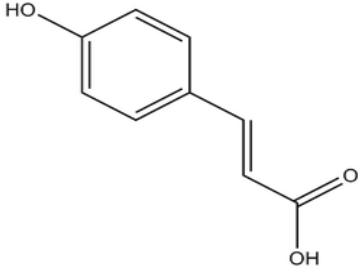
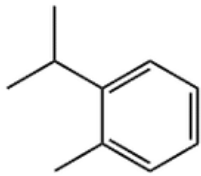
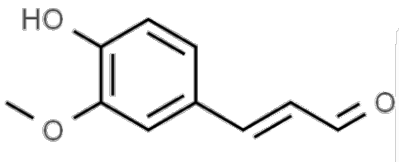
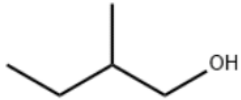
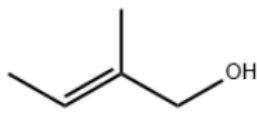
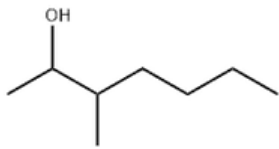
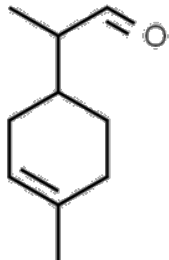
Παράρτημα

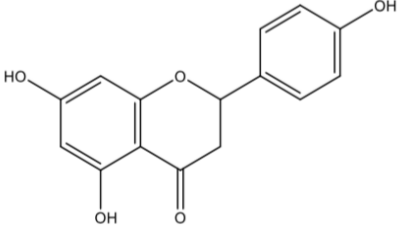

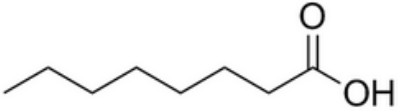
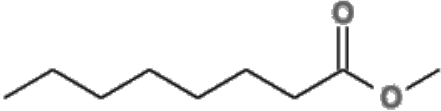
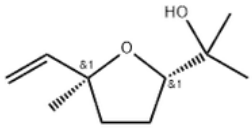
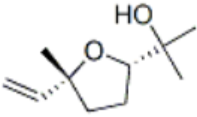
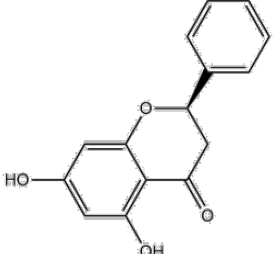

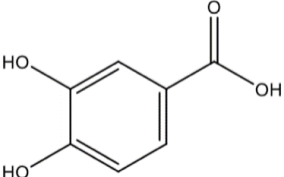
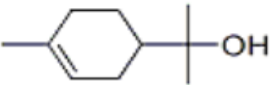
Πίνακας χημικών ενώσεων

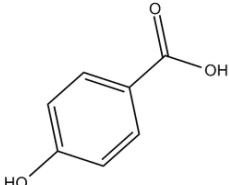
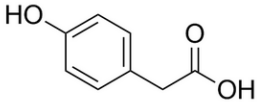
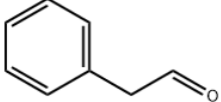
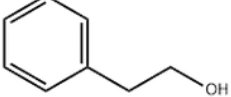
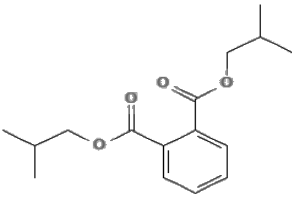
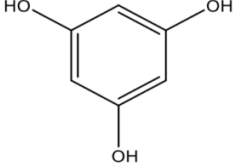
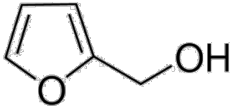
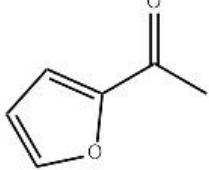
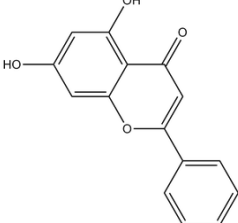
Χημικός Τύπος	Όνομα
	N-ακετυλοπυρρόλιο
	2-αιθυλοεξαν-1-όλη
	5,7-διυδροξυ-2-(4-υδροξυφαινυλο) χρωμεν-4-όνη (απιγενίνη)
	αμπισικό οξύ
	4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζοϊκό οξύ (βανιλικό οξύ)
	βενζαλδεΐδη
	βουτανο-2,3-διόλη
	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ)

	<p>2,5-διδροξυβενζοϊκό οξύ (γεντισικό οξύ)</p>
	<p>(Z)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (β-δαμασκηρόνη)</p>
	<p>δεκανάλη</p>
	<p>δεκάνιο</p>
	<p>δεκανοϊκός μεθυλεστέρας</p>
	<p>1-δεκανόλη</p>
	<p>δεκατετρανοϊκός μεθυλεστέρας</p>
	<p>2,5-διμεθυλοφουράνιο</p>
	<p>δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας</p>
	<p>7,8-διδροξυ-6-μεθοξυ-2-χρωμενόνη (φραξετίνη)</p>
	<p>ελλαγικό οξύ</p>

	ενδεκάνιο
	εννεάνιο
	εννεανοϊκός μεθυλεστέρας
	1-εννεανόλη
	επτανάλη
	5-μεθυλο-2-προπαν-2-υλοφαινόλη (θυμόλη)
	3,5,7-τριυδροξυ-2-(4-υδροξυ-3- μεθοξυφαινυλο)χρωμεν-4-όνη (ισοραμενετίνη)
	2-μεθυλο-5-προπαν-2-υλοφαινόλη (καρβακρόλη)
	(E)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)προπ-2- ενοϊκό οξύ (καφεϊκό οξύ)

	<p>(E)-3-φαινυλοπροπ-2-ενοϊκό οξύ (<i>trans</i>-κινναμωμικό οξύ)</p>
	<p>(E)-3-(4-υδροξυφαινυλο)προπ-2-ενοϊκό οξύ (<i>π</i>-κουμαρικό οξύ)</p>
	<p>1-μεθυλο-2-προπαν-2-υλοβενζόλιο (<i>ο</i>-κυμένιο)</p>
	<p>(E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-ενάλη (κωνιφερυλική αλδεΐδη)</p>
	<p>2-μεθυλοβουταν-1-όλη</p>
	<p>2-μεθυλοβουτ-2-εν-1-όλη</p>
	<p>3-μεθυλοεπταν-2-όλη</p>
	<p>2-(4-μεθυλοκυκλοεξ-3-εν-1-υλο)προπανάλη</p>

	<p>5,7-διυδροξυ-2-(4-υδροξυφαινυλο)- 2,3-διυδροχρωμεν-4-όνη (ναριγγερίνη)</p>
	<p>οκτάνιο</p>
	<p>οκτανοϊκό οξύ</p>
	<p>οκτανοϊκός μεθυλεστέρας</p>
	<p><i>trans</i>-οξείδιο της λιναλοόλης</p>
	<p><i>cis</i>-οξείδιο της λιναλοόλης</p>
	<p>(2<i>S</i>)-5,7-διυδροξυ-2-φαινυλο-2,3- διυδροχρωμεν-4-όνη (πινοσεμπρίνη)</p>
	<p>δεκαεξανοϊκός μεθυλεστέρας (παλμιτικός μεθυλεστέρας)</p>
	<p>3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (πρωτοκατεχικό οξύ)</p>
	<p>2-(4-μεθυλοκυκλοεξ-3-εν-1- υλο)προπαν-2-όλη (α-τερπινεόλη)</p>

	<p>4-υδροξυβενζοϊκό οξύ</p>
	<p>2-(4-υδροξυφαινυλο)οξικό οξύ</p>
	<p>φαινυλακεταλδεΐδη</p>
	<p>2-φαινυλοαιθανόλη</p>
	<p>φθαλικός διισοβουτυλεστέρας</p>
	<p>φλωρογλυκινόλη</p>
	<p>φουραν-2-υλομεθανόλη</p>
	<p>1-(φουραν-2-υλο)αιθανόνη</p>
	<p>5,7-διυδροξυ-2-φαινυλοχρωμεν-4-όνη (χρυσίνη)</p>