ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΟΡΝΗΛΙΑ Π. ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός συστατικών του *Hypericum perforatum*: Σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων τους με εφαρμογές στη γεωργία

Επιβλέπων: Καθηγητής Ηλίας Α. Κουλαδούρος

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΟΡΝΗΛΙΑ Π. ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός συστατικών του *Hypericum perforatum*: Σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων τους με εφαρμογές στη γεωργία

Επιβλέπων: Καθηγητής Ηλίας Α. Κουλαδούρος

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΟΡΝΗΛΙΑ Π. ΜΗΤΣΟΠΟΥΛΟΥ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός συστατικών του *Hypericum perforatum*: Σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων τους με εφαρμογές στη γεωργία

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή:
Ηλίας Κουλαδούρος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)
Σέρκο Χαρουτουνιάν, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Αντώνιος Μιχαηλάκης, Ερευνητής Μ.Φ.Ι.

Επταμελής Εξεταστική επιτροπή:
Ηλίας Κουλαδούρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Σέρκο Χαρουτουνιάν, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Αντώνιος Μιχαηλάκης, Ερευνητής Μ.Φ.Ι.
Μόσχος Πολυσίου, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Γαρυφαλιά Οικονόμου, Αν. Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
Βασιλική Σαρλή, Επικ. Καθηγήτρια Α.Π.Θ.
Αθανάσιος Κυμπάρης, Επικ. Καθηγητής Δ.Π.Θ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΘΗΝΑ 2014

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Στους γονείς μου
και στον Αργυράκο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έλαβε χώρα κατά το διάστημα 2008-2014 και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοργανικής Χημείας του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Ηλία Κουλαδούρο, ο οποίος ήταν ο πρώτος άνθρωπος που πίστεψε σε μένα και μου έδωσε την ευκαιρία να επεκτείνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες και να υλοποιήσω κάθε επιστημονική μου περιέργεια. Πάντα στα δύσκολα ήταν αρωγός και χωρίς τις πολύτιμες συμβουλές του, αλλά και τις «τρελές» του ιδέες, οι οποίες δε γινόταν να μην πραγματοποιηθούν, δεν θα είχε αυτή τη μορφή η παρούσα διδακτορική διατριβή. Επιπλέον, τον ευχαριστώ για την καθοδήγηση και την εκπαίδευση μου, η οποία με έχει θωρακίσει με δύναμη έτσι ώστε να αντιμετωπίζω όλες τις δύσκολες καταστάσεις με ψυχραιμία.

Τέλος, τον ευχαριστώ για την έντονη παρότρυνση του να επισκεφθώ το Εργαστήριο του Καθηγητή Αθ. Γιάννη στο Institut für Organische Chemie στη Λειψία της Γερμανίας, όπου μαγεύτηκα με τη χημεία του υπέρικου. Τον Καθηγητή Αθ. Γιάννη ευχαριστώ για τη φιλοξενία και την τιμή που μου έκανε να γίνω μέλος του εργαστηρίου του.

Ευχαριστώ πολύ το Δρ. Εμ. Πιτσινό, Ερευνητή Α' Βαθμίδας στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για τη φιλοξενία που μου προσέφερε στο εργαστήριό του, καθ' όλα τα έτη και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Αντώνη Μιχαηλάκη, Ερευνητή Β' Βαθμίδας στο Μ.Φ.Ι, ο οποίος μου έδωσε πολύτιμες συμβουλές και τη δυνατότητα να ολοκληρώσω το διδακτορικό μου με πειράματα που διεξάχθηκαν στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Επίσης, τον ευχαριστώ για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά την ανάγνωση της παρούσας εργασίας.

Θερμά ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου για τις παρεμβάσεις και τις υποδείξεις τους, κατά την ανάγνωση της παρούσας εργασίας και για τη θετική ανταπόκρισή τους να συμμετέχουν στην κρίση της διδακτορικής διατριβής μου. Πιο αναλυτικά, ευχαριστώ τον Καθηγητή Σ.

Χαρουτουνιάν, τον Καθηγητή Μ. Πολυσίου, την Αν. Καθηγήτρια Γ. Οικονόμου, την Επικ. Καθηγήτρια Β. Σαρλή και τον Επικ. Καθηγητή Αθ. Κυμπάρη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στη φίλη μου Δρ. Βάσω Σαρλή για τη συμπαράσταση και για τη φιλοξενία της, κατά την παραμονή μου στη Λειψία. Για το κουράγιο και τη δύναμη που μου μετέδωσε την πρώτη φορά που πήγα στη Λειψία και νόμιζα ότι ήμουν ολομόναχη και ήθελα να τα παρατήσω και να γυρίσω στην Ελλάδα. Την ευχαριστώ για τις ωραίες στιγμές που ζήσαμε, εντός και εκτός εργαστηρίου.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω και για τη φίλη μου Δρ. Βέρα Βιδάλη, με την οποία περάσαμε άπειρες ώρες μέσα στο εργαστήριο και η οποία μου χάρισε το σπουδαιότερο δώρο να με διδάξει τις εργαστηριακές τεχνικές. Επίσης, την ευχαριστώ για τη σημαντική βοήθεια στην αποσαφήνιση των φασμάτων. Τέλος, ευχαριστώ τη Frau μου για τις ατελείωτες προσωπικές μας συζητήσεις.

Το φίλο μου Δρ. Γιώργο Κολιόπουλο τον ευχαριστώ, διότι με εισήγαγε στο θαυμαστό κόσμο των κουνουπιών. Επίσης, τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και γιατί πάντα έχει έναν καλό λόγο να μου πει για να με εμψυχώσει.

Θερμά ευχαριστώ στη Δρ. Κική Καραγκούνη, Ερευνήτρια Α' Βαθμίδας στο Ινστιτούτο Pasteur για τις συζητήσεις μας σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο. Επίσης, ευχαριστώ τη Δρ. Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια Γ' Βαθμίδας στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για τη βοήθεια της, στην κατανόηση βιολογικών όρων καθώς και τις Δρ. Ντίνα Γιαννακοπούλου Ερευνήτρια Α' Βαθμίδας στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και Δρ. Αγγελική Παναγιωτοπούλου για τις συμβουλές τους σε θέματα φασματοσκοπίας NMR. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άννα Μαράντη (Pro-*actina*) για τη λήψη των φασμάτων LC-MS καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές τις. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Αναγνωστόπουλο Χρήστο, Ερευνητή Δ' Βαθμίδας στο Μ.Φ.Ι, για τη λήψη φασμάτων LC-ESI(+)-TOF.

Ευχαριστώ τον Καθ. Β. Ρούσση και τη Λέκτορα Ε. Ιωάννου (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) για την άψογη συνεργασία. Επίσης, ευχαριστώ τον Αν. Καθηγητή Κ. Δημάδη του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την επίλυση της κρυσταλλογραφικής δομής.

Ευχαριστώ το Δρ. Αλέξανδρο Στρογγυλό για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην εκμάθηση του HPLC και για την υπομονή του. Επίσης, ευχαριστώ τους Δρ. Α. Μάγκο και Δρ. Β. Μούτσο για τις πολύτιμες επιστημονικές τους συμβουλές.

Ευχαριστώ τη συνάδελφο Δρ. Ειρήνη Αναστασάκη για τις συμβουλές τις, όσον αφορά τις διαδικαστικές λεπτομέρειες του παρόντος διδακτορικού.

Ευχαριστώ όλους τους φίλους μου, τους οποίους γνώρισα στο Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοργανικής Χημείας του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Δρ. Μαρίζα Λαμπροπούλου, Κατερίνα Τσιλιούκα, Νίκο Αθηναίο, Δρ. Ξένια Αλεξίου και Άννα Καπέλλα. Τους ευχαριστώ για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο, για την αρμονική συνεργασία που είχαμε, αλλά και για τις ατελείωτες μπύρες και cocktails που καταναλώσαμε εκτός εργαστηρίου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στους Δρ. Ηλία Κιούλο, Δρ. Νίκο Παπανικολάου, Δρ. Θανάση Γιατρόπουλο, Γιάννη Στάθη και Γιώργο Παρτσινέβελο για τις επιστημονικές γνώσεις που μου προσέφεραν, αλλά και για τα ευχάριστα διαλείμματα στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

Ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ιδιαίτερα τους Δρ. Νατάσσα Μίχου, Δρ. Σοφία Κουλοχέρη και Δρ. Μάνο Μπούζα.

Ευχαριστώ το «Ερευνητικό Πρόγραμμα «Ηράκλειτος ΙΙ» για τη χρηματοδότηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες μου Γεωργία και Ρούλα, διότι έχω να θυμάμαι μόνο όμορφα περιστατικά και πιστεύω ότι είναι ακέραιοι χαρακτήρες.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Αλέκα και Τάκη που με την αμέριστη συμπαράστασή τους ολοκληρώθηκε η παρούσα εργασία. Πολλές φορές λύγισα και ήθελα να τα παρατήσω, όμως στάθηκαν αρωγοί και με τις συμβουλές τους με βοήθησαν να συνεχίσω. Επίσης, ευχαριστώ τον αδερφό μου Αργύρη για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, αλλά και για τις βραδιές ψυχαγωγίας με DVD και PIZZA.

Όλους σας ευχαριστώ από τα βάθη της ψυχής μου.

Κορνηλία Π. Μητσοπούλου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χωρίζεται σε τρεις κύριες θεματικές ενότητες.

Στο πρώτο μέρος περιγράφεται η εκχύλιση του *Hypericum triquetrifolium.* Επίσης, περιγράφεται η απομόνωση της hyperibine J (γνωστή ως αδυπερφιρίνη), μιας ακυλο-φλωρογλυκινόλης τύπου Α, της οποίας η δομή που της είχε αποδοθεί ήταν λανθασμένη. Στο συγκεκριμένο μέρος αναλύεται ο τρόπος εύρεσης - αναθεώρησης της προτεινόμενης δομής της αδυπερφιρίνης σε hyperibine J.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η εκχύλιση του *Hypericum perforatum* και η απομόνωση της υπερφορίνης και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών του. Από τα επιμέρους κλάσματα της εκχύλισης διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός νέου μεταβολίτη, του μεθυλεστέρα του 3*β*-δεκαεπτανυλοξυ-ολεαν-12-εν-28-ικού οξέος. Επίσης, συντέθηκε η δεοξυκοχουμουλόνη και τα ακετυλιωμένα ανάλογα της. Τέλος, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητά της υπερφορίνης, της δεοξυκοχουμουλόνης, των συντιθέμενων ακετυλιωμένων παράγωγων τους καθώς και των κλασμάτων της εκχύλισης, κατά των προνυμφών κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens*.

Στο τρίτο μέρος περιγράφεται ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η βιολογική αξιολόγηση σε καρκινικές σειρές αναλόγων της υπερφορίνης. Τέλος, συνετέθη ένας νέος βιοδραστικός ανθρακικός σκελετός (δικυκλο[3.3.0]οκτανιο), η δομή του οποίου απεδείχθη με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές επιστήμες, Άλλες επιστήμες

Λέξεις κλειδιά: *Hypericum perforatum, Hypericum triquetrifolium,* υπερφορίνη, hyperibine J, ακυλο-φλωρογλυκινόλη τύπου Α, 3*β*-δεκαεπτανυλοξυ-ολεαν-12-εν-28-ικού οξύ, δεοξυκοχουμουλόνη, *Culex pipiens*, Ιός του Δυτικού Νείλου, Προνυμφοκτόνος δράση.

SUMMARY

The present thesis comprises of three major thematic units.

In the first part, the structure elucidation of hyperibine J, originally assigned as adhyperfirin is described. Hyperibine J belongs to the polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols (PPAPs) family and it is very similar to hyperforin, possessing a methyl substituent instead of a prenyl one on C-1. This phloroglucinol was isolated from the fresh aerial parts of *Hypericum triquetrifolium* and the revision of the molecule's structure was based on spectroscopic analyses and chemical transformation to hyperibone J.

In the second part, the extraction of *Hypericum perforatum* and isolation of hyperforin and other secondary metabolites are described. The existence of a new metabolite, methyl 3*β*-heptadecanoyloxy-olean-12-en-28-oate was detected for the first time. Also, the larvicidal effect of hyperforin, a bioactive compound of *Hypericum perforatum*, and deoxycohumulone (biosynthetic precursor of hyperforin) were evaluated against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) for the first time. All the acetate analogues of hyperforin and deoxycohumulone were also synthesized and bioassayed to provide information on structural requirements for the tested compounds.

In the third part, the design and the synthesis of hyperforin's analogues were described. Finally, a novel synthesized bioactive carbon skeleton (bicyclo [3.3.0] octane system) was presented.

Discipline: Agricultural Sciences, Other Agricultural Sciences

Keywords: *Hypericum perforatum, Hypericum triquetrifolium,* hyperibine J, hyperforin, Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols (PPAPs), methyl 3*β*-heptadecanoyloxy-olean-12-en-28-oate, deoxycohumulone, *Culex pipiens,* West Nile Virus, Larvicidal activity.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ **1**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Hypericum* **3**

1.1. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ 3

1.2. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ *Hypericum perforatum* 12

1.3. ΕΘΝΟΓΛΩΣΣΟΛΟΓΙΑ – ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΙΚΟΥ 14

1.3.1. Ονομασίες θρησκευτικής προέλευσης 14

1.3.2. Ονομασίες που σχετίζονται με τη μαγεία 14

1.3.3. Ονομασίες για τις θεραπευτικές του ιδιότητες 15

1.3.4. Ονομασίες που σχετίζονται με τη βοτανική περιγραφή 15

1.4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΓΙΑ ΤΟ ΥΠΕΡΙΚΟ 16

1.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ *Hypericum perforatum* 19

1.5.1. Τα κύρια συστατικά του υπέρικου 19

1.5.2. Φλωρογλυκινόλες 23

1.5.3. Ναφθοδιανθρόνες 23

1.6. ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΕΣ ΠΟΛΥΠΡΕΝΥΛΙΩΜΕΝΕΣ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΕΣ (ΠΠΑ) 24

1.7. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ 26

1.8. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ 28

1.8.1. Αντικαταθλιπτική δράση 28

1.8.2. Προφλεγμονώδη - Αντιφλεγμομώδη δράση 29

1.8.3. Αντιβακτηριακή δράση 29

1.8.4. Αντικαρκινική δράση 30

1.8.5. Παρεμπόδιση αγγειογέννεσης 31

1.9. ΝΟΜΙΚΟ ΚΑΘΕΣΤΩΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ 32

1.9.1. Ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση του υπέρικου 33

1.9.2. Παραδοσιακή θεραπευτική 34

2. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ **36**

2.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ – ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ 37

2.2. ΕΣΤΙΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ 40

2.3. Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ 41

2.3.1. Αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών 42

2.3.2. Αντιμετώπιση των τέλειων κουνουπιών 45

2.3.3. Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας 48

2.4. ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΚΑΙ Η ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΗΜΑΣΙΑ 51

2.5. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Culex pipiens* 57

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **59**

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ **67**

ΜΕΡΟΣ Α **69**

Α.1. ΑΔΥΠΕΡΦΙΡΙΝΗ Η ΚΑΤΙ ΑΛΛΟ; 71

Α.2. *Hypericum perforatum* Η ΚΑΠΟΙΟ ΑΛΛΟ ΕΙΔΟΣ ΦΥΤΟΥ; 74

Α.3. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ *Hypericum triquetrifolium* 75

Α.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ *Hypericum triquetrifolium* 77

Α.5. ΑΔΥΠΕΡΦΙΡΙΝΗ ΣΤΟ *Hypericum perforatum* ΚΑΙ ΣΤΟ *Hypericum triquetrifolium* 78

Α.6. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΑΔΥΠΕΡΦΙΡΙΝΗΣ 81

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **89**

ΜΕΡΟΣ Β **91**

Β.1. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΜΕ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ ΔΡΑΣΗ 93

Β.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ *Hypericum perforatum* 95

Β.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ *Hypericum perforatum* 98

Β.4. ΕΥΡΕΣΗ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΜΕ Μ.Β. 722 100

Β.5. ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ (**30**) ΣΤΟ *Hypericum perforatum* 103

Β.6. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΕΟΞΥΚΟΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗΣ 107

Β.7. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΕΟΞΥΚΟΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗΣ 108

Β.8. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΕΟΞΥΚΟΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗΣ 109

Β.8.1. Βιοδοκιμές προνυμφοκτόνου δράσης 109

Β.8.2. Εκτροφή 110

Β.8.3. Πείραμα προνυμφοκτονίας 112

Β.8.4. Μέθοδος βιοδοκιμής 113

Β.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 114

Β.10. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ *Hypericum perforatum* 118

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **121**

ΜΕΡΟΣ Γ **123**

Γ.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ 125

Γ.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ 127

Γ.3. ΜΙΑ ΚΑΙΝΟΥΡΙΑ ΤΥΠΟΥ 5-5 ΔΙΚΥΚΛΙΚΗ ΕΝΩΣΗ 130

Γ.4. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ 137

Γ.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ 138

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **145**

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **147**

Γενικές παρατηρήσεις **149**

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α **151**

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β **157**

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Γ **167**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Ac, ακετυλο-
Ac_2O, οξικός ανυδρίτης
AcOEt, οξικός αιθυλεστέρας

br, ευρεία
BUS, συνθάσης της ισοβουτυροφαινόνης

^{13}C NMR, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός του ^{13}C

d, διπλή
DDT, διχλωρο-διφαινυλο τριχλωρο αιθάνιο
DMAP, 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη
DMAPP, διμεθυλ-αλλυλο-διφωσφορική μονάδα

Et_3N, τριαιθυλαμίνη

GABA, γ-αμινοβουτυρικό οξύ
GPP, διφωσφορικό γερανύλιο

HRMS, φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης
^1H NMR, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός του ^1H

IBX, 2-ιωδοξυ-βενζοϊκό οξύ

m, πολλαπλή
m-CPBA, *μ*-χλωρουπερβενζοϊκό οξύ
MeOH, μεθανόλη
MeONa, μεθοξείδιο του νατρίου
MsCl, χλωρίδιο του μεθυλοσουλφονικού οξέος

NaHMDS, νάτριο εξαμεθυλοδισιλαζάνιο
NMR, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός*p*-, παρα-

P, προστατευτική ομάδα
PPTS, πυριδινιακό *π*-τολουολοσουλφονικό οξύ
PvCl, πιβαλοϋλοχλωρίδιο
Pyr, πυριδίνη

s, απλή

t, τριπλή
THF, τετραϋδροφουράνιο
TLC, χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συνεισφορά της παραδοσιακής ιατρικής στην υγεία της ανθρωπότητας είναι σημαντική και εμπλέκεται στη θεραπεία του 75-80% του παγκόσμιου πληθυσμού. Τα κύρια συστατικά των φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική είναι φυτικής προέλευσης. Παρόλο που στις ανεπτυγμένες χώρες η σύγχρονη ιατρική έχει αντικαταστήσει τα φυτικής προέλευσης φάρμακα με μεγάλο αριθμό συνθετικών προϊόντων, ένα σημαντικό ποσοστό (30%) των φαρμακευτικών συνταγών σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τα φυτά (Marini-Bettolo, 1980).

Για την δημιουργία ενός φάρμακου φυτικής προέλευσης, η διαδικασία που ακολουθείται για την έρευνα και την επιλογή του φυτού έχει δύο βασικές κατευθύνσεις: α) Παραλαβή όλης της χλωρίδας μιας περιοχής, διαχωρισμός-ταξινόμηση των ειδών και εκχύλιση-απομόνωση των βιοδραστικών τους ενώσεων ή β) εκχύλιση και απομόνωση όλων των ενώσεων ενός επιλεγμένου φυτού για διερεύνηση τυχόν ύπαρξης βιοδραστικών ουσιών.

Μέχρι στιγμής η πρώτη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα στην έρευνα αντικαρκινικών ουσιών. Για το διάστημα από το 1960 έως το 1981 το Εθνικό Ινστιτούτο για τον Καρκίνο στις ΗΠΑ (U.S. National Cancer Institute) ερεύνησε περίπου 114.000 εκχυλίσματα από 35.000 είδη φυτών. Το μακροχρόνιο αυτό πρόγραμμα κατέληξε στην παραγωγή φαρμάκων, όπως των vincristine, vinblastine και vindesine (αλκαλοειδή του γένους *Vinca sp.*), των etoposide και teniposide (παράγωγα του γένους *Podophyllum sp.*) και της taxol (ένωση του φυτού *Taxus brevifolia* Nutt.), τα οποία πέρασαν με επιτυχία τις κλινικές δοκιμές (Cragg et al., 1994).

Η δεύτερη μέθοδος έρευνας φαρμακευτικών φυτών απαιτεί την προϋπάρχουσα γνώση ή τουλάχιστον υποψία για τις πιθανές δυνατότητες του συγκεκριμένου είδους. Η συγκέντρωση της γνώσης αυτής, τουλάχιστον σε μη ανεπτυγμένες χώρες, αποτελεί το βασικό αντικείμενο της Εθνοβοτανικής και Εθνοφαρμακολογίας. Ιδιαίτερα όσον αφορά τις περιοχές της Μεσογείου, υπάρχουν ορισμένες πηγές τέτοιας γνώσης με ανεκτίμητη αξία. Όπως είναι γενικότερα αποδεκτό, τα αρχαία κείμενα περί ιατρικών υλών (π.χ. Materia

Medica, Διοσκουρίδης ο Πεδάνιος) διατηρούν καλύτερα από κάθε άλλη πηγή τις πραγματικές παραδόσεις της βοτανοθεραπείας. Αφού επιλεχθούν τα φυτά ακολουθεί η απομόνωση όλων των συστατικών τους, ο χαρακτηρισμός και η εκτίμηση της βιολογικής τους δράσης. Κατόπιν καθορίζεται η χημική δομή των βιοδραστικών ενώσεων, καθώς και οι πιθανές μέθοδοι μελλοντικής σύνθεσης. Πραγματοποιούνται παράλληλα τοξικολογικοί έλεγχοι για τον εντοπισμό τυχόν παρενεργειών. Εφόσον οι υπό μελέτη χημικές ενώσεις περάσουν με επιτυχία όλα αυτά τα στάδια, μπορούν πλέον να εισέλθουν στη φάση της κλινικής έρευνας.

Η Ελλάδα, λόγω των ευνοϊκών εδαφοκλιματικών συνθηκών έχει μία από τις πλουσιότερες χλωρίδες του κόσμου, ιδίως σε ότι αφορά την παραγωγή αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Ωστόσο, η καλλιέργεια και εκμετάλλευση των αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών είναι περιορισμένη και έχει περισσότερο τοπικό χαρακτήρα.

Θα πρέπει να δοθεί οικονομική ενίσχυση για την μελέτη των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, έτσι ώστε να αναπτυχθούν καλλιεργητικές τεχνικές με στόχο την αύξηση της παραγωγής και την παραλαβή των δραστικών συστατικών των συγκεκριμένων φυτών.

Η παρούσα εργασία αφορά τα φυτά της οικογένειας Hypericaceae, λόγω της φαρμακευτικής τους δράσης, αφού ένα από τα πιο σημαντικά είναι το *Hypericum perforatum,* γνωστό για τις επουλωτικές του ιδιότητες από τα αρχαία χρόνια.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Hypericum*

1.1. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ένα από τα πιο σημαντικά φαρμακευτικά φυτά της χώρας μας είναι τα φυτά του γένους *Hypericum* τόσο για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες, όσο και για τον αυτοφυή τρόπο εξάπλωσής τους.

Η βοτανική ταξινόμησή του γένους *Hypericum,* η οποία βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, είναι η παρακάτω:

Βασίλειο	Plantae
Διαίρεση	Magnoliophyta
Κατηγορία	Magnoliopsida
Τάξη	Malpighiales
Οικογένεια	Hypericaceae
Υποοικογένεια	Hypericoideae
Φυλή	Hypericeae
Γένος	*Hypericum*
Είδος	περίπου 490 είδη

Το γένος *Hypericum* αποτελείται από 490 περίπου είδη (δένδρα, θάμνοι και βότανα) τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Hypericaceae. Το συγκεκριμένο γένος απαντάται σχεδόν σε όλο τον κόσμο με εξαίρεση τις τροπικές περιοχές, τις ερήμους και τις αρκτικές περιοχές (Εικόνα Ε1). Πιο συγκεκριμένα, απαντάται τόσο σε καλλιέργιες όσο και σε ξηρά περιβάλλοντα με έντονη ηλιοφάνεια και φύεται σε δασικές περιοχές, αλλά και στις άκρες των αγροτικών δρόμων. Από τον Ιούνιο μέχρι το Σεπτέμβριο είναι ανθισμένο (Μπαζαίος, 1986; Crockett and Robson, 2011). Στον πίνακα Ε1 αναφέρονται μερικά από τα πιο σημαντικά είδη του γένους *Hypericum.*

Πίνακας Ε1: Επιλεγμένα είδη του γένους *Hypericum* (Πηγή 1, 2)

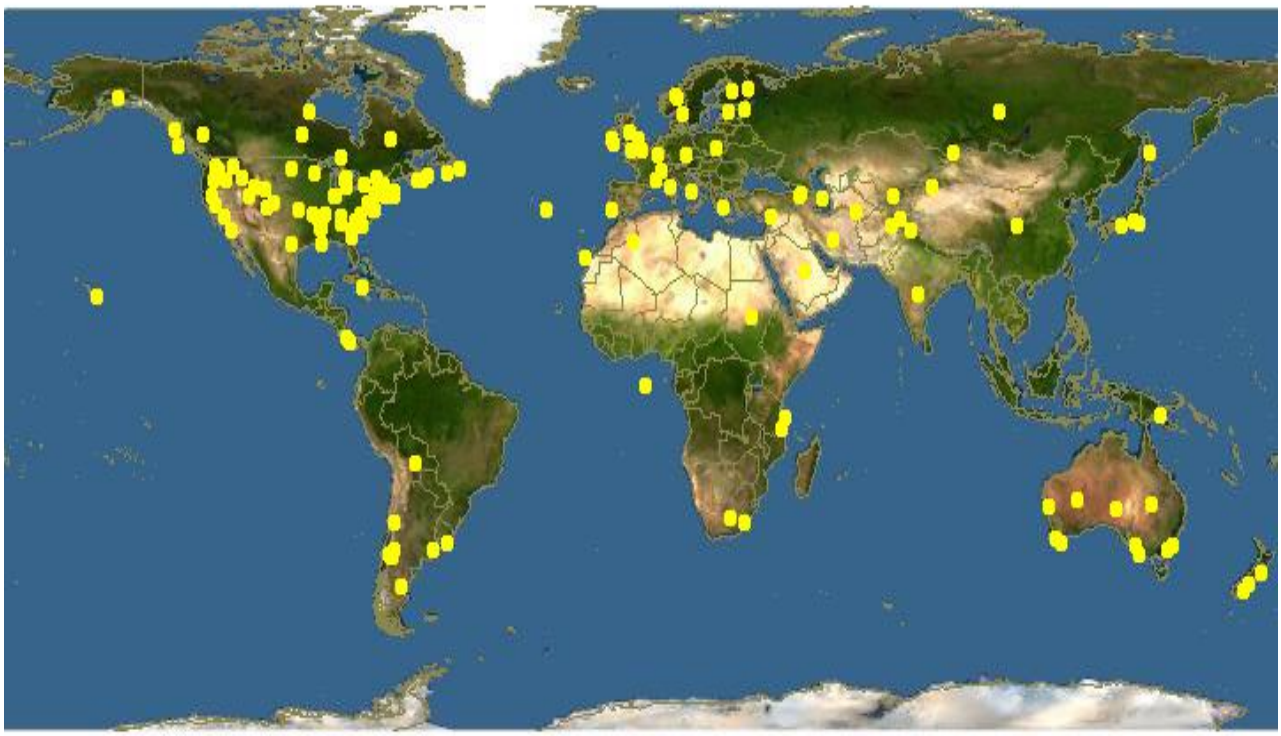
Α.Α.	**Γένος είδος**	**Τοποθεσία**
1	*Hypericum acmosepalum*	Γιουνάν και Κουιτσού
2	*Hypericum acostanum*	Ισημερινός (ενδημικό)
3	*Hypericum addingtonii*	Κίνα
4	*Hypericum adenotrichum*	Τουρκία (ενδημικό)
5	*Hypericum aegypticum*	Αλγερία, Λιβύη, Μαρόκο, Σαρδηνία, Σικελία, Κρήτη, Πελοπόννησος και Μάλτα
6	*Hypericum anagalloides*	Βορειοδυτική Αμερική
7	*Hypericum androsaemum*	Ευρασία
8	*Hypericum annulatum*	Κένυα, Αιθιοπία, Ιταλία
9	*Hypericum aphyllum*	Μπελίζ και Ονδούρα
10	*Hypericum ascyron*	Βόρεια Ιαπωνία και Βόρεια Αμερική
11	*Hypericum asplundii*	Ισημερινός (ενδημικό)
12	*Hypericum athoum*	Περιφέρεια Βορείου Αιγαίου
13	*Hypericum atomarium*	Δωδεκάνησα, Τουρκία (Παράλια)
14	*Hypericum augustinii*	Κίνα
15	*Hypericum balearicum*	Βαλεαρίδες Νήσοι
16	*Hypericum balfourii*	Σοκότρα (ενδημικό)
17	*Hypericum bellum*	Κίνα
18	*Hypericum buckleii*	Βόρεια Αμερική
19	*Hypericum bupleuroides*	Βορειοανατολική Τουρκία
20	*Hypericum calycinum*	Βουλγαρία και Μαύρη Θάλασσα
21	*Hypericum canadense*	Βόρεια Αμερική
22	*Hypericum canariense*	Κανάριες Νήσοι (ενδημικό)
23	*Hypericum cerastoides*	Ελλάδα, Τουρκία και Βουλγαρία
24	*Hypericum cistifolium*	Φλόριδα
25	*Hypericum concinnum*	Καλιφόρνια (ενδημικό)
26	*Hypericum crux-andreae*	Βορειοανατολική Αμερική
27	*Hypericum cumulicola*	Φλόριντα (ενδημικό)
28	*Hypericum curvisepalum*	Κίνα
29	*Hypericum delphicum*	Κύμη
30	*Hypericum densiflorum*	Ανατολική Αμερική
31	*Hypericum denticulatum*	Αμερική
32	*Hypericum dissimulatum*	Βορειοανατολική Αμερική
33	*Hypericum dyeri*	Πακιστάν
34	*Hypericum eastwoodianum*	Μεξικό
35	*Hypericum elegans*	Ουκρανία και Γεωργία
36	*Hypericum ellipticum*	Βορειοδυτική Αμερική και Καναδάς
37	*Hypericum elodes*	Δυτική Ευρώπη
38	*Hypericum elongatum*	Ελλάδα (Όρος Χελμός, Όρη Γκιώνα, Οίτη και Βαρδούσια), Νοτιοδυτική Ασία, Μαρόκο και Τουρκία
39	*Hypericum empetrifolium*	Γαλλία και Ελλάδα
40	*Hypericum erectum*	Κίνα, Ιαπωνία και Κορέα
41	*Hypericum ericoides*	Ισπανία και Μαρόκο
42	*Hypericum fasciculatum*	Βόρεια Αμερική, Μπελίζ και Καραϊβική

43	*Hypericum fieriense*	Σοκότρα (ενδημικό)
44	*Hypericum foliosum*	Πορτογαλία
45	*Hypericum formosum*	Μεξικό, Γουατεμάλα και Βόρεια Αμερική
46	*Hypericum forrestii*	Γιουνάν, Σετσουάν και Βορειοανατολική Βιρμανία
47	*Hypericum fragile*	Όρη Δίρφη, Σκοτεινή, Ορτάρι, Ξεροβούνι, Μαυροβούνι και περιοχή Κύμης (ενδημικό)
48	*Hypericum frondosum*	Βόρεια Αμερική
49	*Hypericum galioides*	Βόρεια Αμερική, Κούβα και Τουρκία
50	*Hypericum gentianoides*	Βόρεια Αμερική
51	*Hypericum glandulosum*	Κανάριες Νήσοι, Μαδέρα και Αγγλία
52	*Hypericum gnidiifolium*	Αιθιοπία (Ενδημικό)
53	*Hypericum gramineum*	Νέα Καληδονία, Αυστραλία και Ταιβάν
54	*Hypericum grandifolium*	Κανάριες Νήσοι και Μαδέρα
55	*Hypericum graveolens*	Βορειοανατολική Αμερική
56	*Hypericum hartwegii*	Περού και Ισημερινός (ενδημικό)
57	*Hypericum henryi*	Μιανμάρ, Κίνα, Ταϊλάνδη και Βιετνάμ
58	*Hypericum hircinum*	Χιλή
59	*Hypericum hirsutum*	Δυτική Ευρώπη, Κιργιστάν, Καζακστάν και Κίνα
60	*Hypericum hookerianum*	Μιανμάρ, Μπαγκλαντές, Κίνα, Μπουτάν, Ινδία, Νεπάλ, Ταϊλάνδη και Βιετνάμ
61	*Hypericum humifusum*	Δυτική Ευρώπη
62	*Hypericum hypericoides*	Δομινικανή Δημοκρατία
63	*Hypericum hyssopifolium*	Ουκρανία, Γαλλία, Μαρόκο, Κιργιστάν, Καζακστάν, Κίνα και Ουζμπεκιστάν
64	*Hypericum inodorum*	Αρμενία και Τουρκία
65	*Hypericum japonicum*	Μαδαγασκάρη, Κίνα και Ιαπωνία
66	*Hypericum kalmianum*	Καναδάς και Βόρεια Αμερική
67	*Hypericum kamtschaticum*	Ιαπωνία
68	*Hypericum kelleri*	Κρήτη (ενδημικό)
69	*Hypericum kotschyanum*	Τουρκία
70	*Hypericum kouytchense*	Κίνα
71	*Hypericum lagarocladum*	Κίνα
72	*Hypericum lancasteri*	Κίνα
73	*Hypericum lanceolatum*	Ρεϊνιόν και Αιθιοπία
74	*Hypericum lanuginosum*	Κύπρος, Συρία, Ιράκ και Τουρκία
75	*Hypericum linarioides*	Βόρεια Ελλάδα και Αρμενία
76	*Hypericum llanganaticum*	Ισημερινός (ενδημικό)
77	*Hypericum lobbii*	Ινδία
78	*Hypericum lobocarpum*	Βόρεια Αμερική
79	*Hypericum maclarenii*	Κίνα
80	*Hypericum maculatum*	Βόρεια Ελλάδα και Αυστρία
81	*Hypericum maguirei*	Ισημερινός (ενδημικό)
82	*Hypericum majus*	Καναδάς, Βόρεια Αμερική, Γερμανία, Γαλλία και Ιαπωνία
83	*Hypericum matangense*	Ισημερινός (ενδημικό)

84	*Hypericum monogynum*	Ιαπωνία
85	*Hypericum montanum*	Μεξικό και Δυτική Ευρώπη
86	*Hypericum montbretii*	Βόρεια Ελλάδα
87	*Hypericum mutilum*	Βόρεια Αμερική
88	*Hypericum myricariifolium*	Κολομβία
89	*Hypericum mysorense*	Ινδία και Σρι Λάνκα
90	*Hypericum nanum*	Λίβανος και Συρία
91	*Hypericum nudiflorum*	Βόρεια Αμερική
92	*Hypericum nummularium*	Γαλλία
93	*Hypericum oblongifolium*	Ινδία και Νεπάλ
94	*Hypericum olympicum*	Ελλάδα, Βουλγαρία, Γιουγκοσλαβία, Τουρκία και Συρία
95	*Hypericum orientale*	Τουρκία
96	*Hypericum origanifolium*	Τουρκία
97	*Hypericum pallens*	Τουρκία
98	*Hypericum patulum*	Νεπάλ
99	*Hypericum peninsulare*	Μεξικό
100	*Hypericum perfoliatum*	Νότια Ευρώπη, Κύπρος, Τουρκία, Μαρόκο, Βορειοδυτική Αφρική, Κανάριες Νήσοι και Μαδέρα
101	*Hypericum perforatum*	Σε όλο τον κόσμο (Εικόνα 1)
102	*Hypericum prietoi*	Ισημερινός (ενδημικό)
103	*Hypericum prolificum*	Βόρεια Αμερική
104	*Hypericum pseudohenryi*	Κίνα
105	*Hypericum pulchrum*	Δυτική Ευρώπη
106	*Hypericum punctatum*	Βόρεια Αμερική
107	*Hypericum quitense*	Ισημερινός (ενδημικό)
108	*Hypericum reflexum*	Κανάριες Νήσοι και Πορτογαλία
109	*Hypericum reptans*	Μιανμάρ, Κίνα, Ινδία και Νεπάλ
110	*Hypericum reductum*	Βόρεια Αμερική
111	*Hypericum revolutum*	Καμερούν και Αιθιοπία
112	*Hypericum richeri*	Δυτική Ευρώπη
113	*Hypericum roeperanum*	Αιθιοπία
114	*Hypericum rumeliacum*	Ελλάδα και Βουλγαρία
115	*Hypericum sampsonii*	Μιανμάρ, Κίνα, Βιετνάμ και Ιαπωνία
116	*Hypericum scopulorum*	Σοκότρα (ενδημικό)
117	*Hypericum scouleri*	Βόρεια Αμερική
118	*Hypericum setosum*	Βόρεια Αμερική
119	*Hypericum socotranum*	Σοκότρα
120	*Hypericum sphaerocarpum*	Βόρεια Αμερική
121	*Hypericum spruneri*	Αλβανία, Γιουγκοσλαβία και Ιταλία
122	*Hypericum stellatum*	Κίνα
123	*Hypericum subsessile*	Κίνα
124	*Hypericum tenuicaule*	Ινδία
125	*Hypericum tetrapterum*	Ιταλία
126	*Hypericum tomentosum*	Ιταλία, Γαλλία και Ισπανία
127	*Hypericum tortuosum*	Σοκότρα (ενδημικό)

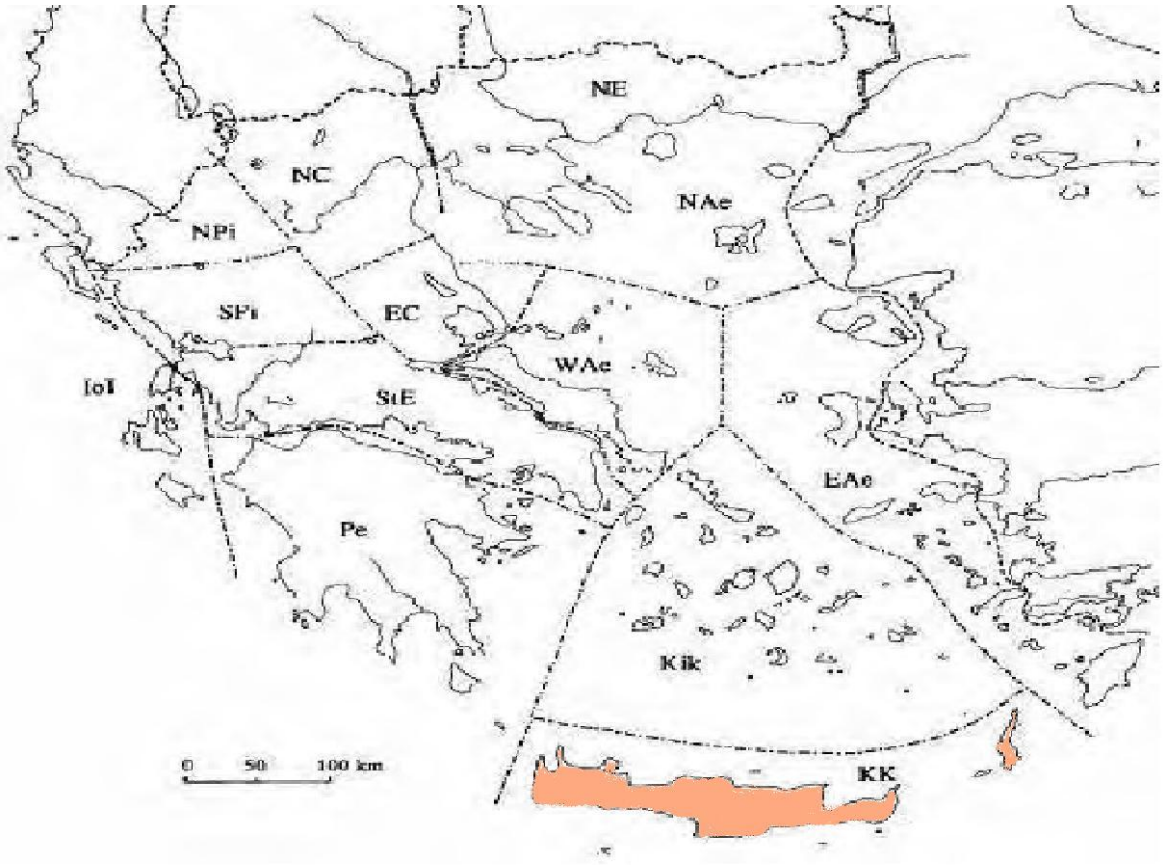
128	*Hypericum triquetrifolium*	Ελλάδα, Τυνησία, Κύπρος και Ιταλία
129	*Hypericum undulatum*	Ισπανία
130	*Hypericum uralum*	Ευρασία
131	*Hypericum vacciniifolium*	Τουρκία
132	*Hypericum wilsonii*	Κίνα

Στην εικόνα Ε1 απεικονίζεται ο παγκόσμιος χάρτης με τα μέρη όπου φύεται το *Hypericum perforatum* L.



Εικόνα Ε1. Μέρη όπου φύεται το *H. perforatum* (Πηγή 3)

Στην Ελλάδα φύονται περίπου 40 είδη και υποείδη του γένους *Hypericum* τα οποία κατανέμονται σε 13 φυτογεωγραφικές περιοχές (Εικόνα Ε2), όπως αυτές ορίζονται στη "Flora Hellenica" (1997). Συγκεκριμένα, οι φυτογεωγραφικές περιοχές είναι οι εξής: NE: βόρεια-ανατολική, NC: βόρεια-κεντρική, NPi: βόρεια Πίνδος, SPi: νότια Πίνδος, EC: ανατολική-κεντρική, Ste: Στερεά Ελλάδα, Pe: Πελοπόννησος, IoI: Ιόνια νησιά, WAe: νησιά δυτικού Αιγαίου, NAe: νησιά βόρειου Αιγαίου, EAe: νησιά ανατολικού Αιγαίου, Kik: Κυκλάδες και KK: Κρήτη-Κάρπαθος. Τα 12 είδη είναι ελληνικά ενδημικά (30%) και τα 28 έχουν ευρύτερη εξάπλωση (70%) (Πίνακας Ε2, Ε3) (Robson, 2002).



Εικόνα Ε2. Φυτογεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας σύμφωνα με τη Flora Hellenica (1997). Με σομόν χρώμα υποδεικνύεται η περιοχή με τα περισσότερα ενδημικά είδη και υποείδη του γένους *Hypericum sp*.

Πίνακας Ε2. Κατανομή των ελληνικών μη ενδημικών ειδών-υποειδών του γένους *Hypericum*

Υποείδη	Φυτογεωγραφικές περιοχές												
	NE	**NC**	**NPi**	**SPi**	**EC**	**Ste**	**Pe**	**NAe**	**WAe**	**EAe**	**Kik**	**IoI**	**KK**
H. aegypticum ssp. *webbii*							*					*	*
H. annulatum ssp. *annulatum*	*	*											
H. atomarium							*			*			
H. aucheri	*												
H. avicullariifolium ssp. *byzantinum*										*			
H. barbatum	*	*	*	*	*	*	*	*					
H. cerastoides	*							*					
H. cuisinii										*			*
H. empetrifolium ssp. *empetrifolium*					*	*	*		*	*		*	*
H. hircinum ssp. *albimontanum*							*			*	*		*
H. hircinum ssp. *majus*										*			*
H. hirsutum													
H. linarioides	*	*	*										
H. maculatum ssp. *immaculatum*	*												
H. montbretii	*											*	
H. olympicum	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	
H. perfoliatum				*		*	*		*	*			*
H. perforatum ssp. *perforatum*	*	*	*										
H. perforatum ssp. *veronense*	*	*	*	*		*	*	*	*	*		*	*
H. polyphyllum ssp. *subcordatum*										*			
H. rochelii	*												
H. rumeliacum ssp. *apollinis*		*	*	*		*							
H. rumeliacum ssp. *rumeliacum*	*	*											
H. spruneri		*	*	*	*	*						*	
H. tetrapterum var. *tetrapterum*	*	*	*		*	*	*		*	*			*
H. thasium								*					
H. triquetrifolium	*				*	*	*			*	*		*
H .vesiculosum	*	*					*						

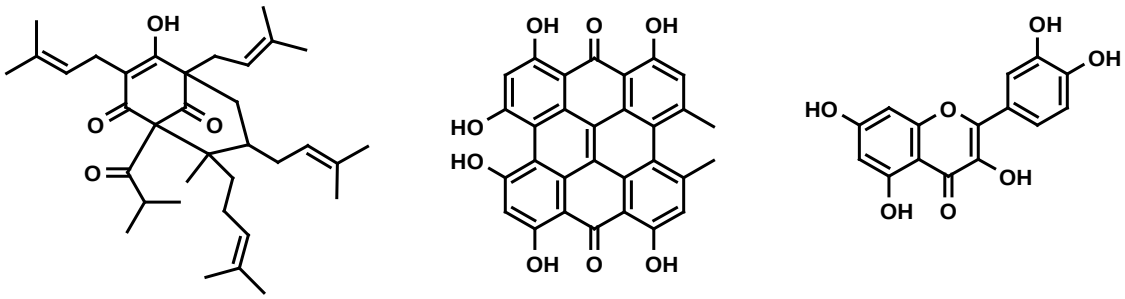
Πίνακας Ε3. Κατανομή των ελληνικών ενδημικών ειδών-υποειδών του γένους *Hypericum*

Υποείδη	Φυτογεωγραφικές περιοχές												
	NE	**NC**	**NPi**	**SPi**	**EC**	**Ste**	**Pe**	**NAe**	**WAe**	**EAe**	**Kik**	**IoI**	**KK**
H. aciferum													*
H. amblycalyx													*
H. athoum	*							*					
H. delphicum									*		*		
H. elongatum ssp.*tymphresteum*						*							
H. empetrifolium ssp. *oliganthum*													*
H. empetrifolium ssp. *tortuosum*													*
H. fragile									*				
H. jovis													*
H. kelleri													*
H. taygeteum							*						
H. trichocaulon													*

Στους παραπάνω πίνακες Ε2 και Ε3 παρουσιάζεται η γεωγραφική εξάπλωση του κάθε είδους και υποείδους ανά φυτογεωγραφική περιοχή στην Ελλάδα. Τα περισσότερα ελληνικά ενδημικά είδη και υποείδη απαντώνται στη φυτογεωγραφική περιοχή ΚΚ (Κρήτη-Κάρπαθος, 7 είδη και υποείδη). Συνολικά τα περισσότερα είδη και υποείδη (ενδημικά και μη) απαντώνται στις περιοχές ΝΕ (βόρεια-ανατολική, 16 είδη και υποείδη) και ΚΚ (Κρήτη-Κάρπαθος, 16 είδη και υποείδη), ενώ σημαντικός αριθμός ειδών και υποειδών απαντώνται και στις περιοχές Pe (Πελοπόννησος, 12 είδη και υποείδη) και ΕΑe (νησιά ανατολικού Αιγαίου, 12 είδη και υποείδη).

Το γένος *Hypericum* έγινε ευρέως γνωστό λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του (Ciochina et al., 2003; Medina et al., 2006; Barnes et al., 2001). Τα εκχυλίσματα του φυτού περιέχουν το λιγότερο δέκα διαφορετικά συστατικά ή ομάδες συστατικών τα οποία συμβάλλουν στη φαρμακολογική δράση του φυτού. Τα κοινώς απαντώμενα συστατικά είναι οι φαινυλοπροπάνες, τα αιθέρια έλαια, τα παράγωγα αμινοξέων, οι ξανθόνες, οι τανίνες, οι προανθοκυανιδίνες κ.α., ενώ οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι ξεχωρίζουν στο *Hypericum sp.* είναι οι φλωρογλυκινόλες (υπερφορίνη **1**), οι πολυκυκλικές διόνες (υπερικίνη **2**) και τα φλαβονοειδή (κερκετίνη **3**) (Εικόνα Ε3) (Stojanovic et al., 2013).

Από όλα τα είδη του γένους, το *H. perforatum* κοινώς υπέρικο, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της αξιόλογης φαρμακολογικής δράσης του και της ευρύτερης χρήσης του στη λαϊκή θεραπευτική. Το βασικό δραστικό συστατικό του *H. perforatum,* είναι η υπερφορίνη (**1**), η οποία παρουσιάζει πολλές φαρμακευτικές ιδιότητες όπως αντικαταθλιπτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή και αντικαρκινική δράση (medina et al., 2006).



υπερφορίνη (1) **υπερικίνη (2)** **κερκετίνη (3)**

Εικόνα Ε3. Δομές της υπερφορίνης (**1**), της υπερικίνης (**2**) και της κερκετίνης (**3**)

1.2. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ *Hypericum perforatum*

Το υπέρικο είναι αειθαλές φυτό (Εικόνα Ε4) και έχει βλαστό όρθιο, ισχυρό, πολύκλαδο και φύλλα επιφυή, ελλειπτικά έως ωοειδή, σημαδεμένα με διαυγείς κηλίδες ωχρού πράσινου χρώματος (Εικόνα Ε5).

Εικόνες Ε4, Ε5. Πλήρες φυτό (Εικόνα Ε4) και φύλλα του *Hypericum perforatum* (Εικόνα Ε5)

Τα άνθη (Εικόνα Ε6) είναι αναρίθμητα, έντονου κίτρινου χρώματος, πυκνά, διχαλωτά σε ακραία φόβη, με διάμετρο από 0,5 έως 6 cm. Έχουν πέντε σέπαλα, λογχοειδή, συνδεδεμένα στη βάση, με έξι σκούρους χρωματιστούς αδένες και πέντε πέταλα (σπανίως 4), διπλάσια σε μήκος από τα σέπαλα, ωοειδή και αμβλεία. Το φυτό μπορεί να φτάσει σε ύψος έως και το 1 m σε ύψος.

Εικόνα Ε6. Άνθη του *H. perforatum*

Οι στήμονες είναι αναρίθμητοι, ενωμένοι στη βάση τους, χωρισμένοι ανά τρεις με μικρούς ανθήρες. Οι στύλοι τρεις, κοντοί, όρθιοι με μικρό στίγμα. Το φυτό ανθίζει από τον Ιούνιο ως το Σεπτέμβριο. Αναπαράγεται τόσο με σπόρους όσο και με ριζώματα. Ο καρπός έχει τη μορφή καψιδίου και χωρίζεται σε τρεις εσωτερικούς χώρους, μήκους 5-10 mm. ο οποίος ανοίγει για να απελευθερώσει τους σπόρους (Εικόνα Ε7). Ο κάθε σπόρος έχει καστανόμαυρο χρώμα, είναι

σχεδόν κυλινδρικός, μήκους 1 mm, συχνά καλυμμένος από το κολλώδες συστατικό του καψιδίου, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διασπορά και η διατήρηση του μέχρι την απελευθέρωση του έως και 4-6 μήνες αργότερα (Καββάδας, 1956).

Οι σπόροι είναι πολύ ανθεκτικοί και αν καταναλωθούν από ζώα παραμένουν άθικτοι στα κόπρανά τους. Βραχυχρόνια έκθεση σε φωτιά (100-140 °C) διευκολύνει τη βλάστηση, ενώ το περιβάλλον του χώματος πρέπει να είναι ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο. Αντίθετα, τα ιόντα ασβεστίου στο νερό φαίνεται να αναστέλλουν τη βλάστησή του. Το κάθε φυτό παράγει 15.000-33.000 σπόρους (Πηγή 4).

Εικόνα Ε7. Ο καρπός του *H. perforatum* (Πηγή5)

1.3. ΕΘΝΟΓΛΩΣΣΟΛΟΓΙΑ – ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΙΚΟΥ

Η επικρατέστερη ετυμολογική θεωρία για την ονομασία του υπέρικου είναι ότι προέρχεται από τις λέξεις < υπερ > + < εικων >, δηλαδή ότι το φυτό κρέμεται πάνω από τις θρησκευτικές εικόνες στο σπίτι, κατά τη διάρκεια της ημέρας του Αγίου Ιωάννη, για να αποκρούσει το κακό (Πηγή6). Το υπέρικο έχει πολλές ονομασίες ανάλογα με την προέλευση αυτών (Czygan, 2003). Όπως:

- Ονομασίες θρησκευτικής προέλευσης
- Ονομασίες σχετιζόμενες με τη μαγεία
- Ονομασίες για τις θεραπευτικές του ιδιότητες
- Ονομασίες σχετιζόμενες με τη βοτανική περιγραφή

1.3.1. Ονομασίες θρησκευτικής προέλευσης

Ονομασίες οι οποίες έχουν θρησκευτικό χαρακτήρα είναι: St John's wort, Johanniskraut (βότανο του Αγίου Ιωάννη) και Βοτάνι του Προδρόμου. Οι ονομασίες αυτές προέρχονται από το κάψιμο των ανθισμένων μπουκέτων του φυτού, την ημέρα μνήμης της γέννησης του Αγίου Ιωάννη του Βαπτιστή (24η Ιουνίου) και θεωρείτο ότι μπορούν να τραβήξουν το «*κακό*» της προηγούμενης χρονιάς.

1.3.2. Ονομασίες σχετιζόμενες με τη μαγεία

Ονομασίες σχετιζόμενες με τις μαγικές του ιδιότητες είναι οι εξής: κυνήγι του διαβόλου, fuga daemonum (φυγή δαιμόνων), herba che scacia i diavoli (φυτό το οποίο διώχνει τα δαιμόνια), teufelsflucht (φυγή του διαβόλου), hexenkraut (βότανο των ξωτικών), elfenblut (αίμα των ξωτικών) και βότανο της μάγισσας. Για τις παραπάνω «*μαγικές*» χρήσεις του, το υπέρικο συλλέγεται την παραμονή του Θερινού Ηλιοστασίου (21η Ιουνίου) ή ανήμερα πριν την ανατολή του ήλιου. Οι ανθισμένες κορυφές του φυτού τοποθετούνταν έξω από τις πόρτες των σπιτιών και στα παράθυρα, ώστε να τα προστατεύουν από τους κεραυνούς, τις μάγισσες και τα κακοποιά πνεύματα. Πιθανώς η εμφάνιση των

εντυπωσιακών κίτρινων ανθέων των φυτών κατά την περίοδο αυτή, ευθύνεται για την σύνδεσή του με τον ήλιο και τις σχετικές μαγικές ιδιότητες αποπομπής των σκοτεινών δαιμονικών επιρροών.

1.3.3. Ονομασίες για τις θεραπευτικές του ιδιότητες

Ονομασίες με θεραπευτικό χαρακτήρα είναι: Βαλσαμόχορτο, Λειχηνόχορτο, wundskraut (βότανο των πληγών), frauenkraut (βότανο των γυναικών) και toute-saine (πανάκεια για τις κακώσεις και τις φλεγμονές). Όλες οι παραπάνω ονομασίες σχετίζονται με την επουλωτική δράση του υπέρικου.

1.3.4. Ονομασίες σχετιζόμενες με τη βοτανική περιγραφή

Ονομασίες σχετιζόμενες με τη βοτανική περιγραφή είναι: millepertuis (χίλια ανοίγματα) και löcherkraut (βότανο με τρύπες). Σύμφωνα με μια γερμανική παράδοση ο διάβολος με μια βελόνα τρύπησε τα φύλλα του υπέρικου, όμως το φυτό ήταν τόσο δυνατό που άντεξε και μέχρι και σήμερα έχει στα φύλλα του, αυτές τις τρύπες. Επίσης, λόγω του σχήματος των φύλλων του ονομάστηκε και σπαθόχορτο.

1.4. ΙΣΤΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΥΠΕΡΙΚΟ

Το υπέρικο είναι γνωστό από την αρχαιότητα ως φαρμακευτικό φυτό. Με την πάροδο των αιώνων έχει αλλάξει αρκετές ονομασίες. Στο κείμενο «Περί Ύλης Ιατρικής» (Materia medica) ο Διοσκουρίδης, ο Πεδάνιος (40-90 μ.Χ.), παραθέτει πολλά συνώνυμα του υπέρικου, όπως ανδρόσαιμον, κόριον, χαμαίπιτυς και άσκυρον. Με το υπέρικο έχουν ασχοληθεί επίσης και πολλοί άλλοι μελετητές μεταγενέστερα. Συγκεκριμένα, ο Γαληνός (2ος αιώνας μ.Χ.) αναφέρει πως πρόκειται για ένα θαμνώδες φυτό και το ονομάζει ο κόρης ή η κορήν επειδή ο καρπός του φυτού είναι ίδιος με τον κοριό (Ιπποκράτους Γλωσσών Εξήγησης, 19.113).

Όσον αφορά τις φαρμακευτικές του ιδιότητες υπάρχει μια πλειάδα αναφορών με λεπτομερείς περιγραφές. Έτσι στο «Ιπποκρατικό Έργο» αναφέρεται η χρήση του σαν παυσίπονο σε περιπτώσεις ρήξης πνευμονικής αρτηρίας (Περί Νούσων, 2.54) και λυγγώδους πυρετού (Περί Νούσων, 2.64). Ο Διοσκουρίδης, ο Πεδάνιος, στο μνημειώδες έργο του «Περί ύλης Ιατρικής», αναφέρει ότι το υπέρικο:«*Έχει την ιδιότητα να προκαλεί τα ούρα και την έμμηνο ρύση, όταν εισάγεται με βύσμα, ενώ όταν πίνεται με κρασί θεραπεύει όσους έχουν ανά τέσσερις ημέρες πυρετό. Ο σπόρος, όταν πίνεται για σαράντα ημέρες, θεραπεύει τις ισχιαλγίες, ενώ τα φύλλα, αν γίνουν κατάπλασμα μαζί με τον σπόρο, θεραπεύουν τα εγκαύματα*».

Χρησιμοποιείτο επίσης και στη θεραπεία τεταρταίων πυρετών (ελονοσία). Η αντιπυρετική του χρήση επαναλαμβάνεται στο «Περί Απλών Φαρμάκων» του ίδιου συγγραφέα (2.20, 2.21, 2.22). Ακόμη, το σπέρμα του υπέρικου χορηγείται με νερό για την πλευρίτιδα. Στον Γαληνό επαναλαμβάνονται οι ίδιες αναφορές για τις ιδιότητες του ως απλό φάρμακο, δηλαδή διουρητικό και ξηραντικό, εμμηναγωγό, χλωρό κατάπλασμα, έμπλαστρο για εγκαύματα και θεραπεία ισχιαλγίας (Περί Κράσεως και Δυνάμεως των Απλών Φαρμάκων, 12.148). Στα κείμενα του Γαληνού αναφέρεται η εσωτερική χρήση για τη θεραπεία του ίκτερου (Περί Ευπορίστων, 14.377, 14.456). Επίσης, ο Πλίνιος στο Historiae naturalis το αναφέρει ως αντιδιαρροϊκό, βελτιωτικό της ροής των ούρων και την αντιμετώπιση των προβλημάτων της κύστης.

Μεταγενέστερα, οι μεσαιωνικοί συγγραφείς αντιγράφουν τις παρατηρήσεις των Αρχαίων Ελλήνων. Πιο αναλυτικά, ο Οριβάσιος (4° αιώνα) επαναλαμβάνει τις προτεινόμενες από το Γαληνό ενδείξεις του υπέρικου. Στα έγγραφα του Αέτιου παρατίθεται η «Ιερά Συνταγή» του Γαληνού, η οποία καταπολεμούσε τη θλίψη, την ατονία, την ανορεξία, την ημικρανία και τα εξανθήματα.

Το 16ο αι. ο Παράκελσος διάσημος ιατρός, βοτανολόγος και αλχημιστής, έγραψε: «*Ο Θεός έδωσε στο perforatum τη δύναμη να διώκει τα φαντάσματα της φύσης αλλά και παράσιτα, πληγές, κατάγματα οστών και όλα τα δεινά. Είναι πραγματικά οικουμενικό φάρμακο πέρα από κάθε δημιουργία του ανθρώπου*». Επέκτεινε δηλαδή τη χρήση του στη θεραπευτική αντιμετώπιση της κατάθλιψης και άλλων ψυχωτικών συμπτωμάτων που καλούσε «*φαντάσματα*».

Το έλαιο του υπερικού προστέθηκε, το 1616, στην πρώτη Φαρμακοποιία του Λονδίνου (Phermakopoeia Londinensis) ως "Oleum Hyperici" διότι είχε ισχυρές θεραπευτικές ιδιότητες σε πληγές. Επίσης, το υπέρικο χρησιμοποιείτο στην αντιμετώπιση των ψυχικών παθήσεων. Το 1630 ο Angelo Sala διατύπωσε ότι το υπέρικο είχε τη δυνατότητα να θεραπεύσει τις ασθένειες «*της φαντασίας, της μελαγχολίας, του άγχους και τις διαταραχές της νόησης*».

Η χρήση του υπέρικου είχε συσχετισθεί και με αστρολογικές δυνάμεις όταν η αστρολογία ήταν δημοφιλής στους δυτικούς πολιτισμούς (1480 έως 1680 μ.Χ.). Σύμφωνα με αυτή, το υπέρικο έπρεπε να συλλέγεται πάντα ημέρα Παρασκευή και την ώρα του πλανήτη Δία. Ακόμη και ο Παράκελσος συμφωνούσε με τη μυθική αυτή άποψη σύμφωνα με τον οποίο: «*αν θέλετε να το χρησιμοποιήσετε ενάντια στο κακό, να το συλλέγετε σύμφωνα με τις ουράνιες τροχιές και ιδιαίτερα σε ακολουθία με τον Άρη, τον Δία και την Αφροδίτη, αντίθετα με τη σελήνη και στην ανατολή του ηλίου*». Ο πλανήτης του υπερικού θεωρούνταν ο ήλιος και το στοιχείο του η φωτιά.

Από το 19ο αιώνα και έπειτα ήταν ιδιαίτερα δημοφιλές σε αγροτικές περιοχές και χρησιμοποιούταν για τη θεραπεία πληγών, προβλήματα του ουροποιητικού και γαστρεντερικού συστήματος, παθήσεις των νεφρών και των πνευμόνων αλλά και ως καταπραϋντικό των νεύρων. Ο κληρικός Sebastian Kniepp έγραψε ότι πιθανώς να βοηθά τη θεραπεία του ήπατος. Επίσης, στη γερμανική θεραπευτική χρησιμοποιήθηκε για τη προώθηση της εμμηνόρροιας

και τη θεραπεία μολύνσεων της μήτρας. Μια ακόμη ευρεία χρήση του ελαίου του υπέρικου ήταν στη θεραπεία εγκαυμάτων. Ο Samuel Hahnemann, το χρησιμοποιούσε ως βάμμα και αλοιφή για το δέρμα. Το 1986 στο Deutscher Arzneimittel Codex (Γερμανικός Κώδικας Φαρμάκων) αναγνώρισε το *Hypericum perforatum* ως το είδος από το οποίο λαμβάνεται το «*φάρμακο*».

Στην παραδοσιακή θεραπευτική συνεχίζει να διατηρεί τη φήμη του ως επουλωτικό, ενώ η δημοτική μούσα το ύμνησε ως βάλσαμο.

1.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΟΥ *Hypericum perforatum*

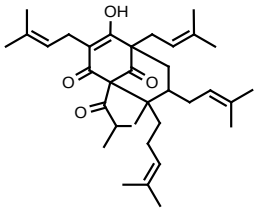
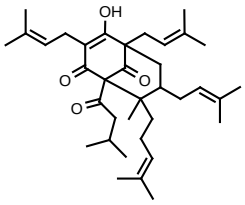
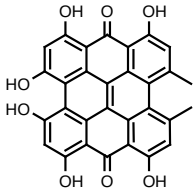
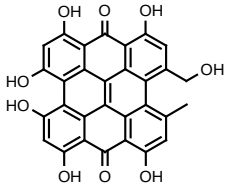
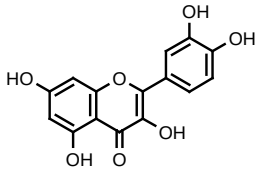
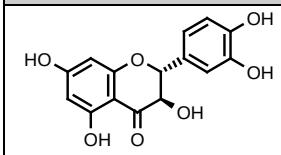
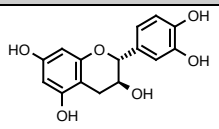
1.5.1. Τα κύρια συστατικά του υπέρικου

Η ανάπτυξη ενός βοτάνου και κατά συνέπεια η δραστικότητα του εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες (κυρίως βροχόπτωση και θερμοκρασία) της περιοχής όπου καλλιεργειται ή φύεται, από τα χαρακτηριστικά του εδάφους (όξινο ή ουδέτερο περιβάλλον, περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα) και από το υψόμετρο (περίπου 1200 μέτρα).

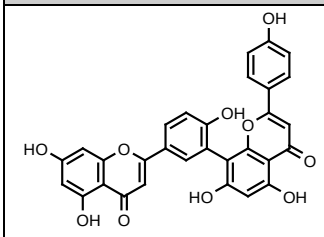
Η έρευνα των Murch (Murch et al., 2003) έδειξε την επίδραση στην ανάπτυξη και στη χημική σύσταση του συγκεκριμένου φυτού, της πιθανής μόλυνσης του εδάφους με ανόργανους ρύπους – βαρέα μέταλλα (π.χ. νικέλιο) με αποτέλεσμα την αρνητική επίπτωση στην ποιότητα, στην ασφάλεια και στη δραστικότητα σκευασμάτων του (Murch et al., 2003). Εξίσου σημαντικός είναι ο χρόνος και οι συνθήκες συλλογής του. Γενικότερα, φυτά που προορίζονται για φαρμακευτική χρήση θα πρέπει να συγκεντρώνονται κατά το άνοιγμα των ανθέων. Το υλικό της συλλογής πρέπει επίσης να ξηραίνεται γρήγορα αλλά και προσεκτικά, έτσι ώστε να διαφυλαχθεί το περιεχόμενο των εκκριτικών αδένων και να προληφθεί η αποσύνθεση των κύριων φυτοχημικών συστατικών του (Williams et al., 2006). Για το λόγο αυτό η θερμοκρασία ξήρανσης δεν πρέπει να ξεπερνά τους 30-40 °C. Αποξηραμένα φύλλα και στελέχη μπορούν να αντέξουν από 6 έως 9 μήνες, ενώ αντιθέτως για τα φρέσκα άνθη και φύλλα, η διάρκεια της δραστικότητας είναι το πολύ 3 ημέρες.

Το υπέρικο αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα είδη στο σύνολο των φαρμακευτικών φυτών. Τα κύρια συστατικά του υπέρικου αναφέρονται στον Πίνακα Ε4 (Ganzera et al., 2002) και αναλύονται οι φλωρογλυκινόλες και οι ναφθοδιανθρόνες (Βλ. 1.5.2 και 1.5.3). Στον Πίνακα Ε5 παρουσιάζεται η κατανομή ορισμένων ομάδων δευτερογενών μεταβολιτών στα διάφορα μέρη του φυτού.

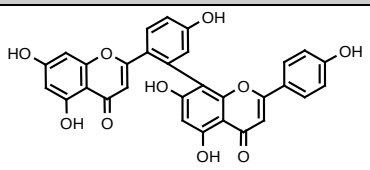
Πίνακας Ε4. Χημικές ομάδες του υπέρικου

Χαρακτηριστικές ενώσεις του *Hypericum perforatum*	
Φλωρογλυκινόλες	
	
υπερφορίνη (1)	**αδυπερφορίνη (4)**
Ναφθοδιανθρόνες	
	
υπερικίνη (2)	**ψευδοϋπερικίνη (5)**
Φλαβονοειδή	
	
κερκετίνη (3)	
Προανθοκυανιδίνες	
	
κατεχίνη (6)	**επικατεχίνη (7)**

Διφλαβόνες

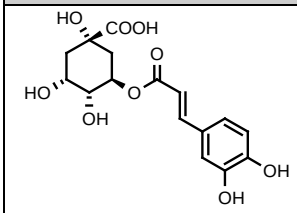


αμεντοφλαβόνη (8)

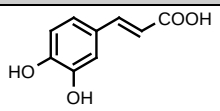


I3,II8-Διαπιγενίνη (9)

Φαινυλοπροπάνες

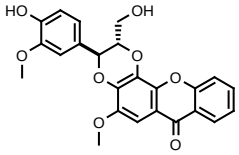


χλωρογενικό οξύ (10)

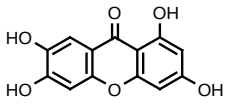


καφεΐκό οξύ (11)

Ξανθόνες

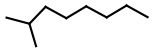


κιελκορίνη (12)

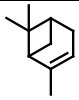


1,3,6,7- τετραυδροξυ-ξανθόνη (13)

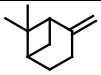
Συστατικά Αιθέριου ελαίου



2-μεθυλο-οκτάνιο (14)

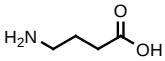


α-πινένιο (15)

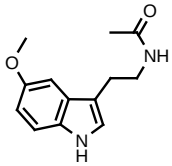


β-πινένιο (16)

Παράγωγα αμινοξέων

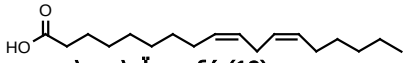


γ-αμινοβουτυρικό οξύ (17)

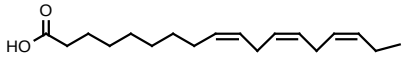


Μελατονίνη (18)

Λιπαρά οξέα



λινολεΐκο οξύ (19)



λινολενικό οξύ (20)

Πίνακας Ε5. Κατανομή ορισμένων χημικών συστατικών του υπέρικου στα διάφορα μέρη του φυτού (Linde, 2009).

Χημική ομάδα	**Χημικές ενώσεις**	**Μέρη φυτού**	**Δράση**
Φλωρογλυκινόλες (λιπόφιλες)	Υπερφορίνη (**1**) Αδυπερφορίνη (**4**)	Άνθη Φύλλα Βλαστός	Αντικαταθλιπτική Αντιφλεγμονώδης Αντιβακτηριακή Αντικαρκινική
Ναφθοδιανθρόνες (λιπόφιλες)	Υπερικίνη (**2**) Ψευδοϋπερικίνη (**5**)	Άνθη Βλαστός	Αντικαταθλιπτική Αντιϊκή Φωτοευαισθητοποιός
Φλαβονοειδή (λιπόφιλο/υδρόφιλο)	Κερκετίνη (**3**)	Φύλλα Βλαστός	Αντικαταθλιπτική Αντιφλεγμονώδης
Διφλαβόνες (λιπόφιλα)	Αμεντοφλαβόνη (**8**) Διαπιγενίνη (**9**)	Άνθη	Αντιφλεγμονώδης
Φαινυλοπροπάνες (υδρόφιλες)	Χλωρογενικό οξύ (**10**) Καφεϊκό οξύ (**11**)	Άνθη Φύλλα	Αντιοξειδωτική

1.5.2. Φλωρογλυκινόλες

Στην κατηγορία των φλωρογλυκινολών ανήκουν η υπερφορίνη (**1**) και η αδυπερφορίνη (**4**). Η υπερφορίνη (**1**) είναι το πιο γνωστό μέλος της οικογένειας των πολυκυκλικών πολυπρενυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών (ΠΠΑ) (Βλ. Κεφ. 1.6). Η υπερφορίνη (**1**) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1975 από την ομάδα του Bystrov. Η παραλαβή της (**1**) έγινε με εκχύλιση από το φυτό *H. perforatum* και ως εκ τούτου οφείλεται και το όνομά της (Bystrov et al., 1975). Είναι μία από τις βασικές βιοδραστικές ενώσεις και περιέχεται στα άνθη, στο βλαστό και στα φύλλα του φυτού.

Η υπερφορίνη (**1**) και η αδυπερφορίνη (**4**) είναι πολύ ευαίσθητες στην οξείδωση και ασταθείς σε διαλύματα ειδικά όταν εκτίθενται στο φως και στον αέρα (Liu et al., 2005). Η σημαντικότερη δράση της υπερφορίνης (**1**) είναι η αντικαταθλιπτική (Muller, 2003).

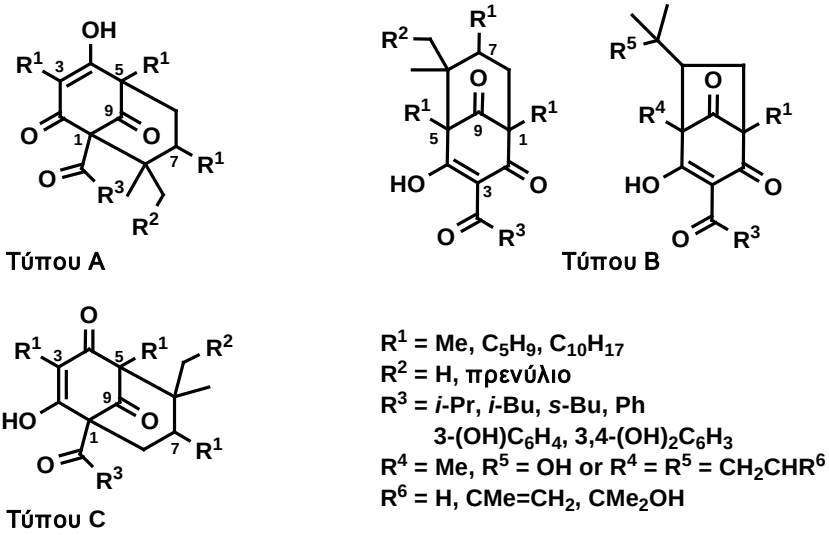
1.5.3. Ναφθοδιανθρόνες

Η υπερικίνη (**2**) και η ψευδοϋπερικίνη (**5**) είναι φυσικά προϊόντα και ανήκουν στις ναφθοδιανθρόνες. Είναι χαρακτηριστικά συστατικά του γένους *Hypericum* και απομονώθηκαν αρχικά από το *H. perforatum*. Η περιεκτικότητά τους στο φυτό κυμαίνεται από 0,05 έως 0,3% στα φύλλα και σε 1-14% στα άνθη, ανάλογα με το υψόμετρο, τις συνθήκες φωτός ή ακόμα και την περίοδο συλλογής (Sirvent et al., 2003). Στο χρώμα η υπερικίνη (**2**) και η ψευδοϋπερικίνη (**5**) μοιάζουν με την οξυαιμοσφαιρίνη του αίματος, με αποτέλεσμα τη βαφή των χεριών, κατά την επαφή. Από τις βιολογικές δράσεις της υπερικίνης (**2**) η αντιϊκή δραστηριότητα είναι η πιο γνωστή (Linde, 2009).

1.6. ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΕΣ ΠΟΛΥΠΡΕΝΥΛΙΩΜΕΝΕΣ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΕΣ (ΠΠΑ)

Οι Πολυκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες (ΠΠΑ) αποτελούν μια τάξη ενώσεων μοναδικής δομικής αρχιτεκτονικής και ενδιαφέρουσας βιολογικής δράσης. Οι ΠΠΑ απομονώνονται από φυτά των οικογενειών Clusiaceae, Hypericaceae και Guttiferae. Ο Grossman (Ciochina et al., 2006), σε ένα άρθρο ανασκόπησης παρουσίασε 120 ενώσεις, οι οποίες είχαν απομονωθεί και χαρακτηριστεί ως μέλη της ομάδας των ΠΠΑ. Από τότε μέχρι σήμερα συνεχώς απομονώνονται και χαρακτηρίζονται νέες ενώσεις της ομάδας αυτής. Το πιο γνωστό μέλος της οικογένειας είναι η υπερφορίνη (**1**), κυρίως λόγω της βιολογικής της δράσης, η οποία και περιγράφεται παρακάτω.

Από δομικής πλευράς, οι ΠΠΑ σχηματίζουν πολυοξυγονωμένους δικυκλο[3.3.1]εννεαν-2,4,9-τρικέτο ή δικυκλο[3.2.1]οκταν-2,4,8-τρικέτο ανθρακικούς σκελετούς που φέρουν ως υποκαταστάτες, πρενυλικές και γερανυλικές αλυσίδες (Εικόνα Ε9). Ταξινομούνται σε τρεις – τύπους, ανάλογα με τη θέση της άκυλο ομάδας στον ανθρακικό σκελετό καθώς και τη θέση του τεταρτοταγούς κέντρου της γέφυρας. Οι ΠΠΑ τύπου Α φέρουν την άκυλο ομάδα στον C_1 του ανθρακικού σκελετού κοντά στον τεταρτοταγή C_8, ενώ οι τύπου Β έχουν την άκυλο ομάδα στον C_3. Τέλος, οι πιο σπάνια απαντώμενες τύπου C ακυλοφλωρογλυκινόλες φέρουν την άκυλο ομάδα στον C_1 (Ciochina et al., 2006).

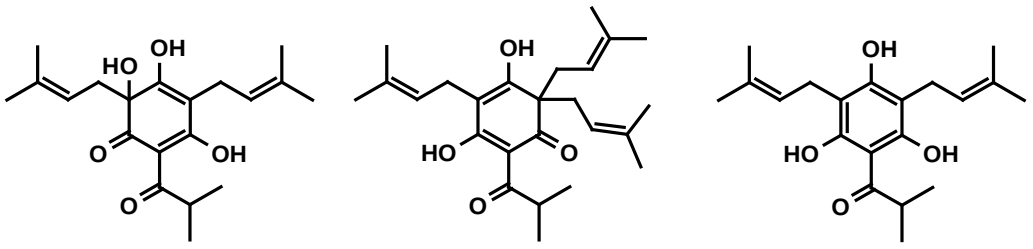


Εικόνα Ε9. Πολυκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες τύπου Α, Β και C

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα τελευταία χρόνια έχει επαναπροσδιοριστεί η δομή κάποιων από τις ΠΠΑ. Για παράδειγμα, οι επιστήμονες απομόνωσαν τη Νεμοροσόνη, την χαρακτήρισαν ως τύπου C, ενώ πρόσφατα επαναπροσδιορίστηκε η δομή της (Εικόνα Γ1, μέρος Γ) και ανήκει πλέον στις τύπου Α.

1.7. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ

Βιοσυνθετικά οι ΠΠΑ προέρχονται από τις λιγότερο πολύπλοκες Μονοκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες (ΜΠΑ) οι οποίες απομονώνονται από φυτά των οικογενειών Myrtaceae και Cannabaceae και διαθέτουν αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση (Mizobuchi et al., 1985; Zhao et al., 2005). Για παράδειγμα, από τον λυκίσκο (*Humulus lupulus*) έχουν απομονωθεί παράγωγα ακυλοφλωρογλυκινολών, όπως η κοχουμουλόνη (**21**) και η κολουπουλόνη (**22**) (Εικόνα Ε10) με κοινό βιοσυνθετικό ενδιάμεσο τη δεοξυκοχουμουλόνη (**23**), τα οποία εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση (Zuurbier et al., 1998).

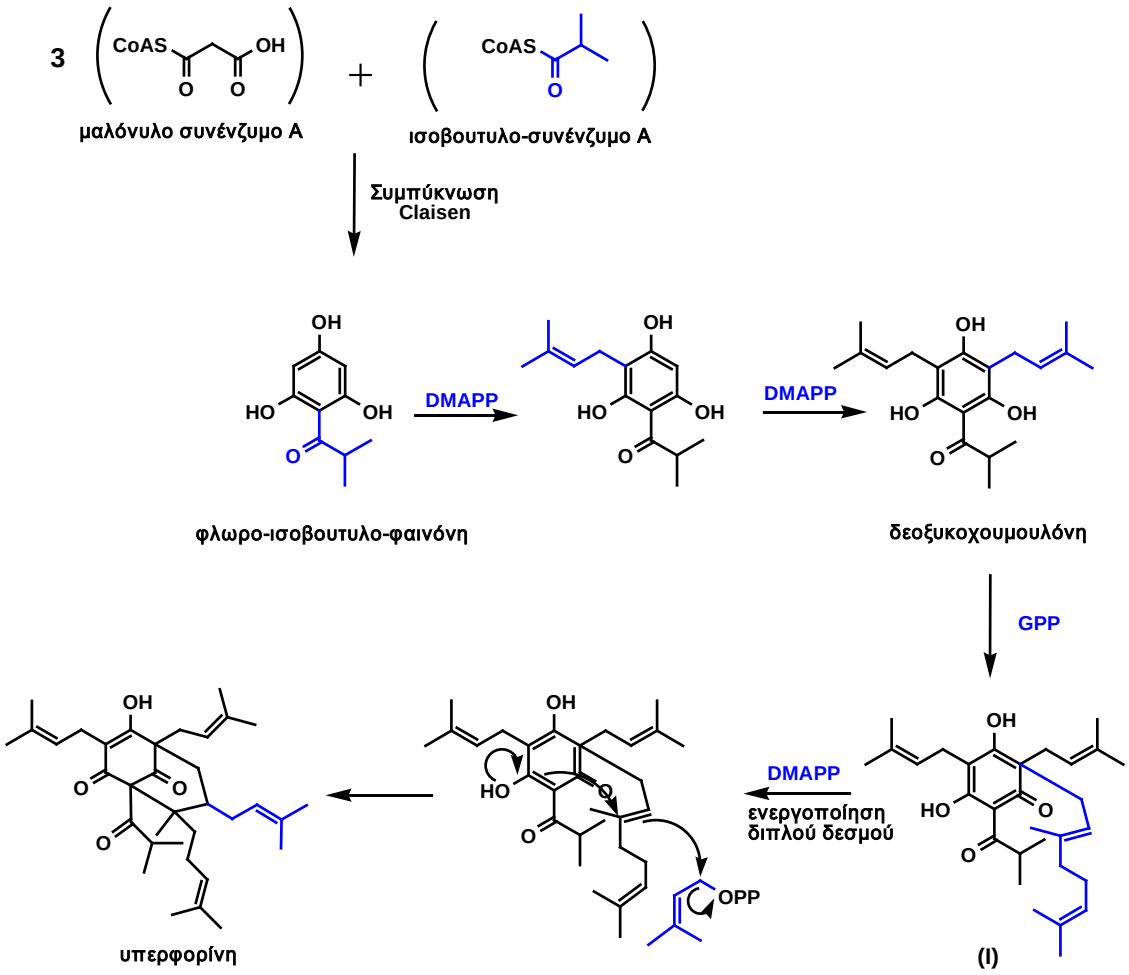


κοχουμουλόνη (21) κολουπουλόνη (22) δεοξυκοχουμουλόνη (23)

Εικόνα Ε10. Μονοκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες (ΜΠΑ) από τον λυκίσκο

Ο σχηματισμός της υπερφορίνης (**1**) μέσω ενζυμικών διαδικασιών δεν έχει αποδειχθεί πλήρως. Ωστόσο, ένας μηχανισμός, ο οποίος προτείνεται για την παραγωγή της είναι από το ισοβουτυλο-συνένζυμο Α ως αρχικό μόριο (Σχήμα Ε1). Αρχικά, ένα μόριο ισοβουτυλο-συνενζύμου Α και τρία μόρια μαλονυλο-συνενζύμου Α αντιδρούν και με τη βοήθεια της συνθάσης της ισοβουτυροφαινόνης (BUS), πραγματοποιείται συμπύκνωση Claisen η οποία παράγει την φλωρο-ισοβουτυλο-φαινόνη. Στη συνέχεια τρεις ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις με δύο διμεθυλ-αλλυλο-διφωσφορικές μονάδες (DMAPP) και με ένα μόριο διφωσφορικού γερανυλίου (GPP) σχηματίζουν το ενδιάμεσο μόριο (Ι). Ένα τρίτο μόριο DMAPP μέσω ηλεκτρόφιλης προσθήκης στο 2'-3' διπλό δεσμό της (προϋπάρχουσας) αλυσίδας γερανυλίου ενεργοποιεί το δακτύλιο, προκαλώντας κυκλοποίηση και τον σχηματισμό του χαρακτηριστικού δικυκλικού συστήματος της υπερφορίνης (**1**). Το DMAPP είναι ο μεσολαβητής

για όλες τις αντιδράσεις προσθήκης υδρόφοβων μορίων και είναι ο δότης πρενυλίων, ενώ η φλωρο-ισοβουτυλο-φαινόνη είναι ο δέκτης (Adam et al., 2009; Beerhues, 2006).



Σχήμα Ε1. Βιοσύνθεση της υπερφορίνης (**1**)

1.8. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ

1.8.1. Αντικαταθλιπτική δράση

Το κύριο συστατικό του *H. perforatum* με αντικαταθλιπτική δράση είναι η υπερφορίνη (**1**) (Laakmann et al., 1998; Briskin, 2000; Di Carlo et al., 2001; Muller, 2003).

Πολλά από τα φάρμακα για την κατάθλιψη συμπεριφέρονται ως εκλεκτικοί αναστολείς της επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών, δρώντας ως ανταγωνιστικοί αναστολείς στο σημείο δέσμευσης των νευροδιαβιβαστών. Η υπερφορίνη (**1**) είναι ένα εξαιρετικό μόριο με ευρύ φάσμα ανασταλτικών αποτελεσμάτων, επιδρώντας στην επαναπρόσληψη πέντε νευροδιαβιβαστών, της σεροτονίνης, της ντοπαμίνης, της νοραδρεναλίνης, της γλουταμάτης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) με όμοια αποδοτικότητα (Muller, 2003; Singer et al., 1999; Di Carlo et al., 2001).

Η κινητήρια δύναμη όλων των μηχανισμών επαναπρόσληψης νευροδιαβιβαστών είναι η διαφορά των ιόντων νατρίου μεταξύ υψηλής εξωκυτταρικής και χαμηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης νατρίου. Οι πρωτεΐνες-μεταφορείς οδηγούνται από αυτή την κλίση νατρίου, με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε ο νευροδιαβιβαστής πρακτικά ωθείται μέσα στο κύτταρο μέσω των δεσμών του με τα ιόντα. Ο κύριος τρόπος δράσης της υπερφορίνης (**1**) είναι η μείωση της διαφοράς των ιόντων νατρίου, με την ενεργοποίηση ενός μηχανισμού ο οποίος οδηγεί σε αναστολή της πρόσληψης. Το μόριο της υπερφορίνης (**1**) δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τους νευροδιαβιβαστές, αλλά αυξάνει τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού νατρίου αναστέλλοντας έτσι την επαναπρόσληψη των νευροδιαβιβαστών (Singer et al., 1999; Muller et al., 2001).

Μία άλλη δράση της υπερφορίνης (**1**) είναι ότι εμποδίζει την συσσώρευση της β- αμυλοειδούς πρωτείνης στον εγκέφαλο καθυστερώντας την εμφάνιση της νόσου Alzheimer (Froestl et al., 2003; Hendriksen et al., 2002).

1.8.2. Προφλεγμονώδη - Αντιφλεγμομώδη δράση

Οι μελέτες οι οποίες έχουν γίνει για την εκτίμηση της αντιφλεγμονώδους δράσης της υπερφορίνης (**1**) είναι σχετικά λίγες, σε σύγκριση με την εκτεταμένη έρευνα για τη μελέτη των αντικαταθλιπτικών ιδιοτήτων της.

Τα λιπόφιλα εκχυλίσματα του υπέρικου, τα οποία περιέχουν υπερφορίνη (**1**), έχουν προταθεί για την επούλωση πληγών ή δερματικών αλλοιώσεων και εγκαυμάτων ή ατοπικών δερματίτιδων, λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης της (Maisenbacher and Kovar, 1992; Medina et al., 2006).

Αν και τα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα του υπέρικου έχουν αποδοθεί κυρίως στον ανασταλτικό ρόλο της κερκετίνης στη μεταγωγή μηνυμάτων των προφλεγμονωδών μονοπατιών (Tedeschi et al., 2003), πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι βασικό ρόλο παίζει τελικά η υπερφορίνη (**1**). Επίσης, έχει αναφερθεί η παρεμποδιστική δράση της υπερφορίνης (**1**) στον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων (Schempp et al., 2000).

Κλινικές έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερφορίνη (**1**) μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά για ήπιας μορφής δερματίτιδες (Schempp et al., 2003).

Τέλος, μελέτες έχουν δείξει τη συνεργιστική δράση της υπερφορίνης (**1**) με άλλους προφλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις παράγοντες οι οποίοι οδηγούν στην παρεμπόδιση του σχηματισμού των ριζών οξυγόνου (Feisst and Werz, 2004).

1.8.3. Αντιβακτηριακή δράση

Στις αρχές του 1970, Ρώσοι επιστήμονες διατύπωσαν ότι στο εκχύλισμα του υπέρικου περιέχεται μια αντιβιοτική ουσία (Gurevich et al., 1971), το όνομα της οποίας ήταν υπερφορίνη (**1**) (Gurevich et al., 1971). Το 1975 η ίδια ομάδα προσδιόρισε την χημική της δομή (Bystrov et al., 1975).

Σήμερα έχει επιβεβαιωθεί ότι η υπερφορίνη (**1**) έχει αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε ανθεκτικά στελέχη του *Staphylococcus aureus* και σε άλλα Gram-θετικά βακτήρια, χωρίς όμως να έχει ανάλογες ιδιότητες εναντίον Gram-αρνητικών βακτηρίων ή μυκήτων (π.χ. ενάντια στον *Candida albicans*) (Schempp et al., 1999).

1.8.4. Αντικαρκινική δράση

Έχει διαπιστωθεί και η αντικαρκινική δράση της υπερφορίνης (**1**), η οποία βασίζεται σε επιμέρους επιδράσεις όπως στην παρεμπόδιση σχηματισμού ή ανάπτυξης όγκου, στην παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στην ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών και στην παρεμπόδιση μεταστάσεων.

Παρεμπόδιση σχηματισμού ή ανάπτυξης όγκου

Είναι γεγονός ότι τα εκχυλίσματα του υπέρικου είναι ισχυροί αναστολείς του ανθρώπινου ενζύμου CYP1A1 το οποίο σχετίζεται με την καρκινογέννεση (Schwarz et al., 2003).

Παρεμπόδιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Η υπερφορίνη (**1**) είναι αποδεδειγμένο ότι μειώνει δραστικά τον πολλαπλασιασμό πολλών καρκινικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων του μαστού (MT-450, MDA-MB-468, MDA-MB-231 και MCF-7 κυττάρων), το καρκίνωμα των επιθηλιακών κυττάρων (A-431), του κακοήθους μελανώματος (HT-144), του κακοήθους όγκου στα νευρογλοία (LN229), του σαρκώματος (HT-1080), της λευχαιμίας (K562) και του λεμφώματος (U937) (Schempp et al., 2002; Hostanska et al., 2003; Dona et al., 2004).

Ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ονομάζεται απόπτωση. Ο σχηματισμός ενός όγκου είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ του ρυθμού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου των κυττάρων. Επομένως μια αποτελεσματική αντικαρκινική ουσία, θα πρέπει να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου ή/και να ενεργοποιεί τον κυτταρικό θάνατο των κυττάρων του όγκου. Μια χαρακτηριστική ιδιότητα πολλών καρκινικών κυττάρων είναι ότι έχουν χάσει την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη δική τους απόπτωση.

Η υπερφορίνη (**1**) μπορεί να επάγει απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα (Schempp et al., 2002; Hostanska et al., 2003; Dona et al., 2004). Σε όλα τα πειράματα με καρκινικά κύτταρα η υπερφορίνη (**1**) επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της ενεργοποίησης των κασπασών έναρξης (κασπάση 8, 9) ή εκτέλεσης (κασπάση 3) (Schempp et al., 2002; Hostanska et al., 2003).

Παρεμπόδιση μεταστάσεων

Σε σχετικές εργασίες έχει αποδειχθεί η ικανότητα της υπερφορίνης (**1**), ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, να παρεμποδίζει την μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας δραστικά την έκκριση διάφορων ενζύμων όπως των μεταλλοπρωτεϊνασών 2 και 9 (MMP-2 και MMP-9) ή παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των κινασών ERK 1/2. Τέλος, σε *in vivo* μοντέλα καρκινικής μετάστασης, καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 300 nmol υπερφορίνης (**1**) είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του μεγέθους και αριθμού των μεταστάσεων με σημαντική μείωση της φλεγμονώδους διεισδύσεως (Dona et al., 2004).

1.8.5. Παρεμπόδιση αγγειογέννεσης

Η υπερφορίνη (**1**) εμποδίζει την αγγειογέννεση τόσο in vitro όσο και in vivo και αναστέλλει την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δημιουργία των τριχοειδών αγγείων. Επίσης, αναστέλλει την παραγωγή και την έκκριση της μεταλλοπρωτεινάσης 2 και της ουροκινάσης. Τέλος, η υπερφορίνη (**1**) αναστέλλει την μετανάστευση και την εισβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων (Martinez-Poveda et al., 2005).

1.9. ΝΟΜΙΚΟ ΚΑΘΕΣΤΩΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Η αρμόδια γερμανική επιτροπή (German Commission E) ενέκρινε το σκεύασμα του υπέρικου το 1984. Ακολούθησε η μονογραφία του φυτού, από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, με αποτέλεσμα τη διακίνηση σκευασμάτων του υπέρικου και σε άλλες χώρες της Ευρώπης (Ελβετία, Γαλλία και Ηνωμένο Βασίλειο) ως συμπληρώματα διατροφής και μη συνταγογραφούμενα σκευάσματα.

Τόσο στην Ευρώπη όσο και στις ΗΠΑ τα σκευάσματα του υπέρικου κατατάσσονται στα συμπληρώματα διατροφής και όχι στα φάρμακα. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπόκεινται στους εκτεταμένους προκλινικούς και κλινικούς ελέγχους, αλλά κυκλοφορούν και πωλούνται με ελάχιστους κανόνες και περιορισμούς. Συνεπώς, όπως και τα συμπληρώματα διατροφής, τα σκευάσματα του υπέρικου έχουν μόνο αριθμό γνωστοποίησης. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, η περιεκτικότητα σε υπερικίνη (**2**) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,08 % και η περιεκτικότητα σε υπερφορίνη (**1**) θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 0,3 %.

Τα σκευάσματα του υπέρικου χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των διαταραχών, οι οποίες προκαλούνται από κατάθλιψη, όπως «επεισόδια ήπιων καταθλιπτικών διαταραχών ή ήπια καταθλιπτικά επεισόδια» και αποτελούν μία εναλλακτική λύση έναντι των συνθετικών αντικαταθλιπτικών για τις ήπιες διαταραχές.

Ενδεικτικά, τα πιο γνωστά εμπορικά σκευάσματα του υπέρικου στην Ευρώπη είναι (Wurglics and Schubert-Zsilavecz, 2004):

- Jarsin 300 (2,2 - 3,1 % υπερφορίνη και 1,8 – 2,7 % υπερικίνη)
- Neuroplant 300 (3,9 - 4,3 % υπερφορίνη και 1,1 – 2,0 % υπερικίνη)
- Texx 300 (1,7 - 3,2 % υπερφορίνη και 2,3 – 3,0 % υπερικίνη)
- Felis 425 (1,9 - 3,4 % υπερφορίνη και 2,2 – 3,7 % υπερικίνη)
- Helarium 425 (0,9 - 3,9 % υπερφορίνη και 2,1 – 3,9 % υπερικίνη)
- Futuran (0,9 – 1,8 % υπερφορίνη και 2,4 – 2,8 % υπερικίνη)

Όπως αναφέρθηκε τα κύρια συστατικά του υπέρικου (υπερφορίνη και υπερικίνη) είναι ασταθή στο φως, τη θερμότητα, τον αέρα και την υγρασία. Για τους λόγους αυτούς η μέθοδος φύλαξης παίζει πρωτεύοντα ρόλο στη διατήρηση της δραστικότητας των σκευασμάτων: θα πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου, προφυλαγμένα από τη ζέστη, την υγρασία και την ηλιακή ακτινοβολία.

1.9.1. Ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση του υπέρικου

Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες παρενέργειες είναι:

- Αλλεργικές αντιδράσεις
- Ζάλη / Σύγχυση
- Πονοκέφαλος
- Αϋπνία
- Τρόμος
- Κνησμός
- Φωτοφοβία
- Απάθεια
- Γαστρεντερικά συμπτώματα (ναυτία, κοιλιακά άλγη, απώλεια όρεξης, διάρροια)
- Κόπωση / Καταστολή
- Ξηροστομία
- Νευρικότητα / Ανησυχία
- Δερματικές αντιδράσεις
- Ψυχιατρικές διαταραχές
- Ηλιακά εγκαύματα

Πιο αναλυτικά:

Μια σοβαρή παρενέργεια είναι η φωτοευαισθησία, η οποία όμως εμφανίζεται εξαιρετικά σπάνια. Οι αντιδράσεις φωτοευαισθησίας είναι δοσοεξαρτώμενες και απαιτούνται πολύ υψηλές δόσεις για να εμφανιστούν, μετά από έκθεση στον ήλιο. Τα συμπτώματα εκδήλωσης της φωτοευαισθησίας είναι δερματικά εξανθήματα, εγκαύματα και κνησμός.

Στα πρόβατα και στα άλογα το υπέρικο προκαλεί φωτοτοξικότητα η οποία επιφέρει δερματίτιδα γύρω από το λαιμό και το πρόσωπο τους, γνωστή με το όνομα «φουκάλιασμα» (Εικόνα Ε8). Η δερματίτιδα εμφανίζεται μετά από κατανάλωση των τρυφερών φυτών του υπέρικου και ταυτόχρονη έκθεση στο φως (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999).

Εικόνα Ε8. Δερματίτιδα σε πρόβατο (Πηγή 7)

1.9.2. Παραδοσιακή θεραπευτική

Τα βασικά παρασκευάσματα του φυτού διακρίνονται σε εγχύματα, εκχυλίσματα, βάμματα, οίνους, έλαια, ηδύποτα και αφεψήματα. Παρακάτω αναφέρονται συνταγές και δοσολογία των βασικών παρασκευασμάτων:

- **Έγχυμα:** 1-2 κουταλάκια ψιλοκομμένο φυτό ή φύλλα σε ένα φλιτζάνι βραστό νερό, για τα παιδιά με ακράτεια ούρων κατά τη διάρκεια της νύχτας (Μπαζαίος, 1986).

- **Το υγρό εκχύλισμα:** 100–200 gr. αποξηραμένα άνθη σε 335 mL βότκα και 165 ml νερό, για δύο μήνες σε σφραγισμένο βάζο, στο σκοτάδι. Για την καταπολέμηση της γρίπης χορηγείται, ένα τέταρτο της κουταλιάς του γλυκού (Grieve, 1973).

- **Οινοπνευματώδες βάμμα:** 16-32 σταγόνες μέσα σε καθαρό οινόπνευμα, κατά της φυματίωσης και σαν αντιπυρετικό (Πρινέας και Σφακιανάκης, 1948).

- **Οίνος:** 32 gr. του φυτού σε 1 lt λευκού κρασιού. Χορηγούνται 48-96 ml ημερησίως, κατά της ελονοσίας (Πρινέας και Σφακιανάκης, 1948).

- **Έλαιο:** κατεργασία των ανθέων μέσα σε ελαιόλαδο 10%, για εντριβές και επαλείψεις (Πρινέας και Σφακιανάκης, 1948). Άλλη παρασκευή του ελαίου: οι ανθισμένες κορυφές εμβαπτίζονται σε ελαιόλαδο για δύο μήνες, κατόπιν εκτίθενται στον ήλιο και όταν αλλάξει το χρώμα σε κόκκινο, το μίγμα φιλτράρεται με ύφασμα (Stary, 1991).

- **Το ηδύποτο *Ratafia*:** παρασκευάζεται με 32 gr. ανθέων και 480 ml ρακί. Τα υλικά τοποθετούνται μέσα σε καλά κλεισμένη φιάλη, και εκτίθεται στον ήλιο για 15-20 ημέρες, κατόπιν φιλτράρεται και προστίθενται 64 gr. ζάχαρης (Πρινέας και Σφακιανάκης, 1948).
- **Αφέψημα:** Μία κοφτή κουταλιά ανθισμένων κορυφών σε ένα φλιτζάνι νερό. Χορηγείται ένα φλιτζάνι ημερησίως (Πρινέας και Σφακιανάκης, 1948). Το αφέψημα αναφέρεται ως επουλωτικό και αντισηπτικό παρασκεύασμα (Georgiades, 1987). Επίσης παρασκευάζεται με 15-30 gr. ανθισμένων κορυφών σε 1 lt νερού ή 3 κουταλιές φυτού σε 500 ml νερού και δοσολογία 1 ζεστό ποτήρι κάθε πρωί (Ζαχαρόπουλος, 1972) ή 28 gr. του φυτού σε 470 ml νερού, από το οποίο λαμβάνονται 1-2 κουταλάκια (Grieve, 1973).

Η προτεινόμενη δοσολογία της εσωτερικής χορήγησης του βάλσαμου είναι 6-8 σταγόνες επάνω σε ζάχαρη, για πόνους του στομάχου, εντέρων, αεροφαγία, ηπατικές παθήσεις. Εξωτερικώς χρησιμοποιείται σε αρθρίτιδες, ρευματοειδείς αρθρίτιδες, τραύματα, μώλωπες και εγκαύματα (Ανάσης, 1959).

Στα παλαιά συνταγολόγια συνιστάται επίσης ως συστατικό αντινεφριτίκών και αντικαχεκτικών σιροπιών, καθώς και στη σύνθεση μιας σκόνης του Pelmarius, η οποία χρησιμοποιείτο και κατά της λύσσας (Πρινέας και Σφακιανάκης, 1948).

Από πλευράς Ομοιοπαθητικής χρησιμοποιείται το βάμμα σε περιπτώσεις τραυματισμών των νεύρων, ιδιαίτερα στα δάχτυλα και στα νύχια, εξαιτίας σύνθλιψης, αίσθησης μουδιάσματος ή μυρμηγκιάσματος, διατρητικών τραυμάτων, αιμορροΐδων και σπασμωδικού άσθματος (Boericke, 1927). Τέλος, αναφέρεται η χρήση του σε περιπτώσεις κατάθλιψης μετά από τραύματα ή χειρουργικές επεμβάσεις (Dubey, 1990).

2. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

Με τη κοινή ονομασία «*κουνούπια*» ονομάζουμε τα έντομα της Οικογένειας Culicidae της Τάξης των Διπτέρων (Diptera), της ομοταξίας (Κλάσης) των Εντόμων (Insecta).

Τα Δίπτερα είναι μια από τις μεγαλύτερες τάξεις εντόμων, σε αριθμό ειδών και αναμφισβήτητα είναι η σημαντικότερη Τάξη από υγειονομική άποψη. Το κύριο μορφολογικό χαρακτηριστικό των διπτέρων, στο οποίο οφείλουν και το όνομά τους, είναι η παρουσία ενός μόνο ζεύγους μεμβρανωδών πτερύγων, στο μεσοθώρακα. Το δεύτερο ζεύγος πτερύγων έχει μετατραπεί, κατά τη διαδικασία της εξέλιξης, σε ένα ζεύγος ροπαλοειδών οργάνων, γνωστά ως «αλτήρες». Η Τάξη των διπτέρων διαιρείται σε δυο Υποτάξεις, στα Βραχύκερα (Brachycera) με 110 Οικογένειες και στα Νηματόκερα (Nematocera) με 26 Οικογένειες.

Τα Νηματόκερα, στα οποία ανήκουν και τα Culicidae, οφείλουν το όνομά τους στις νηματοειδείς κεραίες και ανάλογα με τις διάφορες συστηματικές προσεγγίσεις, χωρίζονται σε τέσσερις έως επτά διαφορετικές υπο-υποτάξεις (Becker et al., 2003).

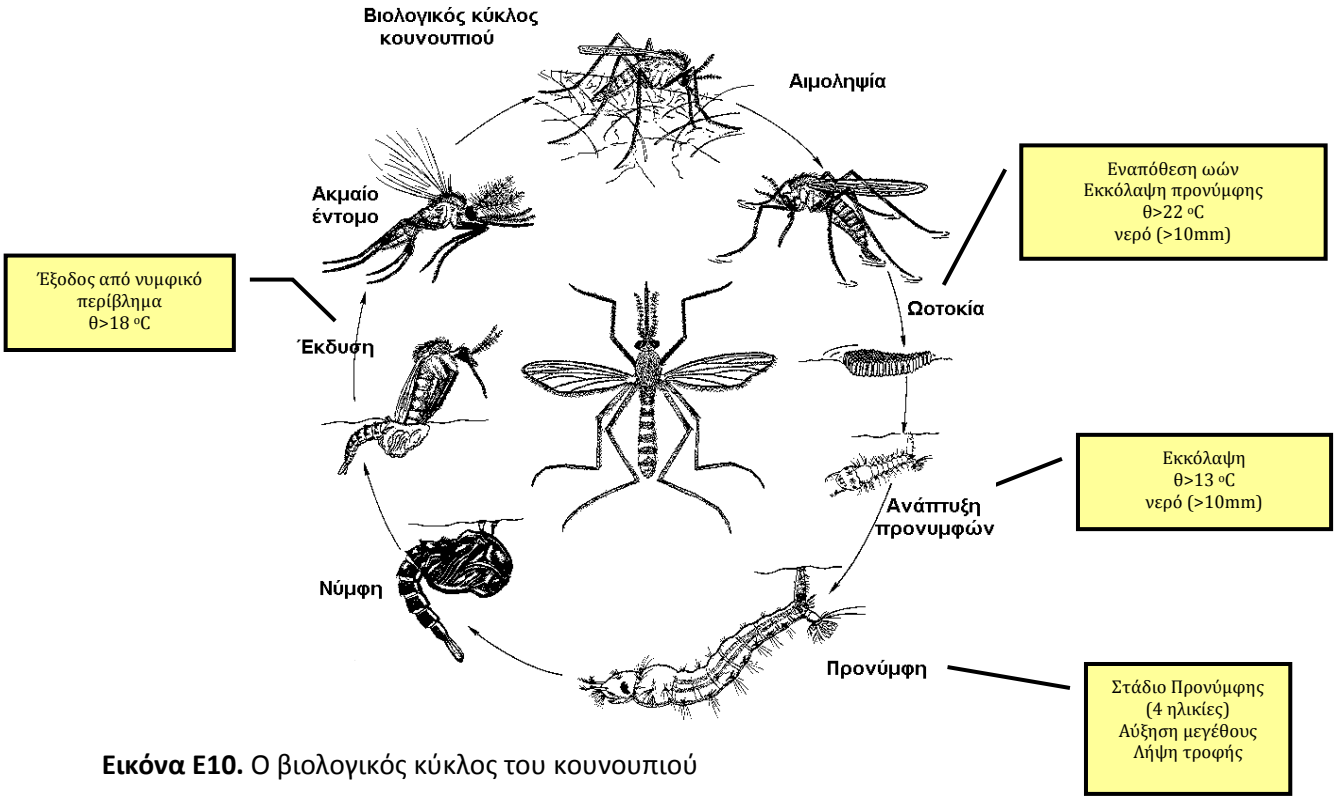
Σήμερα αναγνωρίζονται επίσημα 3.517 διαφορετικά είδη κουνουπιών παγκοσμίως (Harbach and Howard 2007; Becker et al., 2010). Στην ελληνική γλώσσα, για τα κουνούπια της Υποοικογένειας Anophelinae έχει επικρατήσει η κοινή ονομασία «ανωφελή» ενώ με τον όρο «κοινά» ονομάζονται τα κουνούπια της Υποοικογένειας Culicinae (Μπέτζιος, 1989; Εμμανουήλ, 1999; Σαββοπούλου-Σουλτάνη, 1999; Χανιώτης 2001).

Τα κουνούπια, έχουν χαρακτηριστεί ως *«τα έντομα με τη σπουδαιότερη Ιατρική σημασία»* και σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, είδη αρθροπόδων χαίρουν διεθνώς, τη μεγαλύτερη προσοχή από ερευνητές ή επιστήμονες διαφόρων κλάδων.

2.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ – ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Τα κουνούπια όπως έχει ήδη αναφερθεί ανήκουν στην Τάξη των διπτέρων (Diptera) και ως εκ τούτου είναι έντομα ολομετάβολα, δηλαδή ο βιολογικός τους κύκλος ολοκληρώνεται σε διαδοχικά στάδια και χαρακτηρίζονται από πλήρη μεταμόρφωση και ως εκ τούτου, η βιολογία του εντόμου διαφέρει σημαντικά από στάδιο σε στάδιο.

Το θηλυκό έντομο μετά τη γονιμοποίηση από το αρσενικό, την αιμοληψία και την ωρίμαση των ωών μέσα στη ωοθήκη αποθέτει τα ωά του σε κατάλληλη για το είδος υδάτινη εστία. Τα ωά μετά από κάποιο χρόνο εκκολάπτονται σε προνύμφες (larvae) εντός του ύδατος της εστίας. Οι προνύμφες αφού συμπληρώσουν την ανάπτυξή τους και μετά από τέσσερις εκδύσεις (ηλικίες), μεταμορφώνονται σε νύμφες (pupae) και αυτές μετά από κάποιο χρονικό διάστημα μεταμορφώνονται σε τέλεια αρσενικά ή θηλυκά κουνούπια. Σε σύντομο χρονικό διάστημα και πριν απομακρυνθούν από τις εστίες ανάπτυξής τους τα θηλυκά γονιμοποιούνται από τα αρσενικά και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.



Εικόνα Ε10. Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού

Ο βιολογικός κύκλος των κουνουπιών ολοκληρώνεται σε διάστημα 2-4 εβδομάδων (Εικόνα Ε10), ανάλογα με το είδος και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Για την ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου χρειάζεται απαραιτήτως η παρουσία υδάτινου περιβάλλοντος αφού η εκκόλαψη των ωών γίνεται πάντα στο νερό ενώ τα στάδια της προνύμφης και της νύμφης είναι αποκλειστικά υδρόβια.

Τα ωά των κουνουπιών είναι ποικιλόμορφα και μικροσκοπικά (έως 1 mm). Κατά τη στιγμή της εναπόθεσης τα ωά είναι λευκά ή ανοιχτόχρωμα, αργότερα γίνονται σκοτεινόχρωμα ή μελανά. Τα ωά των κουνουπιών του γένους *Culex* και σε ορισμένα άλλα γένη (*Culiseta*, *Mansonia,* κ.α.) είναι ενωμένα σε ομάδες και ονομάζονται «σχεδίες» (egg rafts). Από τα ωά αυτά, οι προνύμφες, εκκολάπτονται όταν κατακλυστούν με νερό.

Τα ωά των Culicidae συχνά δίδουν προνύμφες εντός 48 ωρών. Οι προνύμφες είναι πάντα υδρόβιες, παρουσιάζουν γρήγορη κίνηση με χαρακτηριστικό στριφογύρισμα της κοιλιάς. Το προνυμφικό στάδιο (4 ηλικίες) ανάλογα με το είδος, τη θερμοκρασία του νερού, την ποσότητα και ποιότητα της διαθέσιμης τροφής διαρκεί περίπου 7-10 ημέρες, όπου πραγματοποιείται η απόρριψη του εξωτερικού περιβλήματος (έκδυση) και η μεταμόρφωσή της σε νύμφη.

Οι νύμφες είναι χαρακτηριστικά κυρτές (μοιάζουν με κόμμα) και ζουν και αυτές μέσα στο νερό. Επίσης, ένα χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι κινούνται αρκετά ζωηρά, ενώ όταν ενοχληθούν εκτελούν πλήρη αναστροφή. Κατά το μεγαλύτερο διάστημα παραμένουν στην επιφάνεια του νερού. Η διάρκεια του νυμφικού σταδίου είναι 1-3 ημέρες.

Τα τέλεια έντομα είναι σχετικώς μικρά (μήκος 3-6 mm σπανίως έως 9 mm), με σώμα λεπτό και μακριά πόδια. Η κοιλιά είναι μακριά και λεπτή, οι πτέρυγες λεπτές, διαφανείς με χαρακτηριστική νεύρωση και με λέπια στα νεύρα και στην περιφέρεια, η οποία φέρει σμήριγγες σε σχήμα «κροσσού». Οι κεραίες στα αρσενικά είναι περισσότερο πτεροειδείς (φουντωτές), απ’ ότι τα στα θηλυκά. Οι οφθαλμοί είναι καλά ανεπτυγμένοι. Μόνο τα θηλυκά είναι αιμομυζητικά, αφού το αίμα τους είναι απαραίτητο για την ωρίμανση των ωών και συνήθως προηγείται μια τουλάχιστον αιμοληψία πριν από κάθε ωοτοκία. Αμφότερα, θηλυκά και αρσενικά, για τις διάφορες δραστηριότητες τους (πτήση, σύζευξη

και ωοτοκία), έχουν την ανάγκη σακχαρούχων ουσιών ως πηγή ενέργειας. Τέτοιες ουσίες επιζητούν και βρίσκουν στο νέκταρ των λουλουδιών, στις εκκρίσεις των δένδρων και στα φύλλα των φυτών, στα ώριμα φρούτα και στις εκκρίσεις ορισμένων εντόμων (αφίδες).

2.2. ΕΣΤΙΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ

Το νερό είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών αφού τα στάδια της προνύμφης και της νύμφης απαιτούν την παρουσία του. Οι εστίες ανάπτυξης των προνυμφών παρουσιάζουν πολύ μεγάλη διαφοροποίηση ως προς την ποιότητα και την ποσότητα του νερού αλλά και το είδος της βλάστησης. Τα κουνούπια πρακτικά μπορούν να αναπτυχθούν στο σύνολο σχεδόν των υδάτινων οικοσυστημάτων του πλανήτη. Οι διάφορες εστίες είναι συνήθως τυπικές για τα διάφορα είδη κουνουπιών.

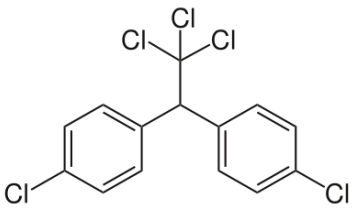
Από τις πιο συνηθισμένες εστίες ανάπτυξης των προνυμφών των κουνουπιών, είναι τα έλη, τα παρόχθια τμήματα των ποταμών και λιμνών, τα αρδευτικά και αποστραγγιστικά κανάλια, οι καλλιέργειες ρυζιού, οι κοιλότητες των παραθαλάσσιων βράχων, οι ανοιχτές αποχετεύσεις, οι φυσικές ή τεχνητές δεξαμενές νερού αλλά και οι κάθε είδους και έκτασης συλλογές νερού στο οικιακό και περι-οικιακό περιβάλλον. Αξίζει να σημειωθεί ότι για κάποια είδη πολλές φορές αρκεί μια πολύ μικρή συλλογή νερού για να διατηρηθεί μερικές ημέρες και να παραχθεί μια νέα γενεά κουνουπιών. Τέτοιες εστίες μπορεί να είναι τα εγκαταλελειμμένα ελαστικά, οικιακά σκεύη, δοχεία νερού, άδεια δοχεία από κονσέρβες, κοιλότητες και τρύπες στο έδαφος, κοιλότητες στους κορμούς των δένδρων, πιατάκια γλαστρών και πληθώρα ακόμη σημείων τα οποία μπορούν να συγκρατήσουν νερό για λίγες ημέρες.

Εκτός από την έκταση της εστίας και την ποσότητα του νερού τα διάφορα είδη κουνουπιών επιλέγουν τα σημεία για ωοτοκία και με βάση άλλα χαρακτηριστικά όπως το εάν οι εστίες είναι μόνιμες ή προσωρινές, εάν διαθέτουν καθαρό νερό ή νερό με πλούσιο οργανικό φορτίο, γλυκό, υφάλμυρο ή και έντονα αλατούχο νερό, στάσιμο ή σε κίνηση, ψυχρό ή θερμό και νερό εκτεθειμένο στον ήλιο ή στη σκιά.

2.3. Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Μετά την ανακάλυψη των συνθετικών εντομοκτόνων, όπως το DDT (ανακαλύφθηκε το 1939) και τα παράγωγά του, η καταπολέμηση των κουνουπιών βασίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στην εφαρμογή των πρώτων αυτών χημικών εντομοκτόνων. Όμως, παρά τη σημαντική μείωση του πληθυσμού των κουνουπιών, η υπερβολική και αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων αυτών σε συνδυασμό με τις ελλιπείς γνώσεις εκείνης της εποχής, είχαν ως αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρών επιπτώσεων στο περιβάλλον καθώς και σε οργανισμούς, οι οποίοι δεν αποτελούσαν στόχο.

Το DDT (διχλωρο-διφαινυλο τριχλωρο-αιθάνιο) (Εικόνα Ε11, Πηγή 8) είναι μια χλωριούχος και ισχυρά τοξική ένωση, η οποία είναι μη βιοδιασπώμενη και με μεγάλη υπολειμματική διάρκεια. Το αποτέλεσμα ήταν ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής και η εξάπλωσή του στη φύση μέσω της τροφικής αλυσίδας και της ατμοσφαιρικής του διασποράς από την βαθμιαία συσσώρευση του. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, επειδή είναι μη βιοδιασπώμενη ένωση, έρευνες έδειξαν ποσότητες DDT μέχρι και στο γάλα των πολικών αρκούδων στο Βόρειο πόλο και στα αυγά των πιγκουίνων στο Νότιο πόλο. Θεωρήθηκε υπεύθυνο για την λείανση - λέπτυνση του κελύφους των αυγών πτηνών με αποτέλεσμα τον περιορισμό του πληθυσμού τους, εγκυμονώντας ακόμα και τον κίνδυνο της πλήρους εξαφάνισης τους.



Εικόνα Ε11. Δομή του DDT

Το DDT χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη θανάτωση εντόμων υγειονομικής σημασίας, όπως για τις ψείρες από τα τριχωτά μέρη του σώματος των στρατιωτών κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου. Εν συνεχεία, διαπιστώθηκε η ισχυρή δράση του έναντι και άλλων εντόμων με αποτέλεσμα την ευρέως εφαρμογή του για την καταπολέμησή τους (Εικόνα Ε12, Πηγή 8).

Εικόνα Ε12. Χρήση DDT

Επίσης, παρατηρήθηκε αλόγιστη χρήση του DDT από τον άνθρωπο, ενώ οι κρατικές αρχές πολλές φορές για να πείσουν τους πολίτες για την «*ασφάλεια*» τους προέβησαν σε ακρότητες (Εικόνα Ε12, Πηγή 8).

Σήμερα, η διαχείριση των κουνουπιών σε μια περιοχή, για να έχει επιτυχία θα πρέπει να συνδυάζει γνώσεις και δεδομένα από πολλούς και διαφορετικούς τομείς. Τα δύο σημαντικότερα όμως στοιχεία, τα οποία απαραιτήτως θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την κατάρτιση οποιουδήποτε προγράμματος αντιμετώπισης κουνουπιών είναι: α) τα στοιχεία της εντομολογικής έρευνας, που αφορούν στα είδη των κουνουπιών, τις εστίες ανάπτυξης των προνυμφών τους καθώς και τα υπόλοιπα στοιχεία της βιολογίας τους και της οικολογίας και β) τις μεθόδους και τα μέσα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κάθε συγκεκριμένη περίπτωση.

Γενικά, η αντιμετώπιση των κουνουπιών, θα πρέπει να στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην καταπολέμηση ή τον περιορισμό των προνυμφών και συμπληρωματικά στην καταπολέμηση των τέλειων εντόμων, όταν αυτό απαιτείται από τις συνθήκες.

2.3.1. Αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών

Περιορισμός των εστιών ανάπτυξης

Ο περιορισμός των εστιών ανάπτυξης των κουνουπιών είναι ένα από τα σημαντικότερα μέτρα διαχείρισής τους καθώς η καταστροφή των εστιών μειώνει την ευχέρεια πολλαπλασιασμού τους και επομένως μειώνει την πυκνότητά τους. Αν και τα έργα περιορισμού των εστιών ανάπτυξης προνυμφών δεν δίνουν άμεση ή οριστική λύση στο πρόβλημα των κουνουπιών μιας περιοχής, εάν εφαρμοστούν σωστά και παράλληλα με τις άλλες μεθόδους βελτιώνουν σημαντικά την κατάσταση.

Εάν η έκταση του προβλήματος είναι μεγάλη θα πρέπει να εξεταστεί η δυνατότητα αποστράγγισης ορισμένων εκτάσεων, ενώ μικρές κοιλότητες του εδάφους συχνά είναι σκόπιμο να επιχωματωθούν.

Αντιμετώπιση με βιολογικά μέσα

Η βιολογική αντιμετώπιση των κουνουπιών γενικά βασίζεται στη χρησιμοποίηση οργανισμών, οι οποίοι δρουν είτε ως αρπακτικά, είτε ως παθογόνα σε κάποιο από τα στάδια των κουνουπιών, συνήθως στα ατελή. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της χημικής, διότι οι οργανισμοί είναι αρκετά εκλεκτικοί και συνεπώς σχετικά ακίνδυνοι και περισσότερο φιλικοί προς το περιβάλλον.

Σχετικά με τις προνύμφες των κουνουπιών, έχει διαπιστωθεί η αποτελεσματική δράση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού παθογόνων μικροοργανισμών για τα κουνούπια ενώ για πολλούς από αυτούς έχουν γίνει και εξακολουθούν να γίνονται διεθνώς πολλές προσπάθειες για την παραγωγή και εκμετάλλευσή τους σε ευρεία κλίμακα. Μεταξύ των περισσότερα υποσχόμενων οργανισμών είναι τα πρωτόζωα *Nozema vavraia* και *Thelohamia spp*., οι μύκητες των γενών *Coelomomyces*, *Culicinomyces* και το είδος *Lagenidium gigatneum*, καθώς και ο έλμινθας *Romanomermis culicivorax*, του οποίου έχει επιτευχθεί και η βιομηχανοποιημένη μαζική παραγωγή. Για την ώρα όμως, καμία από τις προσπάθειες αυτές δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε εμπορικό επίπεδο.

Τα μόνα φυσικά παθογόνα με απόδοση και σε εμπορική κλίμακα είναι σκευάσματα των παθογόνων βακίλων *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* [serotype H-14] (B.t.i.) και του *Bacillus sphaericus* (B.s.).

Γενικά τα βιολογικά σκευάσματα, παρά το γεγονός ότι θεωρούνται περισσότερο ασφαλή για το περιβάλλον, παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Τα μειονεκτήματα αυτά είναι συνήθως το υψηλό κόστος (λόγω του τρόπου παρασκευής τους), η μικρή υπολειμματική τους διάρκεια, το γεγονός ότι η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις συνθήκες περιβάλλοντος και τέλος η υψηλή εξειδίκευση του προσωπικού που θα τα εφαρμόσει.

Επίσης, για την αντιμετώπιση των κουνουπιών, έχουν χρησιμοποιηθεί και διάφορα είδη προνυμφοφάγων ψαριών, κυριότερο από τα οποία είναι το είδος *Gambusia affinis*. Τα *Gambusia* κινούνται κοντά στην επιφάνεια του νερού και θηρεύουν με ευκολία τις προνύμφες των κουνουπιών. Υπολογίζεται ότι κάθε ψάρι μπορεί να καταβροχθίσει 150-200 προνύμφες την ημέρα. Για να δράσει

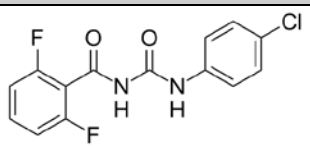
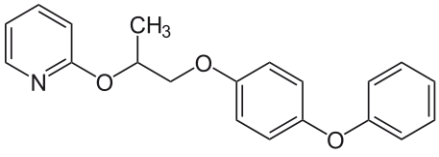
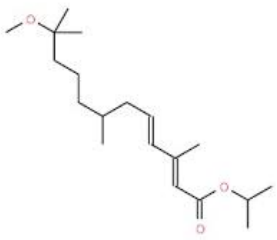
όμως ικανοποιητικά το *Gambusia*, πρέπει η εστία να μην έχει πολύ πυκνή βλάστηση προκειμένου να μην παρεμποδίζεται η κίνησή του.

Χημική αντιμετώπιση προνυμφών

Η χημική αντιμετώπιση των προνυμφών των κουνουπιών (καθώς και των τέλειων) βασίζεται στη χρησιμοποίηση βιοκτόνων, δηλαδή χημικών τοξικών ουσιών, που παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του εντόμου και επιφέρουν τελικά το θάνατο. Η χρήση των εντομοκτόνων, σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους, έχει το πλεονέκτημα ότι εξασφαλίζει γρήγορη κάλυψη μεγάλων εκτάσεων με άμεσο αποτέλεσμα και χαμηλό κόστος. Παρουσιάζει όμως και σοβαρά μειονεκτήματα, όπως η ρύπανση του περιβάλλοντος, η είσοδος επικίνδυνων ουσιών στην τροφική αλυσίδα και οι αρνητικές επιδράσεις στη ζωή άλλων οργανισμών οι οποίοι δεν αποτελούν στόχο.

Βιοκτόνα κατάλληλα για την καταπολέμηση των προνυμφών των κουνουπιών, με έγκριση κυκλοφορίας στη χώρα μας, περιέχουν ένα από τα ακόλουθα δρώντα συστατικά: diflubenzuron, pyriproxyfen και s-methoprene (Πίνακας Ε6).

Πίνακας Ε6. Εγκεκριμένα βιοκτόνα

Βιοκτόνα	**Χημική δομή**
diflubenzuron	
pyriproxyfen	
s-methoprene	

Οι παραπάνω δραστικές ανήκουν στην κατηγορία των ρυθμιστών ανάπτυξης εντόμων (Insect Growth Regulators, IGRs). Σχετικά με τους ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων, η χρήση τους ενθαρρύνεται διεθνώς τα τελευταία χρόνια καθώς θεωρούνται περισσότερο ασφαλή για το περιβάλλον και τους άλλους οργανισμούς. Τα βιοκτόνα αυτά παρεμποδίζουν τη φυσιολογική διαδικασία εξέλιξης των εντόμων, είτε επηρεάζοντας το ενδοκρινικό σύστημά τους (έλεγχος της διαδικασία της μεταμόρφωσης), είτε παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση της χιτίνης, η οποία είναι απαραίτητη στη δημιουργία του εξωσκελετού του εντόμου, προκαλώντας το θάνατό του, πριν αυτό φτάσει στο αναπαραγωγικό στάδιο.

2.3.2. Αντιμετώπιση των τέλειων κουνουπιών

Η αντιμετώπιση των τέλειων κουνουπιών θα πρέπει να εφαρμόζεται ως συμπληρωματική ενέργεια στην καταπολέμηση των προνυμφών, όταν το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα οξύ ή όταν το επιβάλλουν συγκεκριμένες συνθήκες, όπως η εμφάνιση επιδημιών οφειλομένων στα κουνούπια.

Μηχανικά μέσα

Η διαχείριση των τέλειων κουνουπιών με μηχανικά μέσα δεν έχει στόχο τη μείωση των πληθυσμών τους αλλά κυρίως την προστασία συγκεκριμένων χώρων διαβίωσης του ανθρώπου ή των ζώων από την παρουσία και τις επιθέσεις των εντόμων αυτών.

Η τοποθέτηση λεπτών πλεγμάτων (σήτες), σε πόρτες και παράθυρα και η χρησιμοποίηση κουνουπιέρας βοηθούν συνήθως αρκετά αποτελεσματικά στην προστασία των οικιών από την είσοδο των κουνουπιών και την εξασφάλιση ικανοποιητικής προστασίας ειδικότερα κατά τη διάρκεια του ύπνου.

Αντιμετώπιση με βιολογικά μέσα

Στους φυσικούς εχθρούς των τέλειων κουνουπιών έχουν καταγραφεί πολλά ζώα, από αρπακτικά αρθρόποδα (αράχνες, Odonata κλπ.) έως αμφίβια (πχ. βάτραχοι), ερπετά (πχ. κάποια είδη σαυρών), πτηνά (πχ. χελιδόνια) και θηλαστικά (πχ. νυχτερίδες). Κανένας όμως από τους φυσικούς εχθρούς δεν θεωρείται ότι μπορεί να προσφέρει αξιόλογη συνεισφορά στην αντιμετώπιση

των εντόμων αυτών σε πρακτικό επίπεδο και επομένως δεν έχουν ποτέ χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα.

Χημική αντιμετώπιση τέλειων κουνουπιών

α) Υπολειμματικοί ψεκασμοί

Για να είναι αποτελεσματική η εφαρμογή τους οι υπολειμματικοί ψεκασμοί θα πρέπει να διενεργηθούν σε όλους τους χώρους που διημερεύουν τα τέλεια κουνούπια. Οι ψεκασμοί αυτοί πρέπει να προηγούνται των επεμβάσεων κατά των προνυμφών και να επαναλαμβάνονται το φθινόπωρο, όταν τα τέλεια άτομα ετοιμάζονται να διαχειμάσουν. Αυτό θα περιορίσει σημαντικά τον αριθμό των ακμαίων, τα οποία θα δραστηριοποιηθούν την επόμενη άνοιξη. Οι υπολειμματικοί ψεκασμοί εφαρμόζονται σε εξωτερικές επιφάνειες κτιρίων, σε εσωτερικούς τοίχους καλά αεριζόμενων κτισμάτων, στους παρακείμενους θάμνους ή στα αγριόχορτα, καθώς και γύρω από τις εστίες αναπαραγωγής των κουνουπιών.

β) Ψεκασμοί χώρου

Όταν το πρόβλημα είναι πολύ μεγάλο θα μπορούσαν, να εφαρμοστούν ψεκασμοί ανοικτού χώρου στα μέρη που παρατηρούνται μεγάλες συγκεντρώσεις τέλειων κουνουπιών. Οι ψεκασμοί αυτοί γίνονται με φορητούς ή μηχανοκίνητους ψεκαστήρες

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και τα βιοκτόνα τύπου αερολύματος (aerosols) τα οποία προορίζονται για την απαλλαγή του εσωτερικού των οικιών από κουνούπια ή άλλα ενοχλητικά έντομα.

γ) Καπνισμοί εσωτερικών ή εξωτερικών χώρων

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή γίνεται διάχυση στον αέρα πτητικών βιοκτόνων η οποία έχει ως αποτέλεσμα περισσότερο την απώθηση παρά τη θανάτωση των κουνουπιών.

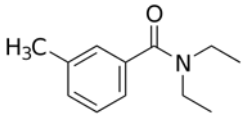
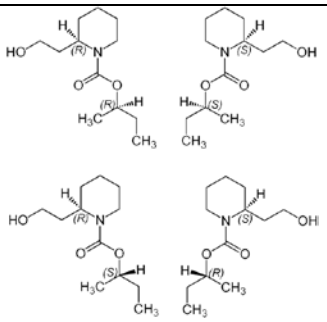
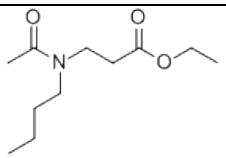
Για τον καπνισμό χρησιμοποιούνται πτητικά βιοκτόνα, όπως φυσικές πυρεθρίνες και συνθετικά πυρεθροειδή, σε τρεις κυρίως μορφές σκευασμάτων: α) καπνογόνες σπείρες, β) ηλεκτροθερμενόμενα πλακίδια και γ) υγρά εντομοαπωθητικά χώρου.

δ) Ατομική προστασία

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα βιοκτόνα τα οποία εφαρμόζονται απευθείας επάνω στο γυμνό δέρμα ή στα ρούχα και στόχο έχουν να προστατεύσουν το άτομο από τα τσιμπήματα των κουνουπιών ή άλλων αιμομυζητικών αρθροπόδων όπως αιμομυζητικές μύγες, σκνίπες, ψύλλοι, τσιμπούρια κλπ. Ο ρόλος τους είναι απωθητικός και δεν θανατώνουν τα έντομα.

Οι δραστικές ουσίες αυτών των βιοκτόνων είναι συνήθως το DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide), το icaridin και το ethyl butyl acetyl aminopropionate, ενώ χρησιμοποιούνται και σκευάσματα με απωθητικά φυτικής προέλευσης όπως η σιτρονέλα.

Πίνακας Ε7. Χημική δομή των βιοκτόνων, τα οποία εφαρμόζονται για την ατομική προστασία

Βιοκτόνα	Χημική δομή
DEET	
icaridin	
ethyl butyl acetyl aminopropionate	

2.3.3. Το πρόβλημα της ανθεκτικότητας

Ένα θέμα στο οποίο θα πρέπει πάντα να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή, όταν εφαρμόζεται ένα πρόγραμμα αντιμετώπισης κουνουπιών με χημικά μέσα, είναι η αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας των καταπολεμούμενων ειδών στις ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπισή τους.

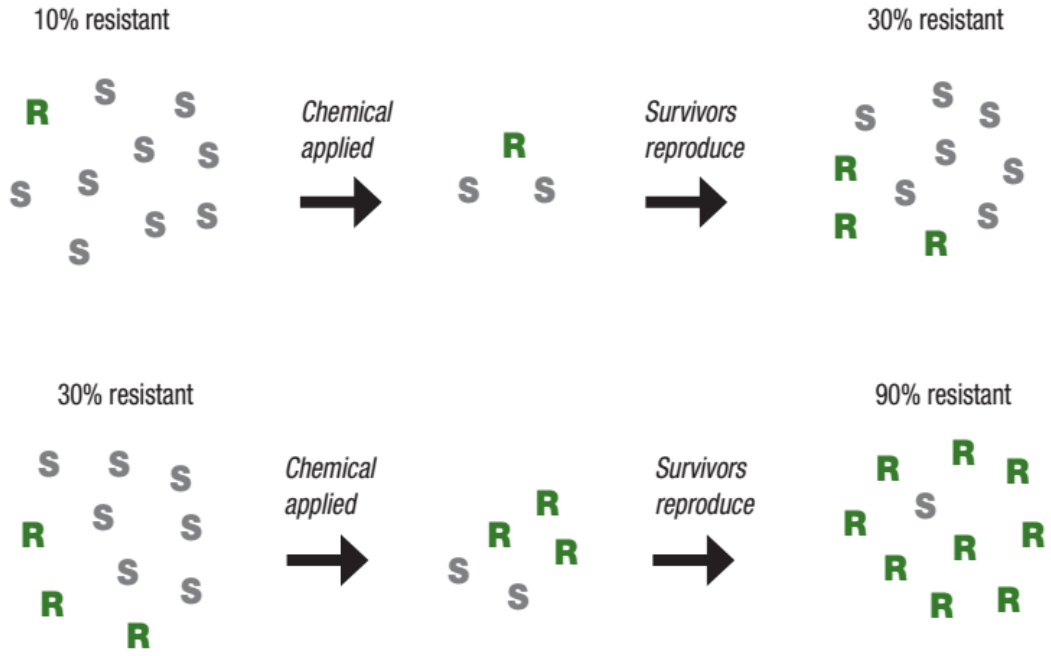
Ανθεκτικότητα (resistance) ονομάζεται η ικανότητα ενός πληθυσμού εντόμων, να επιβιώνει σε δόσεις εντομοκτόνου που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει ως ανθεκτικότητα το κληρονομούμενο χαρακτηριστικό ενός πληθυσμού εντόμων να επιβιώνει σε δόσεις εντομοκτόνου, που θα έπρεπε να θανατώνουν την πλειονότητα των ατόμων ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ιδίου είδους (Brown and Ral, 1971).

Η ανθεκτικότητα είναι ένα φαινόμενο επιλογής δηλαδή είναι το αποτέλεσμα αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα πληθυσμό. Πριν από την εισαγωγή ενός εντομοκτόνου σε μια περιοχή, ο πληθυσμός του εντόμου στόχου απαρτίζεται από ευαίσθητα και ελάχιστα ανθεκτικά άτομα. Η εφαρμογή της πίεσης επιλογής, από την παρουσία του εντομοκτόνου, έχει ως αποτέλεσμα η συχνότητα των γονοτύπων που δεν επηρεάζονται από την έκθεση σε αυτό να αυξάνει και έτσι να αλλάζει η κατανομή του πληθυσμού (αυξημένα τα ανθεκτικά άτομα) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007).

Η χρήση εντομοκτόνων από μόνη της δεν οδηγεί στη δημιουργία ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα εμφανίζεται όταν γενετικές μεταλλαγές που συμβαίνουν στη φύση επιτρέπουν σε άτομα ενός πληθυσμού εντόμων να αντιστέκονται και να επιβιώνουν τις θανατηφόρες επιδράσεις ενός εντομοκτόνου. Εάν το πλεονέκτημα των ατόμων αυτών διατηρηθεί με την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου εντομοκτόνου, τα ανθεκτικά έντομα θα αναπαραχθούν και οι κληρονομούμενες αυτές διαφοροποιήσεις, στις οποίες οφείλεται η ανθεκτικότητα, θα μεταφερθούν στους απογόνους ώστε τελικά αυτοί να επικρατούν μέσα σε έναν πληθυσμό (Εικόνα Ε13).

Η ανθεκτικότητα δεν θα πρέπει να συγχέεται με την αντοχή την οποία μπορεί να επιδείξει ένα έντομο μετά από έκθεση του σε μη θανατηφόρα δόση ενός εντομοκτόνου. Το φαινόμενο της αντοχής, σε αντίθεση με αυτό της ανθεκτικότητας, δεν κληρονομείται στην επόμενη γενεά.

Τα γονίδια που επιφέρουν ανθεκτικότητα μπορεί να είναι κυρίαρχα, μερικώς κυρίαρχα ή υπολειπόμενα. Οι περισσότεροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας ελέγχονται από υπολειπόμενα γονίδια. Στη φύση πληθυσμοί εντόμων, οι οποίοι ποτέ δεν έχουν εκτεθεί σε εντομοκτόνα, είναι συνήθως πολύ ευαίσθητοι και τυχόν γονίδια ανθεκτικότητας σε αυτούς του πληθυσμούς είναι πολύ σπάνια. Αυτό συμβαίνει επειδή τα άτομα που φέρουν τα ανθεκτικά γονίδια στερούνται κάποιων χαρακτηριστικών τα οποία κάνουν τα ευαίσθητα άτομα να κυριαρχούν σε συνθήκες όπου δεν υπάρχει πίεση από εντομοκτόνο. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι ο μειωμένος αριθμός των απογόνων, το προσδόκιμο ζωής του εντόμου και η ευρωστία των ανθεκτικών ατόμων (fitness cost). Ανθεκτικοί πληθυσμοί στο εργαστήριο συχνά μετατρέπονται σε ευαίσθητους εφόσον δεν διατηρείται η επιλεκτική πίεση με το εντομοκτόνο. Ανάλογο φαινόμενο συμβαίνει και στον αγρό όπου η ευαισθησία σε έναν πληθυσμό επανέρχεται μόλις γίνει αλλαγή της επιλεκτικής πίεσης που ασκεί το εντομοκτόνο με ένα άλλο (IRAC, 2011).



Εικόνα Ε13. Πιθανό σενάριο εξέλιξης φαινομένου ανθεκτικότητας (IRAC, 2011)

Ο αντίκτυπος του φαινομένου της ανθεκτικότητας από τοξικολογική άποψη είναι διττός. Αρχικά, η χρήση χημικών εντομοκτόνων για την καταπολέμηση εντόμων εχθρών, έχει οδηγήσει σε εφαρμογή ενός μεγάλου αριθμού, συχνά πολύ τοξικών, χημικών ουσιών στο περιβάλλον προκαλώντας σοβαρά προβλήματα ρύπανσης τα τελευταία 60 χρόνια. Δεύτερον, η άμεση ανθρώπινη αντίδραση στην ανθεκτικότητα είναι η αύξηση της δοσολογίας, με συνέπεια την επιδείνωση του προβλήματος της ανθεκτικότητας και την περαιτέρω επιβάρυνση του περιβάλλοντος και την παράλληλη αύξηση του κόστους εφαρμογής (Feyereisen, 1995).

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας έχει απασχολήσει για πολλές δεκαετίες τους επιστήμονες και έχει θέσει σε κίνδυνο τόσο τη βιωσιμότητα των προγραμμάτων καταπολέμησης των κουνουπιών όσο και τη δημόσια υγεία.

Τα έντομα υγειονομικής σημασίας ήταν από τα πρώτα στα οποία διαπιστώθηκε ανθεκτικότητας και δημιούργησε σοβαρά προβλήματα. Η οικιακή μύγα (*Musca domestica*) και ορισμένα είδη κουνουπιών, ήταν ανθεκτικά στο οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο DDT, κατά τη δεκαετία του '50, στη Σουηδία, τη Γερμανία, τις Η.Π.Α. και σε αρκετές χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου.

Στη χώρα μας, οι πρώτες αναφορές για ύπαρξη ανθεκτικότητας στα κουνούπια καταγράφονται σε είδη ανωφελών στα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα DDT και dieldrin κατά την αρχή ήδη του ανθελονοσιακού αγώνα. Μάλιστα η πρώτη καταγραφή παγκοσμίως ανθεκτικού στελέχους *Anopheles sacharovi* σημειώθηκε στη χώρα μας (Livadas and Georgopoulos, 1953) στο σημερινό δήμο Ευρώτα Λακωνίας, όπου τα δύο τελευταία έτη έχει παρατηρηθεί συρροή κρουσμάτων ελονοσίας με ενδείξεις εγχώριας μετάδοσης.

Για να περιοριστούν οι κίνδυνοι από την ανθεκτικότητα, πρέπει να εφαρμόζονται προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση των νέων μεθόδων καταπολέμησης σε συνδυασμό με τις ήδη υπάρχουσες και τον περιορισμό της χημικής καταπολέμησης στον απολύτως αναγκαίο αριθμό επεμβάσεων. Σήμερα υπάρχει σε μεγάλο βαθμό η δυνατότητα αντικατάστασης ορισμένων επικινδύνων χημικών ουσιών με εναλλακτικά χημικά ή βιολογικά μέσα, τα οποία δρουν αποκλειστικά εναντίον του συγκεκριμένου είδους εντόμου και όχι εναντίον άλλων, πιθανώς ωφέλιμων οργανισμών.

2.4. ΤΑ ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ ΚΑΙ Η ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΣΗΜΑΣΙΑ

Η μεγάλη τους σημασία έγκειται στο γεγονός ότι είναι διαβιβαστές μερικών από τις πιο επικίνδυνες ασθένειες που προσβάλλουν τον άνθρωπο, όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, ο δάγκειος πυρετός, ο ιός του Δυτικού Νείλου, εγκεφαλίτιδες και φιλαριάσεις καθώς και μεγάλου αριθμού άλλων αρμποϊώσεων, δηλαδή ιώσεων που προσβάλλουν τα σπονδυλωτά και η μεταβίβαση γίνεται με κάποιο αρθρόποδο ξενιστή (**ar**thropod **bo**rne **virus** = arbovirus) (Aitken et al., 1975).

Τα τελευταία χρόνια όμως παρατηρείται σε πολλές περιοχές σημαντική αύξηση των πληθυσμών κουνουπιών, με αποτέλεσμα ο Δάγκειος πυρετός, η ελονοσία και ο ιός του Δυτικού Νείλου να είναι σήμερα οι τρείς περισσότερο διαδεδομένες ασθένειες, οι οποίες μεταδίδονται με αρθρόποδα παγκοσμίως (Wilder-Smith et al., 2009). Το πρόβλημα είναι σοβαρό ακόμη και για τις πιο αναπτυγμένες και οικονομικά εύρωστες περιοχές του πλανήτη όπως είναι η Ευρώπη και οι Η.Π.Α. (Zgomba and Petric, 2008). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην συχνή εκδήλωση ακραίων καιρικών φαινομένων καθώς και στο σύγχρονο εμπόριο και την τάση για συχνές μετακινήσεις μεγάλου μέρους του ανθρώπινου πληθυσμού (Gubler 1998a; Brower, 2001). Παρακάτω αναλύονται οι πιο συχνές ασθένειες (η ελονοσία, ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο Δάγκειος πυρετός και ο κίτρινος πυρετός) καθώς και οι ξενιστές τους.

Ελονοσία

Στοιχεία ασθένειας

Ο αιτιολογικός παράγων της ελονοσίας για τον άνθρωπο είναι τα πρωτόζωα παράσιτα, του γένους *Plasmodium* (Οικογένεια: Plasmodidae, Τάξη: Sporozoa, Φύλο: Apicomplexa, Βασίλειο: Protista). Το γένος αυτό περιλαμβάνει περισσότερα από 100 είδη, αλλά μόνο τα πέντε από αυτά μολύνουν τον άνθρωπο (Εικόνα Ε14, Πηγή 9): *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* και *Plasmodium knowlesi.*

Εικόνα Ε14. Παιδί με ελονοσία

Σύμφωνα με σχετική ανακοίνωση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα κρούσματα από την ελονοσία για το έτος 2010, υπολογίζονται σε 219 εκατομμύρια παγκοσμίως ενώ οι θάνατοι ανέρχονται στους 660.000.

Στην Ελλάδα η ελονοσία αποτελούσε τεράστιο πρόβλημα δημόσιας υγείας μέχρι το 1945 και θεωρείτο ως η πιο ελονοσιογενής χώρα της Ευρώπης και της Μεσογείου (Λιβαδάς και Σφάγγος, 1940a; Λιβαδάς και Σφάγγος, 1940b; Λιβαδάς, 1955). Τις δεκαετίες επίσης του ’60 και ’70 η ελονοσία θεωρήθηκε ότι εκριζώθηκε και από όλες σχεδόν τις Ευρωπαϊκές χώρες και από τότε τα κρούσματα είναι σχεδόν αποκλειστικά από εισαγόμενες περιπτώσεις, όπου δηλαδή η μετάδοση είχε λάβει χώρα σε άλλο μέρος, εκτός Ευρώπης. Όμως, τα τελευταία χρόνια, αυτόχθονα κρούσματα έχουν καταγραφεί και στην Ελλάδα, στην περιοχή της Λακωνίας, στην Ανατολική Αττική (Μαραθώνας) καθώς και σε άλλες περιοχές (Πηγή 10). Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό καθώς τα είδη των ανωφελών τα οποία μπορούν να μεταδώσουν την ελονοσία, αναπτύσσονται σε πολλές περιοχές της χώρας μας και μάλιστα σε μεγάλη πυκνότητα.

Ξενιστές

Για τα είδη *P. vivax, P. falciparum, P. malariae και P. ovale* αποκλειστικό υπόδοχο στη φύση είναι ο άνθρωπος ενώ το *P. knowlesi* σχετίζεται με τους πιθήκους. Μοναδικός ενδιάμεσος ξενιστής είναι τα κουνούπια του γένους *Anopheles.* Από τα περίπου 422 είδη που ανήκουν στο γένος αυτό μόνο ορισμένα είναι ικανοί διαβιβαστές της ελονοσίας. Για την Ελλάδα είναι κυρίως τα είδη *A. sacharovi, Anopheles maculipennis, Anopheles superpictus* και *Anopheles hyrcanus*

Ιός του Δυτικού Νείλου

Στοιχεία ασθένειας

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στην Οικογένεια Flaviviridae, γένος *Flavivirus* και υπάγεται στην αντιγονική ομάδα Β, των αρμποϊών. Ο ιός του Δυτικού Νείλου αποτελεί τον πιο διαδεδομένο από τους φλαβιιούς, με γεωγραφική διασπορά στην Αφρική, την Ασία (κυρίως Μέση Ανατολή), τη Νότια και Κεντρική Ευρώπη και από το 1999 και στην Αμερική (Hubálek and Halouzka,

1999; Wilmot, 1999; Hubálek, 2000; Komar, 2000; WHO, 2004; Hubálek, 2008; Zgomba and Petric, 2008).

Πήρε το όνομά του γιατί απομονώθηκε για πρώτη φορά από το αίμα μιας γυναίκας με εμπύρετη νόσο στην περιοχή του Δυτικού Νείλου, στην Ουγκάντα το 1937 (Smithburn et al., 1940; WHO, 2004). Στη συνέχεια απομονώθηκε και από ασθενείς, πτηνά και κουνούπια στην Αίγυπτο, στις αρχές της δεκαετίας του 1950 (Melnick et al., 1951; Taylor et al., 1956). Ο ιός αναγνωρίστηκε ως το αίτιο σοβαρών μηνιγγοεγκεφαλίτιδων, σε ηλικιωμένους ασθενείς, κατά τη διάρκεια επιδημίας στο Ισραήλ, το 1957 (Medical Net, 2004). Στα άλογα παρατηρήθηκε η νόσος για πρώτη φορά στην Αίγυπτο και τη Γαλλία, στις αρχές της δεκαετίας του 1960 (Medical Net, 2004).

Η παρουσία του ιού του Δυτικού Νείλου στην Ευρώπη είναι έντονη και περιλαμβάνει σποραδικά κρούσματα και επιδημίες σε ανθρώπους και άλογα, καθώς και ανεύρεση αντισωμάτων σε ανθρώπους, λοιπά σπονδυλωτά και κουνούπια, γεγονός, το οποίο αποδεικνύει έμμεσα την παρουσία του ιού. Η νόσος στην Ευρώπη εμφανίζεται κατά την περίοδο όπου η δραστηριότητα των κουνουπιών-διαβιβαστών είναι μέγιστη, δηλαδή την περίοδο από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο, με περίοδο αιχμής τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας καταχωρεί τη χώρα μας στον κατάλογο των ευρωπαϊκών χωρών, οι οποίες είναι ενδημικές στον ιό. Τη διάρκεια του καλοκαιριού του 2010 επιδημία του ιού καταγράφηκε στην Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα, στους Νομούς Ημαθίας, Κιλκίς, Πέλλας, Πιερίας, Θεσσαλονίκης, Σερρών, Λάρισας και Αιτωλοακαρνανίας. Σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), του Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, η Ελλάδα εμφάνισε μια από τις μεγαλύτερες για την Ευρωπαϊκή ήπειρο, επιδημίες από τον ιό του Δυτικού Νείλου με τουλάχιστον 261 εργαστηριακά διαπιστωμένα κρούσματα και 34 θανάτους. Το 2011 διαγνώστηκαν συνολικά 101 κρούσματα λοίμωξης και καταγράφηκαν 9 θάνατοι σε ασθενείς άνω των 65 ετών και με υποκείμενα νοσήματα. Τέλος, το 2012 διαγνώστηκαν 161 κρούσματα λοίμωξης και καταγράφηκαν 18 θάνατοι (Πηγή 10).

Ξενιστές

Οι κύριοι ξενιστές του ιού του Δυτικού Νείλου στη φύση είναι τα πτηνά. Έχει απομονωθεί από τουλάχιστον 138 διαφορετικά είδη υδρόβιων και χερσαίων πτηνών και από διάφορα θηλαστικά, όπως αρουραίους, χάμστερ, νυχτερίδες, καμήλες, βοοειδή, άλογα, σκύλους και φυσικά ανθρώπους. Επίσης ορισμένα είδη βατράχων (*Rana ridibunda*) μπορούν να φιλοξενήσουν τον ιό, από τα οποία είναι δυνατό να τραφούν κουνούπια όπως τα *Cx. pipiens* (Hubálek and Halouzka, 1999; Wilmot, 1999).

Οι κύριοι διαβιβαστές του ιού είναι κουνούπια τα οποία τρέφονται ως επί το πλείστον με αίμα πτηνών. Έχει απομονωθεί από 43 είδη κουνουπιών, με επικρατέστερο το γένος *Culex*. Στην Ευρώπη κύριοι διαβιβαστές είναι τα *C.pipiens*, *Culex modestus* και *Coquillettidia richiardii* (Hubálek and Halouzka, 1999; Wilmot, 1999).

Δάγκειος πυρετός

Στοιχεία ασθένειας

Ο ιός του δάγκειου πυρετού υπάγεται και αυτός στους φλαβιιούς (Οικογένεια Flaviviridae, γένος *Flavivirus*) όπως και ο ιός του Δυτικού Νείλου. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί ορότυποι του ιού του δάγκειου πυρετού: DEN-1, DEN-2, DEN-3 και DEN-4. Η μόλυνση με κάθε έναν από τους τύπους αυτούς παρέχει ανοσία μόνο για τον ομόλογο τύπο και για το λόγο αυτό είναι δυνατό ένα άτομο να εμφανίσει πολλαπλές προσβολές με τον ιό του δάγκειου. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι καθένας από τους οροτύπους μπορεί να προκαλέσει επιδημία (Gubler, 1998b; WHO, 1999). Υπολογίζεται ότι τα ετήσια κρούσματα δάγκειου πυρετού στις τροπικές χώρες ανέρχονται σε 100 εκατομμύρια.

Από υγειονομική άποψη, ο δάγκειος πυρετός αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική νόσο λόγω της δραματικής αύξησης του αριθμού περιπτώσεων και της γεωγραφικής του διασποράς τα τελευταία 30 χρόνια. Απειλεί πλέον το 40% του πληθυσμού της γης (2,5 δις άνθρωποι). Στην Ευρώπη, η εξαφάνιση του ιού οφείλεται κυρίως στη σχεδόν καθολική χρήση των δικτύων ύδρευσης καθώς και την εξαφάνιση του κύριου φορέα του ιού για την Ευρώπη, του *Aedes aegypti*. Σε

αντίθεση όμως με το *Ae. aegypti* δεν ισχύει το ίδιο και για το *Aedes albopictus*, το οποίο έχει εισβάλλει στην Ευρωπαϊκή ήπειρο και έχει εγκατασταθεί με επιτυχία σε πολλές περιοχές της. Συνεπώς το ενδεχόμενο επανεμφάνισης του δάγκειου θεωρείται πιθανό και απαιτείται αυξημένη επαγρύπνηση των υπηρεσιών δημόσιας υγείας.

Στην Ελλάδα μια μεγάλη επιδημία έλαβε χώρα στην Αθήνα και τον Πειραιά το 1928, με μεγάλο αριθμό περιστατικών, πολλών εκ των οποίων με βαριά συμπτώματα ενώ καταγράφηκαν και 1.533 θάνατοι. Διαβιβαστής του ιού ήταν κατά πάσα πιθανότητα το είδος *Ae. aegypti*, το οποίο επικρατούσε στην περιοχή εκείνη την περίοδο. Στην Ελλάδα όλα τα κρούσματα δάγκειου πυρετού πλέον είναι εισαγόμενα.

Ξενιστές

Ο ιός του δάγκειου πυρετού μεταδίδεται με κουνούπια του γένους *Aedes* (υπογένος *Stegomyia*), κυρίως με τα είδη *Ae. aegypti* και *Ae. albopictus*, καθώς και με τα *Ae. scutellaris* και *Ae. Polynesiensis* (Kettle, 1995; WHO, 1999). Υπόδοχο του Δάγκειου πυρετού είναι ο άνθρωπος. Από το 1931 έχει βρεθεί ότι οι πίθηκοι των ειδών *Macacus fuscatus* και *M. philippinensis* μολύνονται από τον ιό χωρίς να νοσούν (Matheson, 1950).

Κίτρινος πυρετός

Στοιχεία ασθένειας

Ο ιός του Κίτρινου Πυρετού, ανήκει στο γένος *Flavivirus* (οικ. Flaviviridae) και μεταδίδεται με δύο διαφορετικούς κύκλους, τον αστικό (urban) και το δασικό (sylvan). Η εξάπλωση του Κίτρινου Πυρετού σήμερα περιορίζεται σε ορισμένες χώρες της Νότιας Αμερικής και στην Αφρική όπου μεταδίδεται και με τους δύο κύκλους και ενδημεί σε 33 χώρες (Vainio and Cutts, 1998).

Για την Ελλάδα μέχρι πρόσφατα, η μετάδοση του Κίτρινου Πυρετού, με τις παρούσες συνθήκες δεν ήταν δυνατή καθώς ο σημαντικότερος ίσως ενδιάμεσος ξενιστής της λοίμωξης, το είδος *Ae. aegypti,* δεν έχει καταγραφεί τα τελευταία 60 περίπου χρόνια, αν και παλαιότερα ενδημούσε στη χώρα μας. Όμως, με την πρόσφατη είσοδο και εγκατάσταση ενός άλλου ικανού φορέα του ιού, του *Ae.*

albopictus, στην Ελλάδα, ο κίνδυνος εμφάνισης του ιού του Κίτρινου Πυρετού, στην Ελλάδα ή την Ευρώπη είναι πλέον ορατός (Hawley, 1988; Gratz, 1999; Gratz, 2004; Reiter, 2010).

Ξενιστές

Στον αστικό κύκλο το κουνούπι του είδους *Ae. aegypti* είναι ενδιάμεσος ξενιστής ενώ ο δασικός κύκλος έχει κουνούπια των γενών *Aedes, Haemagogus* και *Sabethes.* Στον αστικό κύκλο ο άνθρωπος συμμετέχει ως υπόδοχο ενώ ο δασικός κύκλος έχει υποδόχους πιθήκους.

2.5. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Culex pipiens*

Ένα από τα περισσότερο διαδεδομένα είδη κουνουπιού παγκοσμίως είναι το *Cx. pipiens,* λόγω της ανθρωποφιλίας και της παγκόσμιας διασποράς του όσο και της ικανότητάς του στη μετάδοση σημαντικών αρμποϊών και άλλων ασθενειών (Lundström, 1999). Το είδος αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και για το λόγο αυτό περιγράφεται εκτενέστερα.

Είναι ένα κουνούπι μεσαίου μεγέθους κουνούπι, με κιτρινοκαστανό χρώμα. Χαρακτηριστικό του είναι η απουσία σημαντικών αναγνωριστικών χαρακτηριστικών και ο έντονος πολυμορφισμός του. Οι κεραίες και οι ταρσοί έχουν ομοιόμορφο καστανό χρώμα. Στην κοιλία υπάρχουν κιτρινωπές βασικές ζώνες οι οποίες όμως λόγω της παρουσίας πλευρικών κοιλιακών σκουρόχρωμων λεπιών, συχνά εμφανίζονται ως κηλίδες.

Οι προνύμφες εμφανίζονται σχεδόν σε κάθε είδους τεχνητές ή φυσικές συγκεντρώσεις νερού, μικρές ή μεγάλες, με καθαρά ή και πολύ ρυπασμένα νερά. Αντέχουν ακόμη και σε νερά με μικρή ποσότητα άλατος. Οι πρώτες προνύμφες συχνά εμφανίζονται συγχρόνως με εκείνες των ανωφελών ειδών και συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους εντός μιας ή μερικών εβδομάδων, ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μπορεί να αναπαραχθεί με πολλές γενεές κάθε χρόνο και διαχειμάζει ως θηλυκό. Η ακτίνα διασποράς του από τις εστίες ανάπτυξής του, για αναζήτηση τροφής, συνήθως δεν ξεπερνά τα 500-800 μέτρα.

Το *Cx. pipiens* αντιπροσωπεύει ένα σύμπλεγμα ειδών κουνουπιών (mosquito species complex) από το οποίο στην Ελλάδα απαντώνται οι δύο βιότυποί του (biotypes). Το *Cx. pipiens* biotype *pipiens* και το *Cx. pipiens biotype molestus* (Becker et al., 2003). Για τη διάκριση των *Cx. p. pipiens* και *Cx. p. molestus* δεν έχουν βρεθεί αξιόπιστοι μορφολογικοί χαρακτήρες αλλά οι δύο βιότυποι παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς τη βιολογία και οικολογία τους.

Συγκεκριμένα ο βιότυπος *molestus* προτιμά γενικά υπόγεια σημεία για την ωοθεσία και αναπαραγωγή των προνυμφών (πχ. κελάρια, σκεπασμένα αποχετευτικά δίκτυα, ακόμη και βόθρους), είναι αυτόγονο είδος (δηλαδή, δεν είναι απαραίτητη η αιμοληψία για να δώσει την πρώτη ωοτοκία), είναι στενόγαμο είδος (δηλαδή η σύζευξη μπορεί να γίνει και σε περιορισμένο χώρο -

και γι' αυτό είναι εύκολη η εργαστηριακή εκτροφή του σε κλωβούς), είναι ομοδύναμο είδος (δεν διαχειμάζει) και τέλος είναι ανθρωπόφιλο (προτιμά να τρέφεται με αίμα θηλαστικών και κατά συνέπεια ανθρώπου). Επίσης, επειδή είναι το κατ' εξοχήν είδος, το οποίο συναντάμε πιο συχνά μέσα στα σπίτια ονομάζεται και «οικιακό κουνούπι».

Ο βιότυπος *pipiens*, σε αντίθεση με τον προηγούμενο βιότυπο, προτιμά χερσαία μέρη για εναπόθεση σχεδίων ωών και ανάπτυξη προνυμφών (υπαίθριους χώρους συγκέντρωσης νερού), δεν είναι αυτόγονο (δηλαδή είναι απαραίτητη η λήψη αίματος για την πρώτη ωοτοκία), είναι ευρύγαμο (δεν μπορεί να ζευγαρώσει σε καθορισμένους χώρους), είναι ετεροδύναμο (μπορεί να διαχειμάσει) και τέλος είναι κυρίως ορνιθόφιλο (προτιμά τα τρέφεται κυρίως από πτηνά).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ανάσης, Ε. Σ. Τα Φαρμακευτικά Βότανα της Ελλάδος; Αθήνα, 1959.

Διοσκουρίδης. Materia Medica (Περί Ύλης Ιατρικής, Περί Απλών Φαρμάκων); Berlin, 1906-1914; Vol. 3.

Εμμανουήλ, Ν.Γ. Δίπτερα υγειονομικής σημασίας. Αναγνώριση, βιολογία, οικονομική σημασία, αντιμετώπιση. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών; Αθήνα, 1999; 93 σελ.

Ζαχαρόπουλος, Μ. Ι. Σύγχρονη πλήρης θεραπευτική με τα βότανα; Εκδόσεις Ψυχάλου, 1972.

Ζιώγας, Β.; Μαρκόγλου, Α. Γεωργική Φαρμακολογία; Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών; Αθήνα, 2007; 836 σελ.

Ιπποκρατικό Έργο. Oeuvres Completes d' Hippocrate; Paris, 1849; Vol. 2-3, 5-8.

Καββάδας, Δ. Βοτανικόν Φυτολογικό Λεξικό; Αθήνα, 1956.

Λιβαδάς, Γ.Α.; Σφάγγος Ι. Η ελονοσία εν Ελλάδι; Τόμος Α'. Πυρσός; Αθήνα, 1940a, 248 σελ.

Λιβαδάς, Γ.Α.; Σφάγγος Ι. Η ελονοσία εν Ελλάδι; Τόμος Β'. Πυρσός, Αθήνα, 1940b, 303 σελ.

Λιβαδάς, Γ.Α. Η ελονοσία; Αθήνα, 1955, 255 σελ.

Μπαζαίος, Κ. Δίκταμο. "100 βότανα 1000 θεραπείες"; nutri-care κέντρο μελετών-εφαρμογών διατροφής; 1986, 155-157 σελ.

Οριβάσιος. Corpus Medicorum Graecorum; Teubner, J. Raeder; Leipzig, 1926-1933.

Πρινέας, Ι.; Σφακιανάκης, Α. Μ. Βοτανοθεραπευτική; Μακρής; Αθήνα, 1948.

Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Μ. Έντομα και άλλα αρθρόποδα υγειονομικής σημασίας; Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης; Θεσσαλονίκη, 1999; 153 σελ.

Στεφανάκη–Νικηφοράκη, Μ. Συστηματική Βοτανική; Αγγειόσπερμα, Τόμος Α' Εκδόσεις Σταμούλη; 1999.

Χανιώτης, Β.Ν. Αρθρόποδα και δημόσια υγεία. Λοιμώξεις, αλλεργίες, εξωπαρασιτισμός; Εκδόσεις Zymel; Αθήνα, 2001; 195 σελ.

Adam, P.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4786-4793.

Aitken, T.H.G.; Chamberlain, R.W.; Francy, D.B.; McLean, D.M.; Rudnick, A.; Woodall, J.P. International catalogue of arboviruses; U.S. Department of Health Education & Welfare; 1975; 789 pp.

Barnes, J.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 583-600.

Becker, N.; Petric, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Dahl, C.; Lane, J.; Kaiser, A. Mosquitoes and their control; Kluwer Academic/Plenum Publishers; New York, 2003; 498 pp.

Becker, N.; Petric, D.; Zgomba, M.; Boase, C.; Dahl, C.; Madon, M.; Kaiser, A. Mosquitoes and their control; Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, 2010; 577 pp.

Beerhues, L. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2201-2207.

Boericke, O. Pocket Manual of Homoepathic Materia Medica; B. Jain Publ.; New Delhi, 1991.

Briskin, D.P. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 507-514.

Brower, V. *EMBO rep.* **2001**, *2*, 755-757.

Brown, A.; Ral, R. WHO Monograph series; 1971; 38.491 pp

Bystrov, N.S.; Dobrynin, V.N.; Kolosov, M.N.; Chernov, B.K.; Chervin, I.I. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **1975**, *225*, 1327-1328.

Carmeliet, P. *Natural Medicines* **2003**, *9*, 653-660.

Ciochina, R.; Grossman, R.B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4619-4621.

Ciochina, R.; Grossman, R.B. *Chem. Rev.* **2006,** *106*, 3963-3986.

Cragg, G.M.; Boyd, M.R.; Cardellina, J.H.; Newman, D.J.; Snader, K.M.; McCloud, T.G. *Ciba Found Symp.* **1994**, *185*, 178-196.

Crockett, S.L.; Robson, N.K. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2011**, *1*, 1-13.

Czygan, F.C. Pharm. Unserer Zeit 32; Jahrgang, 2003; Vol. 3.

Di Carlo, G.; Borrelli, F.; Ernst, E.; Izzo, A.A. Trends Pharmacol. Sci. **2001**, *22*, 292-297.

Dona, M.; Dell' Aica, I.; Pezzato, E.; Sartor, L.; Calabrese, F.; Della Barbera, M.; Donella-Deana, A.; Appendino, G.; Borsarini, A.; Caniato, R.; Garbisa, S. Cancer Res. **2004**, *64*, 6225-6232.

Dubey, S.K. Textbook of Materia Medica, Part 1-2; Calcutta: Swapna Printing Works; 1990.

Feisst, C.; Werz, O. Biochem. Pharmacol. **2004**, *67*, 1531–1539.

Feyereisen, R. *Toxicology Let.* **1995**, *83*, 83-90

Froestl, B.; Steiner, B.; Muller, W.E. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2177–2184.

Ganzera, M.; Zhao, J.; Khan, I.A. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 623-630.

Georgiades, Ch. Flowers of Cyprus: Plants of Medicine; 2 Τόμοι, Λευκωσία, 1987.

Gratz, N.G. *Annu. Rev. Entomol.* **1999,** *44,* 51-75.

Gratz, N.G. *Med. Vet. Entomol.* **2004,** *18,* 215-227.

Grieve, M.A. A Modern Herbal; London: repr. Hafner; 1973.

Gubler, D.J. *Emerg. Infect. Dis.* **1998a,** *4,* 442-450.

Gubler, D.J. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998b,** *11,* 480-496.

Gurevich, A.I.; Dobrynin, V.N.; Kolosov, M.N.; Popravko, S.A.; Riabova, I.D. Antibiotiki **1971**, *16*, 510–513.

Harbach, R.E.; Howard, T.M. *Eur. Mosq. Bull.* **2007,** *23,* 1-66

Hawley, W.A. *J. Am. Mosq. Control Assoc. Suppl.* **1988,** *4*, 1-39.

Hendriksen, J.V.; Nottet, H.S.; Smits, H.A. *Eur. J. Clin. Invest.* **2002**, *32*, 60–68.

Hostanska, K.; Reichling, J.; Bommer, S.; Weber, M.; Saller, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *56*, 121–132.

Hubálek, Z.; Halouzka, J. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 545-556.

Hubálek, Z. *Viral Immunol.* **2000**, *13*, 415-426.

Hubálek, Z. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 29-43.

IRAC. Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance; Insecticide Resistance Action Committee; 2ond edn. 2011; 50pp.

Kettle, D.S. Medical and veterinary entomology; 2nd edition; CAB International. Cambridge, U.K. 1995; 725 pp.

Komar, N. *Rev. Sci. Tech. (International Office of Epizootics)* **2000**, *19*, 166-176.

Laakmann, G.; Schule, C.; Baghai, T.; Kieser, M. Pharmacopsychiatry **1998**, *31*, 54-59.

Linde, K. Forsch Komplementmed **2009**, *16*, 146-155.

Liu, F.; Pan, C.; Drumm, P.; Ang, C.Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 303-312.

Livadas, G.A.; Georgopoulos, G. *Bull. World Health Org.* **1953**, *8*, 497-511

Lundström, J.O. *J. Vector Ecol.* **1999**, *24*, 1-39.

Maisenbacher, P.; Kovar, K.A. Planta Med. **1992**, *58*, 351–354.

Marini-Bettolo, G.B. *J. Ethnopharmacology* **1980**, *2*, 5-7.

Martinez-Poveda, B.; Quesada, A.R.; Medina, M.A. *Int. J. Cancer.* **2005**, *117*, 775-780.

Matheson, R. Medical Entomology; Comstock Publishing Company, Inc., Ithaca, New York, 1950; 612 pp.

Medical Net. *Disease/Infection News* 2004.

Medina, M.A.; Martínez-Poveda, B.; Amores-Sánchez, M.I.; Quesada, A.R. *Life Sci.* **2006**, *79*, 105–111.

Melnick, J.L.; Paul J.R.; Riordan J.T.; Barnett V.H.H.; Goldblum N.; Zabin E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1951**, *77,* 661-665.

Mizobuchi, S.; Sato, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 399-403.

Muller, W.E. Pharmacol. Res. **2003**, *47*, 101-109.

Muller, W.E.; Singer, A.; Wonnemann, M. Pharmacopsychiatry **2001**, *34*, 98-102.

Murch, S.J.; Haq, K.; Rupasinghe, H.P.V.; Saxena, P.K. *Environ. Exp. Bot.* **2003**, *49*, 251–257.

Reiter, P. *Euro Surveill.* **2010**, *15*, 19509

Robson, N.K.B. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Bot.* **2002**, *32*, 61-123.

Schempp, C.M.; Hezel, S.; Simon, C. *Hautarzt.* **2003**, *54*, 248–253.

Schempp, C.M.; Kirkin,V.; Simon-Haarhaus, B.; Kersten, A.; Kiss, J.; Termeer, C.C.; Gilb, B.; Kaufmann, T., Borner, C.; Sleeman, J.P.; Simon, J.C. *Oncogene* **2002**, *21*, 1242–1250.

Schempp, C.M.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Schopf, E.; Simon, J.C. *Lancet* **1999**, *353*, 2129.

Schempp, C.M.; Winghofer, B.; Ludtke, R.; Simon-Haarhaus, B.; Schopf, E.; Simon, J.C. *Br. J. Dermatol.* **2000**, *142*, 979–984.

Schwarz, D.; Kisselev, P.; Roots, I. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8062–8068.

Singer, A.; Wonnemann, M.; Muller, W.E. *J. Pharm. and Exper. Therap.* **1999**, *290*, 1363-1368.

Sirvent, T.M.; Krasnoff, S.B.; Gibson, D.M. *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 2667–2681.

Smithburn, K.C.; Hughes, T.P.; Burke, A.W.; Paul, J.H. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* **1940**, *20*, 471-492.

Stary, F. The Natural Guide to Medicinal Herbs and Plants; Twickenham: Tiger Books; 1991.

Stojanović G, Dordević A, Smelcerović A. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2273-2295.

Taylor, R.M.; Work, T.H.; Hurlbut, H.S.; Rizk, F. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* **1956**, *5*, 579-620.

Tedeschi, E.; Menegazzi, M.; Margotto, D.; Suzuki, H.; Forstermann, U.; Vainio, J.; Cutts, F. Yellow fever. World Health Organization; Geneva, 1998; 87 pp.

WHO. Prevention and control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever-Comprehensive guidelines; World Health Organization Regional Publication; SEARO No. 29; New Delhi, 1999; 134 pp.

WHO. The vector-borne human infections of Europe. Their distribution and burden on public health; Edited by N. G. Gratz. World Health Organization, Regional Office for Europe; 2004; 154 pp.

Wilder-Smith, A.; Chen, L.H.; Massad, E.; Wilson, M.E. *Emerg. Infect. Dis.* **2009***, 15*, 8-11.

Williams, F.B.; Sander, L.C.; Wise, S.A.; Girard, J. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1115*, 93-102.

Wilmot, T. *AMCA Newsletter* **1999**, *25*, 7.

Wurglics, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Johanniskraut–von Inhaltsstoffen und anderen Unwägbarkeiten; Forschung Frankfurt, 2004; pp 22-27.

Zgomba, M.; Petric D. Risk assessment and management of mosquito-born diseases in the European region; *In Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests*; W. H. Robinson and D. Bajomi [ed.]. OOK-Press Kft., Hungary, 2008; pp. 29-39.

Zhao, F.; Watanabe, Y.; Nozawa, H.; Daikonnya, A.; Kondo, K.; Kitanaka, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 43-49.

Zuurbier, K.W.M.; Fung, S.Y.; Scheffer, J.C.; Verpoorte, R. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2315-2322.

ΠΗΓΕΣ

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum
2. http://plants.jstor.org/, http://eol.org/
3. http://www.discoverlife.org/nh/maps/Plantae/Dicotyledoneae/Clusiaceae/Hypericum/map_of_Hypericum_perforatum.jpg
4. http://www.cdfa.ca.gov/ plant/ipc/weedinfo/hypericum.htm

5. http://www.sbs.utexas.edu/mbierner/bio406d/images/pics/clu/hypericum_hypericoides. htm

6. http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum_perforatum

7. http://www.cdfa.ca.gov/ plant/ipc/weedinfo/hypericum.htm

8. http://en.wikipedia.org/wiki/DDT

9. http://www.bibliotecapleyades.net/ciencia/ciencia_ddt01.htm

10. http://www.keelpno.gr/

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αφορά τη μελέτη των συστατικών του *Hypericum sp.* και απαρτίζεται από τρία μέρη.

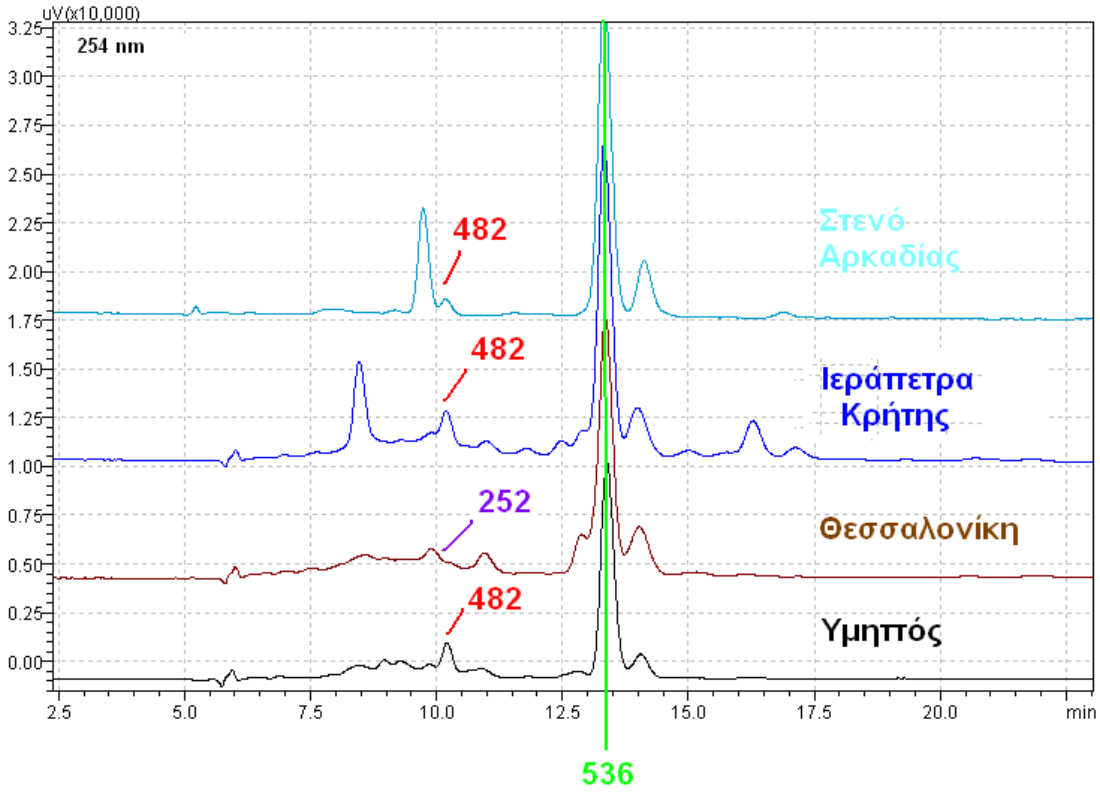
Πιο αναλυτικά:

- Στο **πρώτο** μέρος αναλύεται ο τρόπος εύρεσης - αναθεώρησης της προτεινόμενης δομής της αδυπερφιρίνης, μιας ακυλο-φλωρογλυκινόλης τύπου Α, η οποία απαντάται σε μικρές ποσότητες στο *Hypericum perforatum* και σε μεγάλες στο *Hypericum triquetrifolium.*
- Στο **δεύτερο** μέρος περιγράφεται η εκχύλιση του *Hypericum perforatum* και η απομόνωση της υπερφορίνης και άλλων δευτερογενών μεταβολιτών του. Επίσης, συντέθηκε η δεοξυκοχουμουλόνη και τα ακετυλιωμένα ανάλογα της. Τέλος, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητά της υπερφορίνης, της δεοξυκοχουμουλόνης, των συντιθέμενων ακετυλιωμένων παράγωγων τους καθώς και των κλασμάτων της εκχύλισης, κατά των προνυμφών κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens*.
- Στο **τρίτο** μέρος περιγράφεται ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η βιολογική αξιολόγηση σε καρκινικές σειρές αναλόγων της υπερφορίνης.

ΜΕΡΟΣ Α

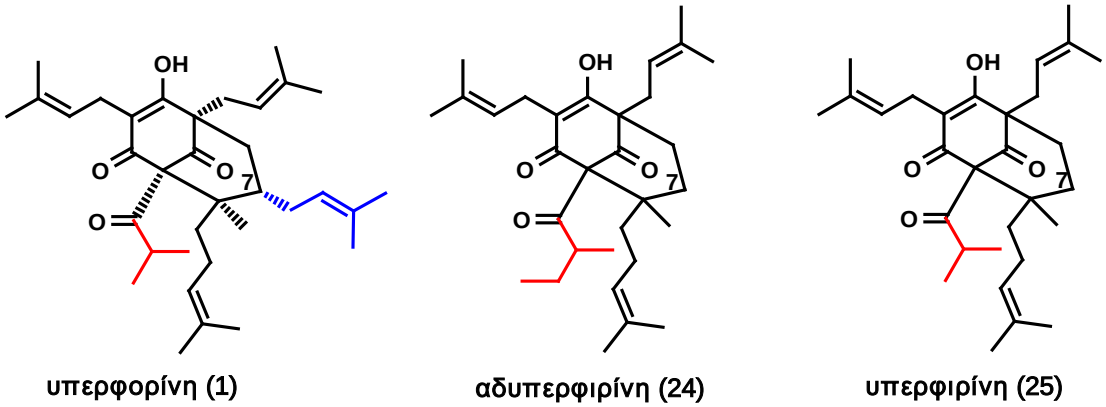
Α.1. ΑΔΥΠΕΡΦΙΡΙΝΗ Η ΚΑΤΙ ΑΛΛΟ;

Κατά την διάρκεια της συλλογής του *Hypericum perforatum* με σκοπό την απομόνωση της υπερφορίνης (**1**) και τη σύνθεση νέων αναλόγων της, παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας ένωσης με παραπλήσιο R*f*. Αυτή η ένωση ήταν έλαχιστα λιγότερο πολική από την υπερφορίνη (**1**) και υπήρχε είτε σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις είτε καθόλου, ανάλογα με την τοποθεσία της συλλογής (περιοχές συλλογής: Στενό, Ιεράπετρα, Θεσσαλονίκη και Υμηττός, βλ. Γράφημα Α1). Το μοριακό της βάρος ήταν 482 και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Tatsis et al., 2007) ήταν η αδυπερφιρίνη (**24**) (Εικόνα Α1), μια ακυλο-φλωρογλυκινόλη τύπου Α.



Γράφημα Α1. Ανίχνευση της ουσίας με Μ.Β. 482 και της υπερφορίνης (**1**) με Μ.Β. 536, στο εκχύλισμα του *H. perforatum,* στις διάφορες περιοχές της Ελλάδος

Για πρώτη φορά η ομάδα του Γεροθανάση είχε εντοπίσει την αδυπερφιρίνη (**24**) σε πολύ μικρές ποσότητες, στο *H. perforatum* και την είχε ονομάσει έτσι. Έκτοτε, έχει αναφερθεί πολλές φορές (Alali et al., 2009a; Alali et al., 2009b), αλλά η πιστοποίηση της γίνεται μόνο από το μοριακό της βάρος και όλοι αναφέρονται στην αρχική δημοσίευση της ομάδας Γεροθανάση. Επίσης, ήταν και ο πρώτος, ο οποίος έδωσε πλήρη περιγραφή της δομής μιας άλλης νέας ακυλο-φλωρογλυκινόλης τύπου Α, της υπερφιρίνης (**25**) (Εικόνα Α1).



Εικόνα Α1. Δομές της υπερφορίνης (**1**), της αδυπερφιρίνης (**24**) και της υπερφιρίνης (**25**)

Για τα δύο νέα αυτά προϊόντα προτάθηκε ότι περιέχουν στη δομή τους μια πρενυλο- αλυσίδα λιγότερη από την υπερφορίνη (**1**) και οι προτεινόμενες δομές για την αδυπερφιρίνη και την υπερφιρίνη ήταν αντίστοιχα η (**24**) και η (**25**), όπου απουσιάζει η πρενυλο - ομάδα από τον άνθρακα C-7.

Στη συγκεκριμένη εργασία (Tatsis et al., 2007) δεν δίδεται το φάσμα ^{1}H NMR της ένωσης (**24**) άλλα αναφέρονται επιλεκτικά μόνο μερικές κορυφές, ενώ επισημαίνεται ότι η ανάγνωση του φάσματος ήταν δύσκολη, λόγω της μικρής ποσότητας *«Additionally, the assignment of adhyperfirin was also attempted (Table 1), however, due to low concentration, ^{13}C NMR or 2D ^{1}H–^{13}C NMR experiments could not be performed for further unambiguous structure elucidation for both hyperfirin and adhyperfirin.»* (Tatsis et al., 2007). Τέλος, όσον αφορά την ένωση (**25**), όπου δίδεται το φάσμα ^{1}H NMR υπάρχει μια απλή κορυφή στα 1.2 ppm, η οποία αποδίδεται ως άγνωστη κορυφή «unknown peak»! (Εικόνα Α2).

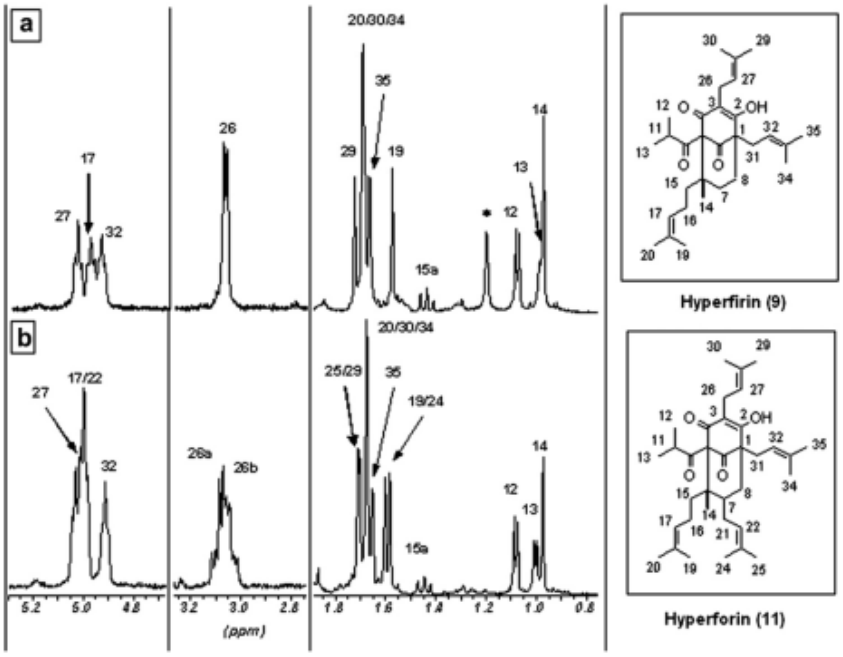


Fig. 4. Selective regions of the 400 MHz ^{1}H NMR after triple trapping on the same cartridge of (a) **9**, hyperfirin, and (b) **11**, hyperforin. The asterisk denotes an unknown peak.

Εικόνα Α2. ^{1}Η NMR της υπερφιρίνης (**25**) από την ομάδα του Γεροθανάση, ενώ υπάρχει άγνωστη κορυφή

Όλα τα ανωτέρω εγείρουν ερωτήματα και αφήνουν αμφιβολίες για τις προτεινόμενες δομές. Οι αμφιβολίες για τις δομές των ενώσεων (**24**) και (**25**) όπως έχουν αποδοθεί από την ομάδα του Γεροθανάση, ισχυροποιούνται περισσότερο από την μοναδικότητα της δομής τους ανάμεσα στις Πολυκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες (ΠΠΑ) τύπου Α. Πράγματι, αν κάποιος ανατρέξει στις δομές όλων των δημοσιευμένων ΠΠΑ τύπου Α (> 80) δεν υπάρχει ούτε ένα παράδειγμα χωρίς αλκυλο- υποκατάσταση στη θέση C-7 (Ciochina and Grossman, 2006).

Η απομόνωση περισσότερης ποσότητας της ένωσης (**24**), θα βοηθούσε στην αποσαφήνιση της δομής της με μεγαλύτερη βεβαιότητα (Βλέπε: Α.6. Αναθεώρηση της δομής της αδυπερφιρίνης).

Α.2. *Hypericum perforatum* Η ΚΑΠΟΙΟ ΑΛΛΟ ΕΙΔΟΣ ΦΥΤΟΥ;

Κατά τη συλλογή του *H. perforatum* με σκοπό την απομόνωση της υπερφορίνης (**1**), παρατηρήθηκε και ένα άλλο φυτό, το οποίο ήταν παρόμοιο με το υπέρικο, αλλά μικρότερο σε μέγεθος. Αποφασίστηκε η συλλογή του και η αναγνώρισή του πραγματοποιήθηκε (όπως και για το *Hypericum perforatum* herbarium No. 250_1) από την Δρ. Κατή Β., ερευνήτρια στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και από την κ. Σοφία Λυμπεροπούλου (Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο), οι οποίες πιστοποίησαν ότι επρόκειτο για το *Hypericum triquetrifolium* Turra (herbarium No. 474). Το φυτό έχει πολλές ονομασίες όπως γιούδουρας, αγούδουρος και γούδουρας και παλιά χρησιμοποιείτο για την παρασκευή σκουπών και ως υπόστρωμα για την αποξήρανση των καρπών (π.χ. σύκα, σταφίδα).

Εικόνες Α1, Α2. Φυτό *H. perforatum* και *H. Triquetrifolium* (Πηγή 1)

Από τις παραπάνω Εικόνες Α1 και Α2 είναι εμφανείς οι μακροσκοπικές διαφορές μεταξύ του *H. perforatum* (Εικόνα Α1) και του *H. triquetrifolium* (Εικόνα Α2) στη μορφολογία, στο ύψος και στο μέγεθος των ανθέων. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η μορφολογία του φυτού *H. triquetrifolium.*

Α.3. ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ *Hypericum triquetrifolium*

Το *H. triquetrifolium* είναι ένας πολυετές θάμνος, ύψους 15-55 cm με χαρακτηριστική πλατιά ταξιανθία. Έχει λείο βλαστό με υποεπιφανειακούς και μερικές φορές επιφανειακούς μαύρους αδένες, οι οποίοι επίσης απαντώνται στους μίσχους των φύλλων, στους ανθήρες και μερικές φορές στα σέπαλα και πέταλα (Robson, 1986).

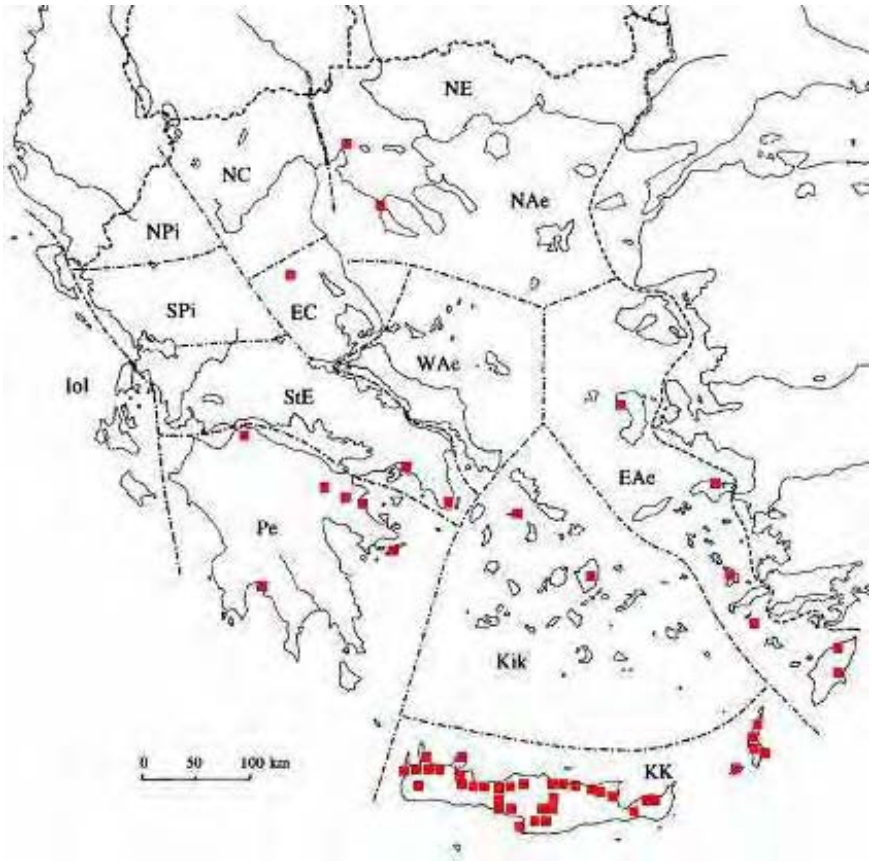
Εικόνα Α3. Άνθη του φυτού (Πηγή 2)

Το στέλεχος (βλαστός) του φυτού είναι όρθιο, κυλινδρικό, με διακλάδωση και σχηματίζει πυραμίδα, με μικρά τριγωνικά-λογχοειδή έως στενά-ωοειδή φύλλα, τα οποία φέρουν διαφανείς αδένες. Τα άνθη (Εικόνα Α3) είναι πολυάριθμα αμφιγονικά, χρυσοκίτρινα, διαμέτρου 5-7 mm, ακτινόμορφα, συνήθως πενταμερή. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι, μήκους 2,5-5 mm και ανθήρες μήκους 1,5-2 mm, οι οποίοι φέρουν μαύρους αδένες.

Τα σέπαλα είναι στενά, πολύ μικρότερα των πετάλων και δεν φέρουν στην επιφάνεια πόρους ή αδένες. Ο καρπός είναι ωώδης τύπου κάψας. Η περίοδος άνθησης (Εικόνα Α4) εκτείνεται από τον Μάιο έως το Σεπτέμβριο.

Εικόνα Α4. Το φυτό σε περίοδο ανθοφορίας (Πηγή 3)

Το είδος εξαπλώνεται στις θερμές εύκρατες περιοχές σε όλο τον κόσμο, με έντονη παρουσία στο χώρο της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής. Φύεται συνήθως σε ξηρά, βραχώδη ενδιαιτήματα και κατά μήκος καλλιεργούμενων εκτάσεων. Στην Εικόνα Α5 απεικονίζεται η γεωγραφική εξάπλωση του είδους στις 13 φυτογεωγραφικές περιοχές, όπως αυτές ορίζονται στη "Flora Hellenica" (1997). Συγκεκριμένα, το φυτό εντοπίζεται με μεγάλους πληθυσμούς στην Κρήτη, στην Κάρπαθο και στην Πελοπόννησο (Robson, 2002; Turland, 1993).



Εικόνα Α5. Γεωγραφική εξάπλωση του *H. triquetrifolium*

(NE: βόρεια-ανατολική, NC: βόρεια-κεντρική, NPi: βόρεια Πίνδος, SPi: νότια Πίνδος, EC: ανατολική-κεντρική, Ste: Στερεά Ελλάδα, Pe: Πελοπόννησος, Ion: Ιόνια νησιά, WAe: νησιά δυτικού Αιγαίου, NAe: νησιά βόρειου Αιγαίου, EAe: νησιά ανατολικού Αιγαίου, Kik: Κυκλάδες και KK: Κρήτη-Κάρπαθος)

Α.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ *Hypericum triquetrifolium*

Όσον αφορά την βιολογική δράση του *H. triquetrifolium* δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές όπως σύμβαίνει με το υπέρικο. Οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού (Stojanovic et al., 2013) είναι η υπερικίνη (**2**), η ψευδοϋπερικίνη (**5**), η κερκετίνη (**3**), η Ι3, ΙΙ8-διαπιγενίνη (**9**) και πρόσφατα προστέθηκαν η αδυπερφιρίνη (**24**) και η υπερφιρίνη (**25**) (Tatsis et al., 2006). Η αμεντοφλαβόνη (**8**) δεν απαντάται (Stojanovic et al., 2013). Όσον αφορά την ύπαρξη της υπερφορίνης (**1**) και της αδυπερφορίνης (**4**) δεν έχουν εντοπιστεί στο φυτό (Hosni et al., 2011).

Η αντιοξειδωτική δράση του οφείλεται στην υπερικίνη (**2**), στην κερκετίνη (**3**) και στην Ι3, ΙΙ8-διαπιγενίνη (**9**) (Couladis et al., 2002; Conforti et al., 2002). Η κερκετίνη (**3**) και η Ι3, ΙΙ8-διαπιγενίνη (**9**) απομονώθηκαν από τα άνθη του φυτού και εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών στελέχη (Pistelli et al., 2005). Τα μεθανολικά εκχυλίσματα του *H. triquetrifolium* έχουν αντιφλεγμονώδη και αντιμυκητιακή δράση (Ozturk et al., 2002; Fraternale et al., 2006).

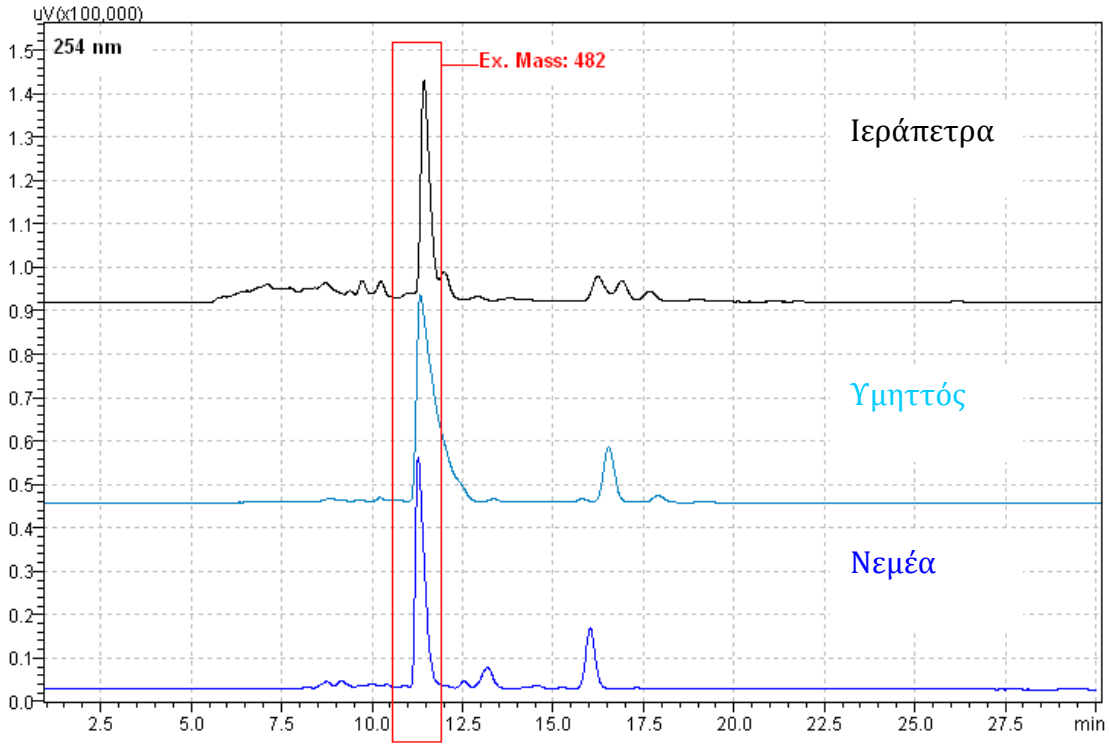
Α.5. ΑΔΥΠΕΡΦΙΡΙΝΗ ΣΤΟ *Hypericum perforatum* ΚΑΙ ΣΤΟ *Hypericum triquetrifolium*

Στο *H. perforatum* παρατηρήθηκε παραλλακτικότητα στην ποσότητα της αδυπερφιρίνης (**24**), σε σύγκριση με την υπερφορίνη (**1**) (Γράφημα Α1). Στο εκχύλισμα από τη συλλογή στη Θεσσαλονίκη δεν ανιχνεύθηκε αδυπερφιρίνη (**24**), αλλά μία ένωση με Μ.Β. 252. Στη συλλογή του Στενού Αρκαδίας η αναλογία υπερφορίνης: αδυπερφιρίνης (1:0,26) ήταν και η μεγαλύτερη. Στην Ιεράπετρα και στον Υμηττό οι ποσότητες της αδυπερφιρίνης ήταν ελάχιστες (Πίνακας Α1).

Πίνακας Α1. Αναλογία υπερφορίνης: αδυπερφιρίνης στο *H. perforatum* σε διάφορες περιοχές της Ελλάδος

Hypericum perforatum	
Τοποθεσία	**Αναλογία υπερφορίνης: αδυπερφιρίνης**
Στενό Αρκαδίας	1:0,26
Ιεράπετρα Κρήτης	1:0,08
Θεσσαλονίκη	1:0,00
Υμηττός	1:0,02

Τα άνθη του *H. triquetrifolium* εκχυλίστηκαν με την ίδια τεχνική, η οποία εφαρμόστηκε και στο *H. perforatum,* κατά την οποία δεν ανιχνεύτηκε καθόλου υπερφορίνη (**1**) (πειραματικό μέρος). Με έκπληξη διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα της αδυπερφιρίνης (**24**) ήταν μεγάλη, αφού πρόκειται για έναν από τους κύριους δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού. (Γράφημα Α2). Τα φυτικά υλικά συγκομίσθηκαν από την Ιεράπετρα, τον Υμηττό και τη Νεμέα.



Γράφημα Α2. Η ύπαρξη της ουσίας με Μ.Β. 482, στο *H. triquetrifolium,* από διάφορες περιοχές της Ελλάδος

Το ποσοστό της αδυπερφιρίνης (**24**) κυμαίνεται μεταξύ 2,25 έως 3,98%, ανά γραμμάριο φυτικού υλικού. Στον Πίνακα Α2 συγκεντρώνονται τα ποσοστά της αδυπερφιρίνης (**24**) στις διάφορες τοποθεσίες. Το μεγαλύτερο ποσοστό αδυπερφιρίνης (**24**), ανά γραμμάριο φυτού, είχε το *H. triquetrifolium* που συγκομίσθηκε από τη Νεμέα, με ποσοστό ουσίας 3,98%.

Πίνακας Α2. Το ποσοστό της αδυπερφιρίνης (**24**), ανά γραμμάριο στο *H. triquetrifolium*

Hypericum triquetrifolium			
Τοποθεσία	**Φυτικό Υλικό (g)**	**Ποσότητα Αδυπερφιρίνης (mg)**	**Ποσοστό (ανά g Φυτού) (%)**
Ιεράπετρα	60	135	2,25
Υμηττός	11,9	45	3,78
Νεμέα	133	530	3,98

Σε όλες τις εκχυλίσεις, χρησιμοποιήθηκε χλωρό φυτικό υλικό H. triquetrifolium. Στάδιο Ανάπτυξης: 1η – 3η- μέρα άνθισης.

Το επόμενο στάδιο ήταν η συλλογή των φασμάτων NMR (^{1}H, COSY και ^{13}C) και η περαιτέρω διερεύνηση - αναθεώρηση της δομής της αδυπερφιρίνης (**24**).

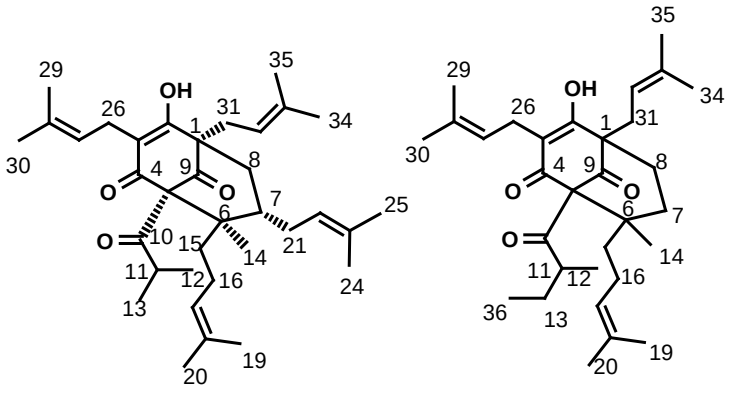
Α.6. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΑΔΥΠΕΡΦΙΡΙΝΗΣ

Από το μοριακό βάρος της αδυπερφιρίνης (**24**) και από το φάσμα του ^{1}H NMR, το οποίο λήφθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, η ένωση αυτή είχε μία μεθυλο-ομάδα στη θέση μιας πρενυλο-αλυσίδας, σε σχέση με την υπερφορίνη (**1**).

Το φάσμα του ^{1}H NMR της αδυπερφιρίνης (**24**)(Tatsis et al., 2007), το οποίο παρατίθεται στην Εικόνα Α6, δεν συσχετίζεται με την δομή που είχε προτείνει η ίδια ομάδα (Εικόνα 7).

5.09 (1H, *t*, *J* = 6.7 Hz, H-27), 5.01 (1H, *m*, H-17), 5.01 (1H, *m*, H-22), 3.10 (1H, *d*, *J* = 6.7 Hz, H-26), 1.73 (3H, *s*, H-29), 1.69 (3H, *s*, H-20), 1.69 (3H, *s*, H-30), 1.69 (3H, *s*, H-34), 1.67 (3H, *s*, H-35), 1.57 (3H, *s*, H-19), 1.44 (1H, *m*, H-15a), 1.07 (3H, *d*, *J* = 6.4 Hz, H-12), 0.98 (3H, *s*, H-14) Adhyperfirin

Εικόνα Α6. Το ^{1}H NMR της αδυπερφιρίνης (**24**) από τη δημοσίευση Tatsis et al., 2007

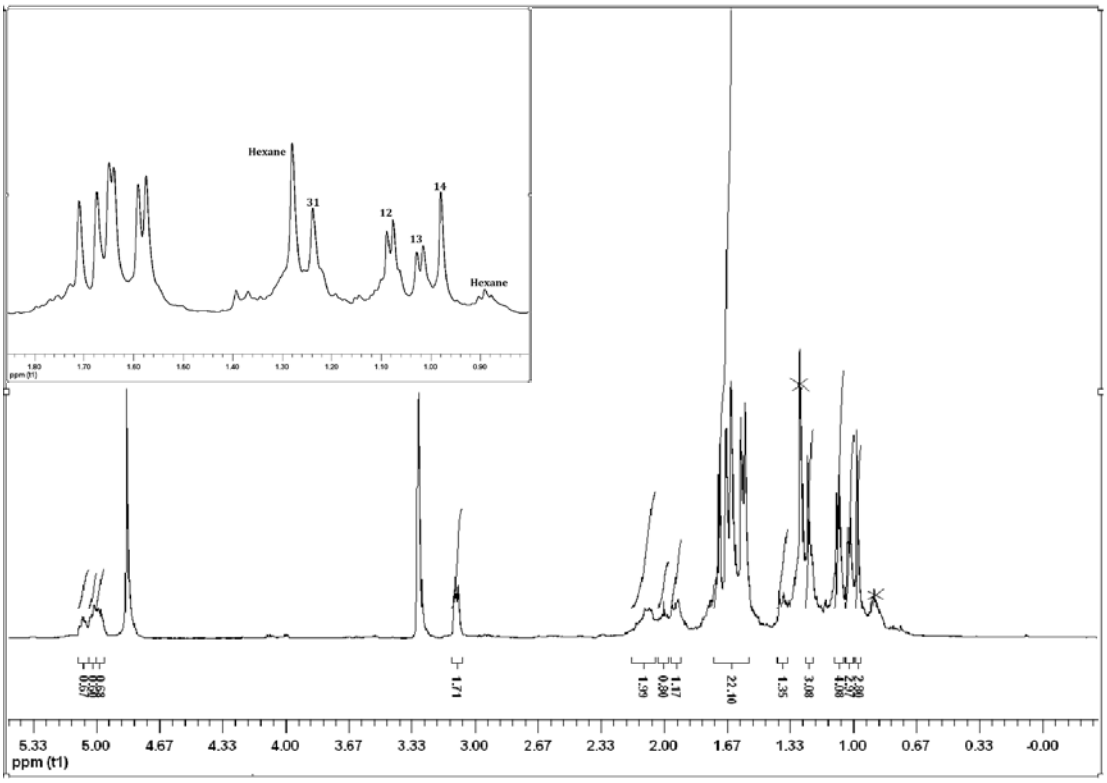


υπερφορίνη (1) **αδυπερφιρίνη (24)**

Εικόνα Α7. Αριθμημένες δομές της υπερφορίνης (**1**) και της αδυπερφιρίνης (**24**)

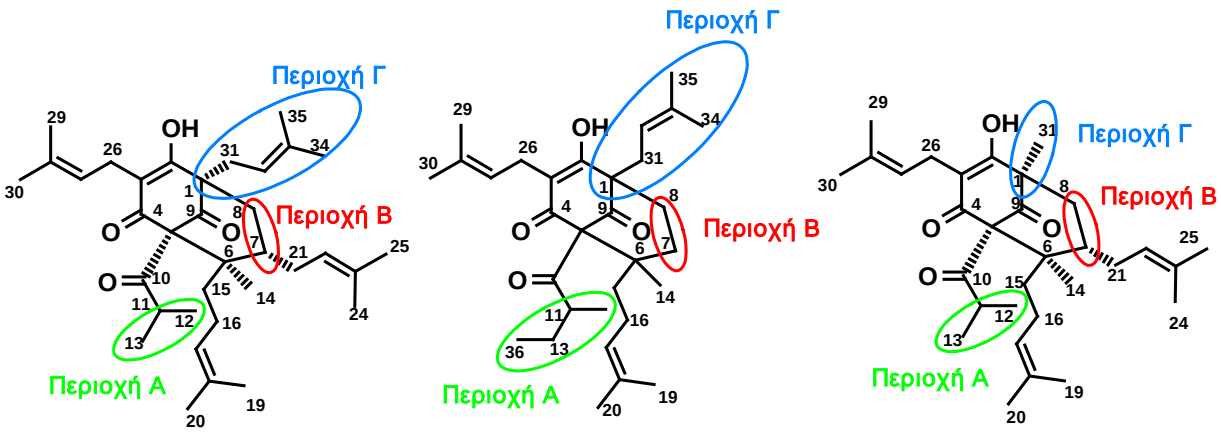
Το φάσμα της αδυπερφιρίνης (**24**), το οποίο παρατίθεται στην Εικόνα Α6 είναι ελλιπές, αφού βασικές κορυφές της δομής που είχε προτείνει η ομάδα του Γεροθανάση (Εικόνα Α7), δεν προσδιορίζονται. Αυτές είναι, η χαρακτηριστική πολλαπλή του CH_2-13 και η τριπλή κορυφή του CH_3-36.

Από τα παραπάνω δεδομένα αποφασίστηκε η περαιτέρω διερεύνηση της δομής της αδυπερφιρίνης (**24**) με στόχο την αναθεώρηση της δομής της (Εικόνα Α8).



Εικόνα Α8. Το ^{1}H NMR της αδυπερφιρίνης (**24**)

Η δομή, η οποία προτείνεται στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, απεικονίζεται στην Εικόνα Α9 με το συστημικό όνομα hyperibine J (**26**) (Βλ. παρακάτω).



υπερφορίνη (1) **αδυπερφιρίνη (24)** **hyperibine J (26)**

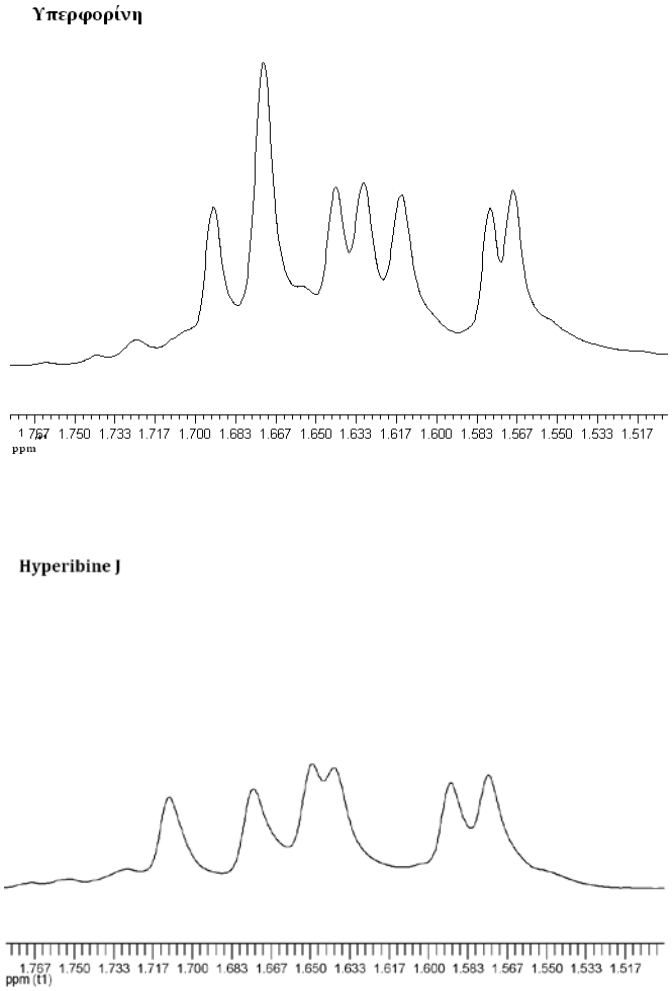
(Γεροθανάσης) (Αναθεωρημένη δομή)

Εικόνα Α9. Αριθμημένες δομές της υπερφορίνης (**1**), της αδυπερφιρίνης (**24**) (Γεροθανάσης) και της hyperibine J (**26**) (αναθεωρημένη δομή)

Οι χαρακτηριστικές «περιοχές» του μορίου της υπερφορίνης (**1**) απεικονίζονται στην Εικόνα Α9. Αυτές είναι: η «περιοχή Α», η οποία περιλαμβάνει τα μεθυλένια C_{12} και C_{13}. Η «περιοχή Β», η οποία περιλαμβάνει την πρενυλο-αλυσίδα του C_7. Τέλος, η «περιοχή Γ», περιλαμβάνει την πρενυλο-αλυσίδα του C_1.

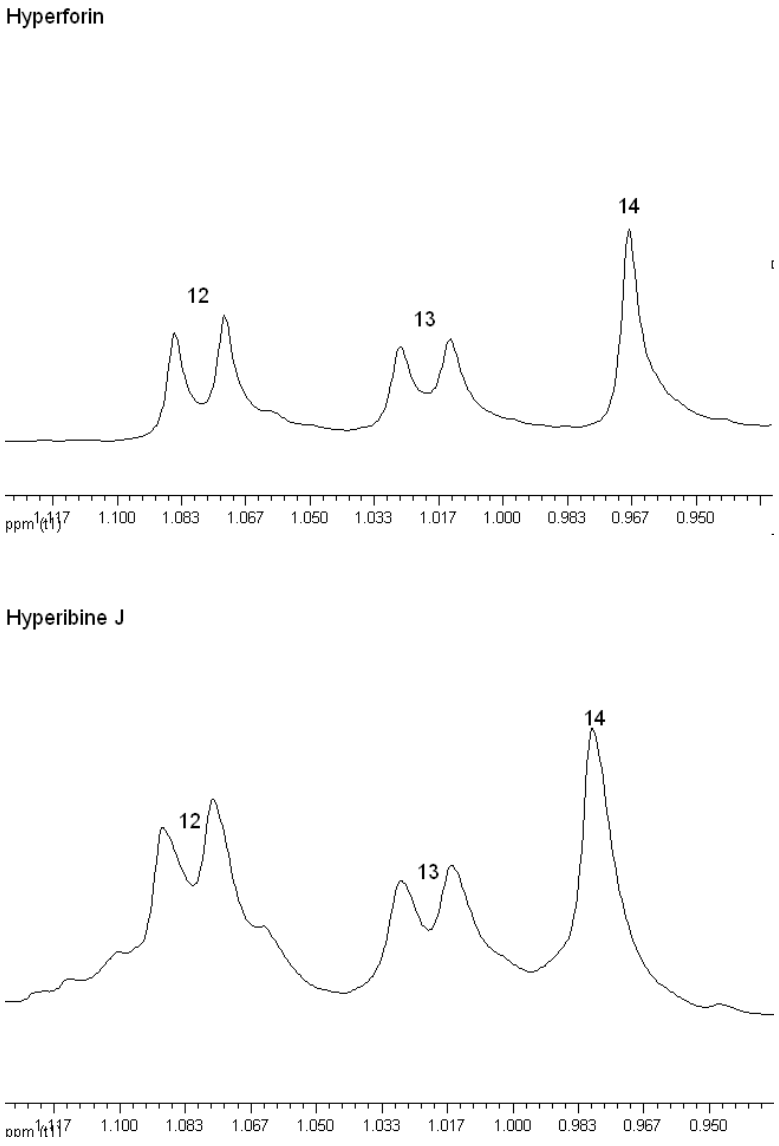
Από το φάσμα του ^{1}H NMR (Εικόνα Α8) και από την Εικόνα Α9 βγαίνουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η hyperibine J (**26**) έχει μία πρενυλο–αλυσίδα λιγότερη, σε σύγκριση με την υπερφορίνη (**1**) (Εικόνα Α10).



Εικόνα Α10. Τα μεθύλια των χαρακτηριστικών πρενυλο-ομάδων των ενώσεων (**1**) και (**26**)

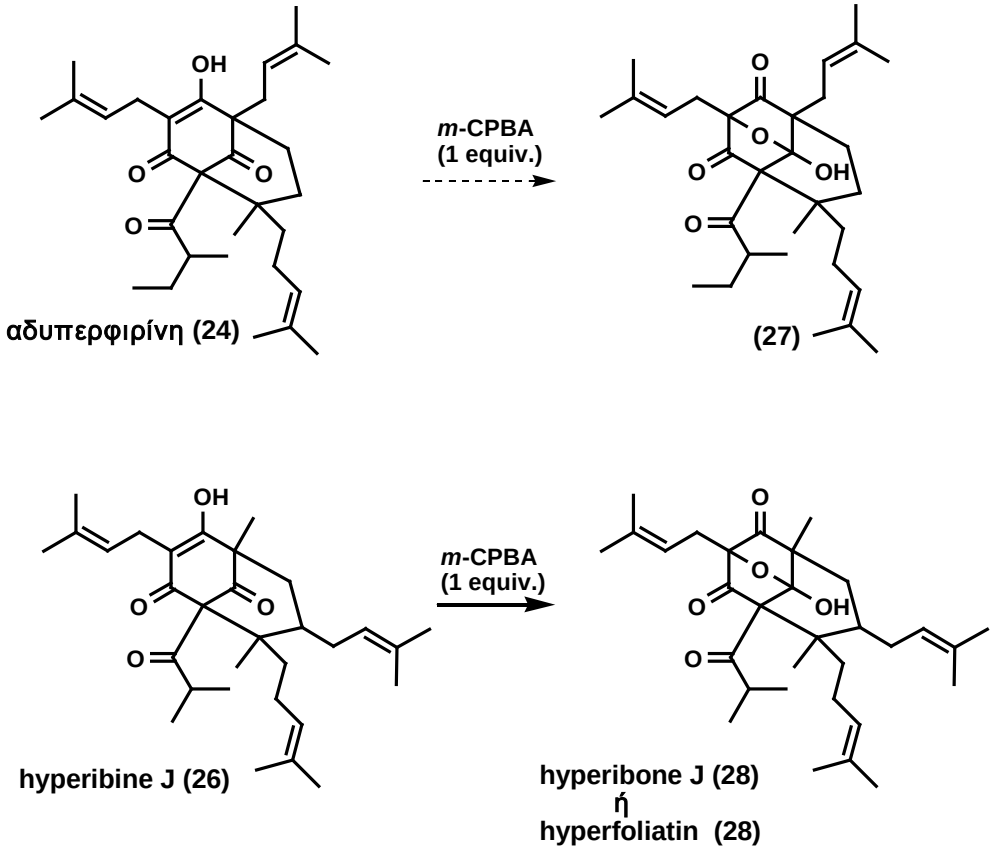
- «Περιοχή Α». Οι χημικές μετατοπίσεις των C_{12} και C_{13} της υπερφορίνης (**1**) και της hyperibine J (**26**) είναι πανομοιότυπη (Εικόνα Α11). Αντίθετα, η χαρακτηριστική πολλαπλή του C_{13} για την αδυπερφιρίνη (**24**) δεν προσδιορίστηκε από την ομάδα του Γεροθανάση (Εικόνα Α6).



Εικόνα Α11. Οι χημικές μετατοπίσεις των μεθυλενίων C_{12} και C_{13} της υπερφορίνης (**1**) και της hyperibine J (**26**)

- «Περιοχή Β». Οι χημικές μετατοπίσεις των C_7-C_8 είναι παρόμοιες στην υπερφορίνη (**1**) και στην hyperibine J (**26**). Για την αδυπερφιρίνη (**24**) δεν προσδιορίζονται, οι χημικές μετατοπίσεις των C_7 και C_8, από την ομάδα του Γεροθανάση (Εικόνα Α6).
- «Περιοχή Γ». Στην hyperibine J (**26**) το C_{31} είναι η απλή κορυφή στα 1.25 ppm (Εικόνα Α8 και Α9). Η συγκεκριμένη κορυφή δεν εμφανίζεται στην υπερφορίνη (**1**), αφού στη θέση αυτή υπάρχει η πρενυλο- ομάδα (Εικόνα Α9).

Για να επιβεβαιωθεί η δομή της hyperibine J (**26**) υπεβλήθη σε οξείδωση με *m*-CPBA ακολουθώντας το πρωτόκολλο, το οποίο είχε χρησιμοποιηθεί για την οξείδωση της υπερφορίνης (**1**) (Verotta et al., 2002).



Σχήμα Α1. Οξείδωση της αδυπερφιρίνης (**24**) και της hyperibine (**26**)

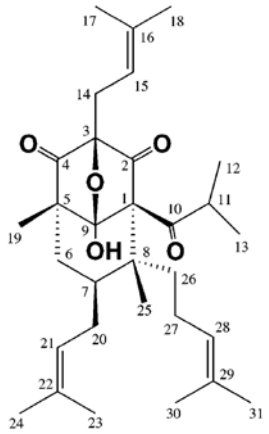
Αν η δομή, η οποία είχε προταθεί, από την ομάδα του Γεροθανάση (Tatsis et al) ήταν σωστή (Σχήμα Α1) θα έπρεπε να σχηματιστεί το προϊόν (**27**), ενώ αν ήταν σωστή η αναθεωρημένη δομή, η οποία προτείνεται στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής, θα σχηματιζόταν το προϊόν (**28**), το

οποίο είναι γνωστή ένωση. Από την οξείδωση σχηματίστηκε ένα μόνο προϊόν, το οποίο και απομονώθηκε. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα (LC-MS, ^{1}H και ^{13}C NMR) έδειξαν ότι τελικά πρόκειται για τη γνωστή ένωση (**28**), και ότι η σωστή δομή του αντιδρώντος είναι η (**26**), δηλαδή η hyperibine J.

Η οξειδωμένη hyperibine J (**28**) έχει δύο διαφορετικά ονόματα στην βιβλιογραφία, ενώ πρόκειται για την ίδια ένωση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι δυο ομάδες ανακάλυψαν την ουσία αυτή με διαφορά μερικών μηνών αλλά και στο ότι την ανακάλυψαν σε διαφορετικά είδη του γένους *Hypericum*. Η hyperibone J (Tanaka et al., 2004), προέρχεται από το φυτό *Hypericum scabrum*, ενώ η hyperfoliatin (Benkiki et al., 2003), προέρχεται από το φυτό *Hypericum perfoliatum*. Τα φάσματα των ^{1}H και ^{13}C NMR των hyperibone J και hyperfoliatin είναι ολόιδια με τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR, τα οποία λήφθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής για την οξειδωμένη hyperibine J (**28**).

Ενδεικτικά, παρατίθεται το ^{1}H NMR της hyperibone J (**28**) (Εικόνα Α12) και το ^{1}H NMR της οξειδωμένης από εμάς hyperibine J (**28**) (Εικόνα Α13).

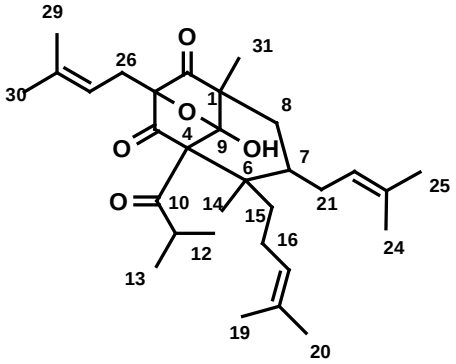
Hyperibone J (1): colorless oil; $[\alpha]_D$ +16.9° (*c* 0.3 $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} 3323, 2970, 2930, 1777, 1742, 1678, 1451, 1385, 1331, 1301, 1119; HRFABMS *m/z* 499.3461, $[M + H]^+$ (calcd for $C_{31}H_{47}O_5$, 499.3423); ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ_H 7.70 (1H, brs, OH-9), 5.02 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-15), 4.96 (1H, t, J = 5.3 Hz, H-28), 4.90 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-21), 3.18 (1H, sept, J = 6.6 Hz, H-11), 2.72 (1H, dd, J = 15.2, 7.3 Hz, H-14a), 2.53 (1H, dd, J = 15.2, 7.3 Hz, H-14b), 2.25 (1H, m, H-27a), 2.08 (1H, m, H-20), 1.86 (1H, dd, J = 14.3, 3.4 Hz, H-6eq), 1.80 (1H, m, H-27), 1.71 (1H, m, H-26a), 1.67 (3H, s, H_3-24), 1.64 (3H, s, H_3-31), 1.62 (1H, m, H-20), 1.62 (6H, s, H_3-17 and H_3-18), 1.57 (1H, m, H-26b), 1.56 (3H, s, H_3-30), 1.53 (3H, s, H_3-23), 1.28 (1H, m, H-6ax), 1.12 (3H, s, H_3-19), 1.08 (3H, d, J = 6.6 Hz, H_3-12), 1.04 (1H, m, H-7), 0.98 (3H, s, H_3-25), 0.91 (3H, d, J = 6.6 Hz, H_3-13); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) Table 1.



1

Εικόνα Α12. ^{1}H NMR και η δομή του hyperibone J (**28**) από τη δημοσίευση του Tanaka et al., 2004

Οξειδωμένη hyperibine J (28): colorless oil; $[\alpha]_D$ +15° (*c* 0.3 $CHCl_3$); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) *δ* 7.74 (1H, brs, 0H-9), 5.01 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-27), 4.96 (1H, t, *J* = 6.3 Hz, H-17), 4.89 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-22), 3.18 (1H, sept, *J* = 6.6 Hz, H-11), 2.72 (1H, dd, *J* = 15.7, 6.9 Hz, H-26a), 2.53 (1H, dd, *J* = 15.5, 7.6 Hz, H-26b), 2.23 (1H, m, H-16a), 2.06 (1H, m, H-21a), 1.86 (1H, dd, *J* = 14.4, 3.4 Hz, H-8eq), 1.78 (1H, m, H-16b), 1.71 (1H, m, H-15a), 1.67 (3H, s, H_3-25), 1.65 (3H, s, H_3-20), 1.62 (1H, m, H-21b), 1.62 (6H, s, H_3-29 and H_3-30), 1.56 (1H, m, H-15b), 1.56 (3H, s, H_3-19), 1.54 (3H, s, H_3-24), 1.28 (1H, m, H-8ax), 1.13 (3H, s, H_3-31), 1.08 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H_3-12), 1.03 (1H, m, H-7), 0.98 (3H, s, H_3-14), 0.91 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H_3-13).



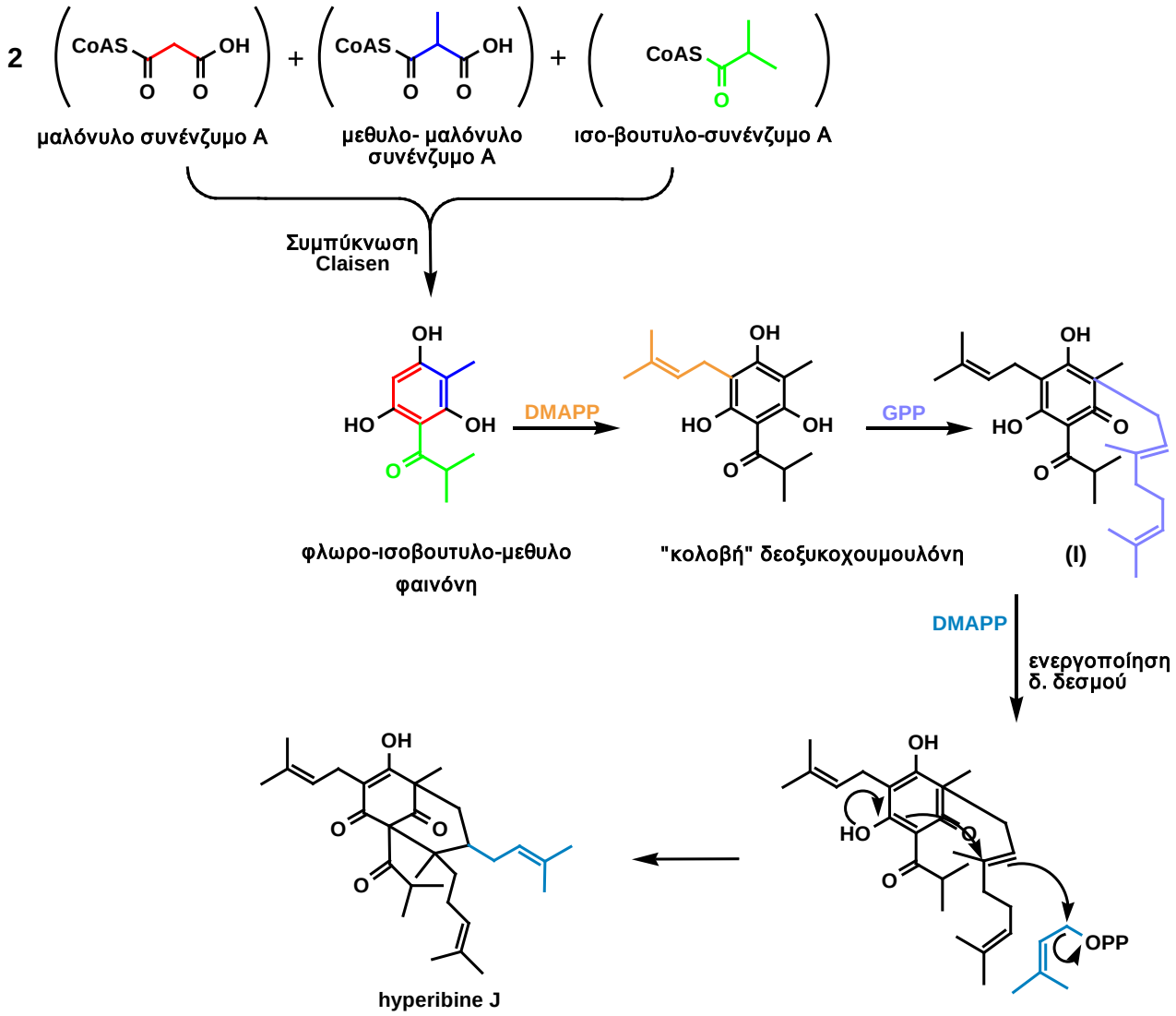
οξειδωμένη hyperibine J

Εικόνα Α13. ^{1}H NMR και η δομή της οξειδωμένης hyperibine J (**28**)

Τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν ότι η δομή που είχε προτείνει η ομάδα του Γεροθανάση ήταν λάθος και ότι η σωστή δομή είναι αυτή, η οποία προτείνεται στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της hyperibine J (**26**) δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία έως τώρα. Η δομή της (**26**) έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον, αφού έχει μία μεθυλο-ομάδα στη θέση μιας πρενυλο-αλυσίδας. Στο Σχήμα Α2 παρατίθεται το πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι της hyperibine J (**26**). Η hyperibine J (**26**) πιθανώς να προέρχεται από μια "κολοβή" δεοξυκοχουμουλόνη, όπως φαίνεται στο Σχήμα Α2. Η βιοσύνθεση της hyperibine J (**26**) που Σχήματος Α2 είναι παρόμοια με αυτή της υπερφορίνης (**1**), η οποία παρατίθεται στο Κεφάλαιο 1.7.

Πιο αναλυτικά, ο προτεινόμενος μηχανισμός της βιοσύνθεσης, είναι ο ακόλουθος (Σχήμα Α2): ένα μόριο ισοβουτυλο-συνενζύμου Α, δύο μόρια μαλονυλο-συνενζύμου Α και ένα μόριο μεθυλο-μαλονυλο-συνενζύμου Α αντιδρούν και με τη βοήθεια της συνθάσης της ισοβουτυροφαινόνης (BUS), πραγματοποιείται συμπύκνωση Claisen η οποία παράγει την φλωρο-ισοβουτυλο-μεθυλο-φαινόνη. Στη συνέχεια δύο ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις με τη διμεθυλο-αλλυλο-διφωσφορική μονάδα (DMAPP) και με ένα μόριο διφωσφορικού γερανυλίου (GPP) σχηματίζουν το ενδιάμεσο μόριο (I). Ένα δεύτερο μόριο DMAPP μέσω ηλεκτρόφιλης προσθήκης στο 2'-3' διπλό δεσμό της (προϋπάρχουσας) αλυσίδας γερανυλίου ενεργοποιεί το δακτύλιο, κι έτσι κυκλοποιείται, δίνοντας τη δομή της hyperibine J (**26**).



Σχήμα Α2. Πιθανός μηχανισμός βιοσύνθεσης της hyperibine J (**26**)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alali, F.Q.; Tawaha, K. *Saudi Pharm. J.* **2009**, *17*, 269– 274.

Alali, F.Q.; Tawaha, K.; Gharaibeh, M. *Z. Naturforsch. C.* **2009**, *64*, 476-482.

Benkiki, N.; Kabouche, Z.; Tillequin, F.; Verite, P.; Chosson, E.; Seguin, E. *Z. Naturforsch.* **2003**, *58c*, 655-658.

Ciochina, R.; Grossman, R.B. *Chem. Rev.* **2006,** *106*, 3963-3986.

Conforti, F.; Statti, G.A.; Tundis, R.; Menichini, F.; Houghton, P. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 479-483.

Couladis, M.; Baziou, P.; Verykokidou, E.; Loukis, A. *Phytother. Res.*, **2002**, *16*, 769-770.

Fraternale, D.; Bertoli, A.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Ricci, D.; Menichini, F.; Trinciarelli, E.; Pistelli, L. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 1117-1122.

Hosni, K.; Msaada, K.; Taarit, M.B.; Marzouk, B. *Biochem. Systematics Ecol.* **2011**, *39*, 43–50.

Ozturk, B.; Apaydin, S.; Goldeli, E.; Ince, I.; Zeybek, U. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *80*, 207-209.

Pistelli, L.; **Bertoli, A.; Morelli, I.; Menichini, F.; Musmanno, R.A.; Di Maggio, T.; Coratza, G.** *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 787-791.

Robson, N.K.B. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinb.* **1986**, *43*, 255-265.

Robson, N.K.B. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Bot.* **2002**, *32*, 61-123.

Stojanović, G.; Dorđević, A.; Smelcerović, A. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2273-2295.

Tanaka, N.; Takaishi, Y.; Shikishima, Y.; Nakanishi, Y.; Bastow, K.; Lee, KH.; Honda, G.; Ito, M.; Taked, Y.; Kodzhimatov, O.K.; Ashurmetov, O. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67,* 1870-1875.

Tatsis, E.C.; Boeren, S.; Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I.P. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 383–393.

Turland, N.J.; Chilton, L.; Press, J.R. *Flora of the Cretan area. Annotated checklist and atlas.* London: H.M.S.O. 1993, pp.439.

Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Bianchi, F.; Sterner, O.; Lovati, M.; Bombardelli, E. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 433-8.

ΠΗΓΕΣ

1. http://flora.huji.ac.il/browse.asp?action=specie&specie=HYPTRI
2. http://xlorida.blogspot.gr/2012/12/hypericum-empetrifolium-80.html
3. http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum_triquetrifolium

ΜΕΡΟΣ Β

Β.1. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΜΕ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ ΔΡΑΣΗ

Από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα έχουν ανακαλυφθεί οι εντομοκτόνες ή απωθητικές ιδιότητες πολλών προϊόντων και σκευασμάτων, τα οποία προέρχονται από φυτά. Σήμερα, υπάρχουν περισσότερα από 2.000 είδη φυτών, τα οπόια περιέχουν χημικές ενώσεις με εντομοκτόνες ιδιότητες (Mongelli et al., 2002; Ratnayake et al., 2001). Η πιο γνωστή είναι η περίπτωση του πυρέθρου, το οποίο μάλιστα χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα στη φυσική του μορφή (φυσικές πυρεθρίνες) ως εντομοκτόνο ευρέος φάσματος για πάρα πολλά έντομα όπως μελίγκρες, κάμπιες, διάφορες μύγες, κ.λπ.

Οι φυσικές πυρεθρίνες είναι εστέρες, οι οποίοι απομονώνονται από την εκχύλιση των ανθέων ενός είδους χρυσανθέμου, του *Chrysanthemum cinerariaefolium* L. Οι ξηρές ανθοταξίες του περιέχουν κατά μέσο όρο 1,2 % φυσικές πυρεθρίνες, το οποίο είναι μείγμα 4 ή 6 διαφορετικών εντομοκτόνων ουσιών. Ένα τυπικό εκχύλισμα πυρέθρου περιέχει τα ακόλουθα ποσοστά πυρεθρινών: pyrethrin I (35%), pyrethrin II (32%), cinerin I (10%), cinerin II (14%), jasmolin I (5%) και jasmolin II (4%). Οι πυρεθρίνες έχουν χαρακτηριστεί από το Τμήμα Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών ως «*το ασφαλέστερο εντομοκτόνο για χρήση σε φυτά προς βρώση*» ενώ «*μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιβάλλον όπου υπάρχουν φαγώσιμα*». Δεν έχει, επίσης, αναφερθεί ποτέ περιστατικό καρκινογένεσης ή επίδρασης σε έμβρυα από τη χρήση τους. Εμφανίζουν πολύ καλή εντομοκτόνο δράση αλλά η παρασκευή τους είναι σχετικά ακριβή και οι παραγόμενες δραστικές ουσίες είναι ασταθείς στην υπεριώδη ακτινοβολία και στη θερμοκρασία (Πηγή 1).

Άλλο ένα παράδειγμα φυσικού εντομοκτόνου είναι η ροτενόνη (παράγεται από τις ρίζες του φυτού *Derris elliptica* Lour.), το οποίο χρησιμοποιείτο στο παρελθόν για την καταπολέμηση μεγάλου αριθμού εντόμων, όπως μελίγκρες, κάμπιες, διάφορες μύγες, αρκετά σκαθάρια, κ.λπ. αλλά η χρήση του έχει εκτοπιστεί από τα συνθετικά χημικά εντομοκτόνα.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες όμως, μετά την εκτεταμένη και πολλές φορές αλόγιστη χρήση συνθετικών χημικών εντομοκτόνων, η οποία συνοδεύτηκε και από προβλήματα σοβαρής επιβάρυνσης του φυσικού περιβάλλοντος καθώς και από την επέκταση του φαινομένου της

ανθεκτικότητας, τα φυσικής προέλευσης βιοκτόνα αποτελούν πάλι σημαντικό αντικείμενο για την επιστημονική κοινότητα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, η καταπολέμηση των κουνουπιών πρέπει να στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην καταπολέμηση ή τον περιορισμό των προνυμφών και συμπληρωματικά στην καταπολέμηση των τελείων εντόμων. Εκτός από τα συνθετικά εντομοκτόνα υπάρχουν και ουσίες φυσικής προέλευσης για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ικανοποιητική αποτελεσματικότητα εναντίον των κουνουπιών. Περισσότερα από 340 είδη φυτών παράγουν ουσίες, όπως αιθέρια έλαια ή φυσικά προϊόντα, τα οποία έχουν αποτελεσματική δράση εναντίον των κουνουπιών (Cheng et al., 2004; El Hag et al., 1999; Trabousli et al., 2002).

Μεταξύ των φυτικών ουσιών οι οποίες έχουν μελετηθεί είναι τα αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα από τα φυτά *Eucalyptus globulus* Labill. (Οικ. Myrtaceae) και *Cymbopogon nardus* L. (Οικ. Poaceae), τα οποία αποδείχθηκε ότι είχαν απωθητική δράση ενάντια σε κουνούπια του είδους *Cx. pipiens* με αποτέλεσμα την παραγωγή βιολογικών σκευασμάτων στην διεθνή αγορά (Amer and Mehlhorn, 2006a, 2006b). Επίσης, η προνυμφοκτόνος δράση σε κουνούπια του είδους *Cx. pipiens* έχει αξιολογηθεί στα φυσικά προϊόντα αλκαννίνης (Michaelakis et al., 2009) και κουρκουμίνης I, II και III (Sagnou et al., 2012).

Β.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ *Hypericum perforatum*

Τα άνθη του *H. perforatum* συγκομίσθηκαν τον Ιούνιο 2011, από τη Θεσσαλονίκη, το Στενό Αρκαδίας, την Ιεράπετρα και τον Υμηττό με σκοπό την απομόνωση της υπερφορίνης (**1**) σε μεγάλη ποσότητα, για τη σύνθεση αναλόγων της καθώς και την αξιολόγηση της δραστικότητάς τους. Στον Πίνακα Β1 παρατίθενται τα ποσοστά της υπερφορίνης (**1**) στις διάφορες τοποθεσίες.

Πίνακας Β1. Το ποσοστό της υπερφορίνης (**1**), ανά γραμμάριο *H. perforatum*

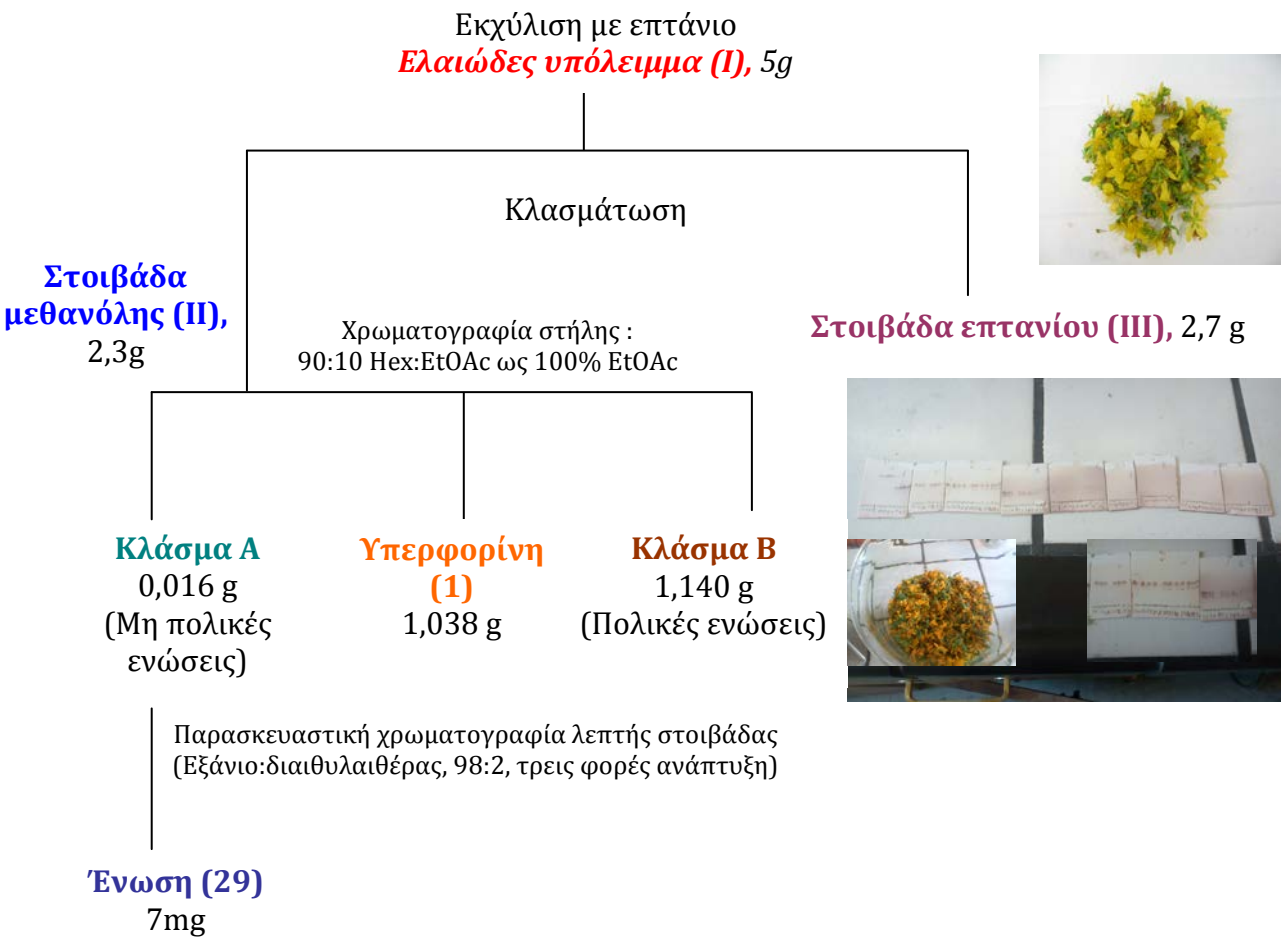
Hypericum perforatum			
Τοποθεσία	**Φυτικό Υλικό (g)**	**Ποσότητα υπερφορίνης (mg)**	**Ποσοστό (ανά g Φυτού) (%)**
Στενό Αρκαδίας	150	1038	0,69
Ιεράπετρα	11,8	85,6	0,73
Θεσσαλονίκη	16	96,9	0,61
Υμηττός	500	2890	0,58

Το ποσοστό της υπερφορίνης (**1**) κυμαίνεται από 0,58 έως 0,73%, ανά γραμμάριο φρέσκου φυτικού υλικού. Το μεγαλύτερο ποσοστό υπερφορίνης (**1**) παρατηρείται στη συλλογή των ανθέων από την περιοχή της Ιεράπετρας (0,73 %), ακολουθεί το Στενό Αρκαδίας (0,69 %), η Θεσσαλονίκη (0,61 %) και ο Υμηττός (0,58 %).

Η εκχύλιση κάθε συλλογής έγινε ξεχωριστά. Ενδεικτικά, στο Σχήμα Β1 περιγράφεται η εκχύλιση του φυτικού υλικού που συλλέχθηκε από το Στενό Αρκαδίας, τον Ιούνιο του 2011 (Πειραματικό Μέρος Β).

ΚΟΝΙΟΡΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΜΕΡΗ ΤΟΥ *Hypericum perforatum*

(Χλωρά άνθη 150 g)



Σχήμα Β1. Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης του *H. perforatum* (τοποθεσία Στενό Αρκαδίας) και της απομόνωσης της υπερφορίνης (**1**) και των Κλασμάτων Α και Β

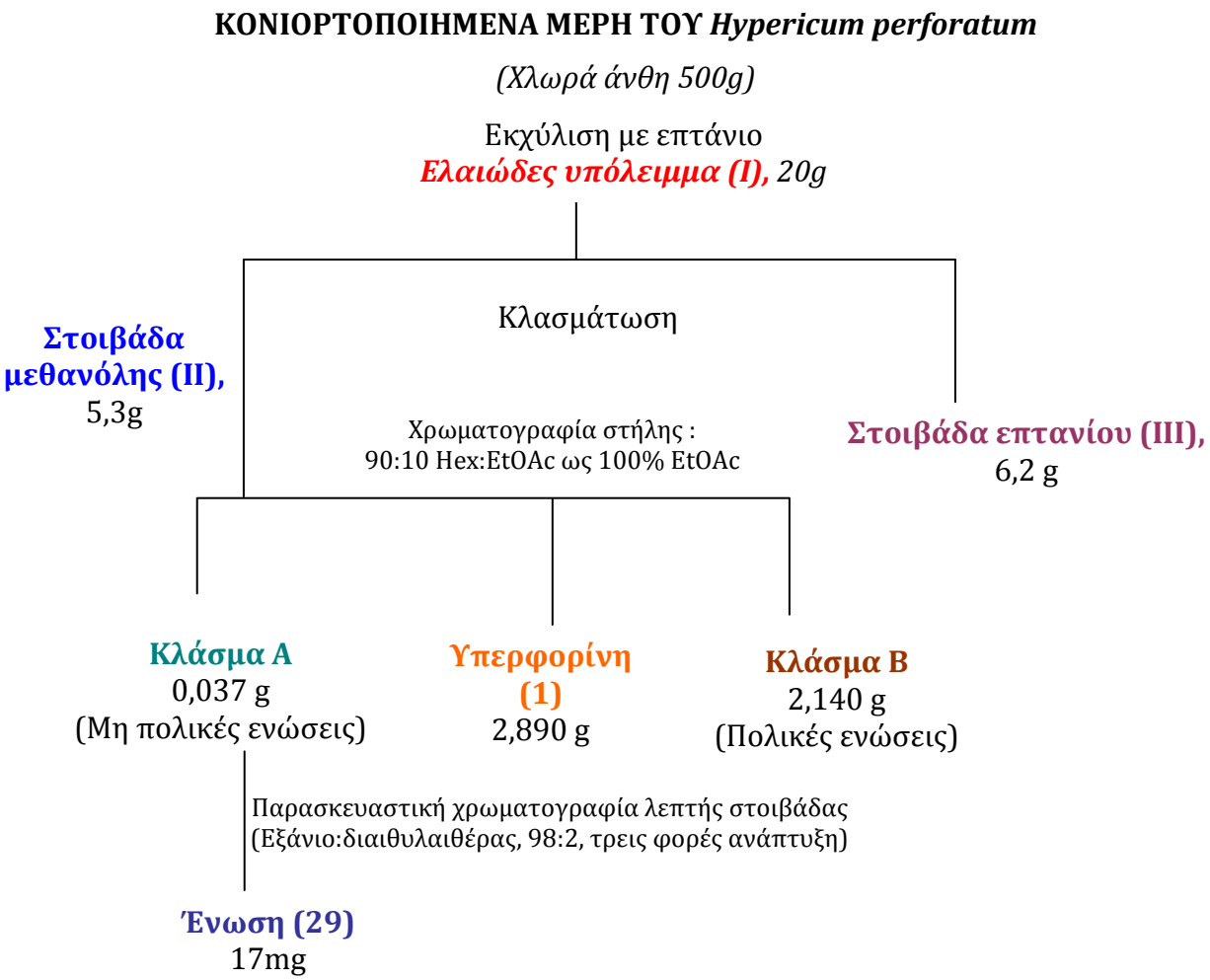
Στο Σχήμα Β1 παρατίθενται η σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης του *H. perforatum,* καθώς και η ποσότητα του κάθε κλάσματος. Η στοιβάδα της μεθανόλης (ΙΙ) περιλαμβάνει το Κλάσμα Α (το οποίο περιέχει την ένωση (**29**) και άλλες ενώσεις, οι οποίες είναι ήδη γνωστές από τη βιβλιογραφία), την υπερφορίνη (**1**) και το Κλάσμα Β (το οποίο περιέχει περισσότερο πολικές ενώσεις από την υπερφορίνη, οι οποίες είναι γνωστές από τη βιβλιογραφία).

Όλα τα εκχυλίσματα, από τις διάφορες συγκομιδές, είχαν παρόμοια χημική κατανομή, σύμφωνα με το Σχήμα Β1. Ακολουθήθηκε το πειραματικό πρωτόκολλο της Adam (Adam et al., 2002) για την εκχύλιση - απομόνωση της υπερφορίνης (**1**) και των Κλασμάτων Α και Β.

Σε όλες τις εκχυλίσεις, χρησιμοποιήθηκε χλωρό φυτικό υλικό H. perforatum. Στάδιο Ανάπτυξης: 1η – 3η μέρα άνθισης. Περίοδος συλλογής: Ιούνιος 2011.

Β.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ *Hypericum perforatum*

Για την απομόνωση περισσότερης ουσίας από την ένωση (**29**) πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ανθέων του *H. perforatum* που συγκομίσθηκαν από τον Υμηττό, τον Ιούνιο του 2011. Στο Σχήμα Β2 περιγράφεται η σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης του υπέρικου.

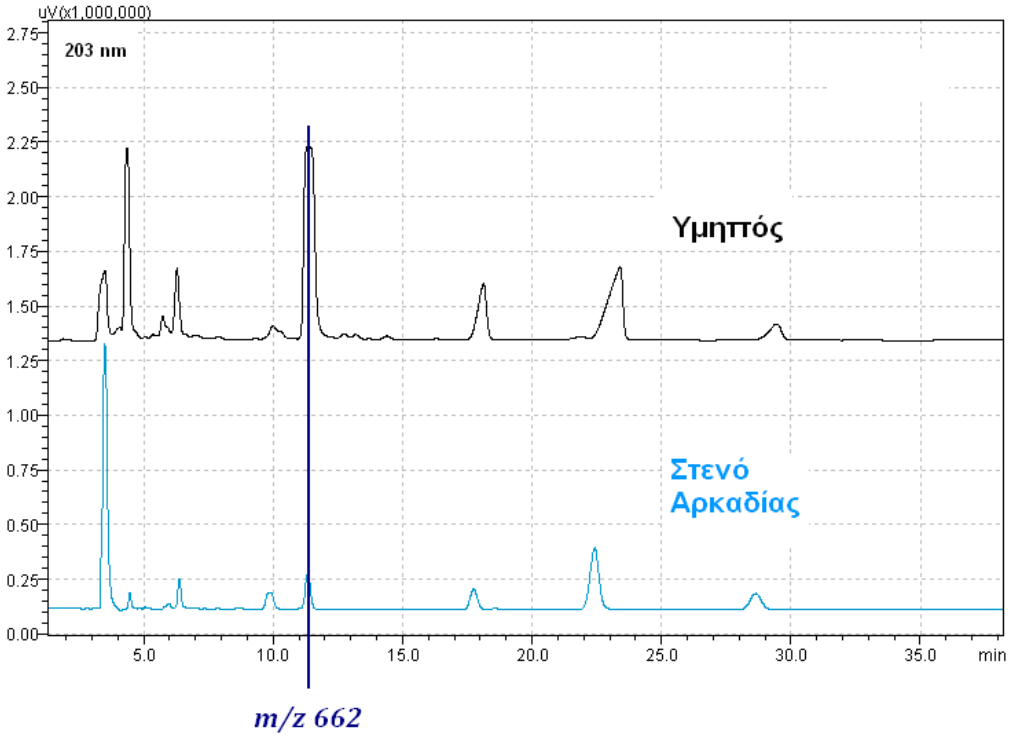


Σχήμα Β2. Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης του *H. perforatum* (τοποθεσία Υμηττός) και της απομόνωσης της μη πολικής ένωσης (**29**)

Αναλυτικότερα, στο Κλάσμα Α πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο: διαιθυλαιθέρας, 99:1) και εν συνεχεία, για να ξεχωρίσει η ένωση (**29**) πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Εξάνιο:διαιθυλαιθέρας, 98:2, τρεις φορές ανάπτυξη). Η διαδικασία απομόνωσης τους ήταν ιδιαίτερα δύσκολη και χρονοβόρα, διότι ήταν μια άπολη ένωση (R*f* : 0,57 για την ένωση (**29**), (Εξάνιο:διαιθυλαιθέρας, 99:1). Η ένωση (**29**) απομονώθηκε σε ικανοποιητική ποσότητα (17 mg). Εν συνέχεια, μετρήθηκε το μοριακό της βάρος και λήφθησαν τα φάσματα ^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC, HMBC και NOESY NMR (Παράρτημα Ι).

Β.4. ΕΥΡΕΣΗ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΜΕ Μ.Β. 722

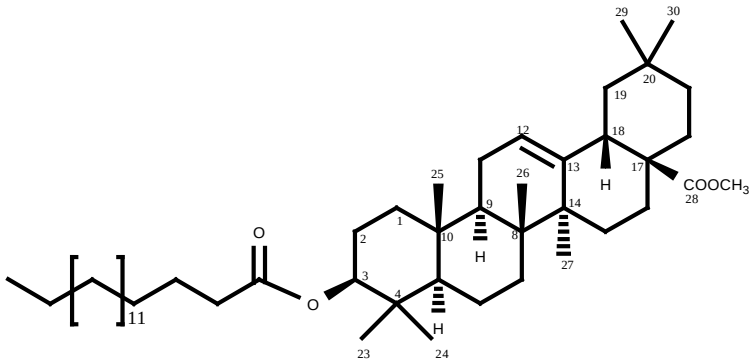
Στο φάσμα μάζας της ένωσης (**29**) παρατηρήθηκε θραύσμα σε *m/z* 662 (Γράφημα Β1).



Γράφημα Β1. Ανίχνευση της ένωσης (**29**), μέσω της ανίχνευσης του θραύσματος σε *m/z* 662

Τα φάσματα 1D και 2D NMR της ένωσης (**29**) αναλύθηκαν από τον Καθηγητή Ρούσση Βασίλειο και τη Λέκτορα Ιωάννου Ευσταθία (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ). Συγκεκριμένα, τα φασματοσκοπικά δεδομένα (^{1}H και ^{13}C NMR) υπέδειξαν ότι επρόκειτο για έναν εστέρα τριτερπενίου. Οι ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που εμφανίστηκαν στα φάσματα COSY, HSQC, HMBC και NOESY επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση και αποσαφήνισαν τη δομή της ένωσης (**29**), ως τον μεθυλεστέρα του 3*β*-δεκαεπτανυλοξυ-ολεαν-12-εν-28-ικού οξέος (methyl 3*β*-heptadecanoyloxy-olean-12-en-28-oate) με Μοριακό Βάρος 722 (Εικόνα Β1). Για την επιβεβαίωση του μεγέθους του λιπαρού οξέος, με το οποίο είχε εστεροποιηθεί ο μεθυλεστέρας του ολεανολικού οξέος, μικρή ποσότητα της ένωσης (**29**) υποβλήθηκε σε όξινη υδρόλυση σε μεθανόλη παρουσία HCl. Ο μεθυλεστέρας του λιπαρού οξέος, ο οποίος προέκυψε αναλύθηκε με GC-MS, οπότε και ταυτοποιήθηκε ως ο

μεθυλεστέρας του δεκαεπτανοϊκού οξέος, επιβεβαιώνοντας τη προτεινόμενη δομή. Είναι εμφανές ότι το θραύσμα σε *m/z* 662, το οποίο είχε παρατηρηθεί στο φάσμα μάζας, αφορούσε το προϊόν απόσπασης ενός μορίου φορμικού μεθυλεστέρα από την ένωση (**29**).

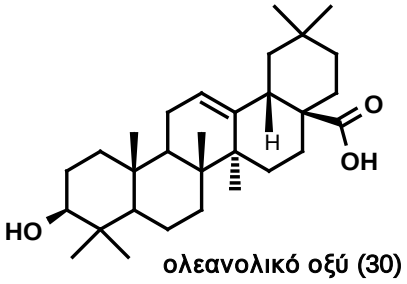


μεθυλεστέρας του 3β-δεκαεπτανυλοξυ-ολεαν-12-εν-28-ικού οξέος (29)

Εικόνα Β1. Η δομή της ένωσης (**29**)

*Αξίζει να σημειωθεί ότι για η ένωση (**29**) είναι ένα νέο φυσικό προϊόν. Επίσης, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η απομόνωση τριτερπενίων ή παραγώγων τους από το είδος H. perforatum.*

Η ένωση (**29**) προέρχεται από το ολεανολικό οξύ (**30**) (Εικόνα Β2). Το ολεανολικό οξύ (**30**) είναι ένα πεντακυκλικό τριτερπένιο, το οποίο έχει απομονωθεί από 1620 περίπου φυτά (Pollier and Goossens, 2012).



ολεανολικό οξύ (30)

Εικόνα Β2. Δομή του ολεανολικού οξέος (**30**)

Τα φαρμακευτικά φυτά που περιέχουν ολεανολικό οξύ είναι είδη από το γένος *Syzygium* sp., το *Viscum album*, το *Prosopis glandulosa*, το *Phordendron juniperium*, το *Ternstromia gymnathema*, το *Hyptis capitata*, το *Phytolaca americana*, *το Olea europea* και το *Olea africana*. Η ελιά περιέχει την περισσότερη ποσότητα ολεανικού οξέος (**30**) (Pollier and Goossens, 2012).

Υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για την ύπαρξη τριτερπενίων στο γένος *Hypericum sp.*, οι οποίες περιορίζονται μόνο στο ολεανολικό οξύ (**30**) και συνοψίζονται στον Πίνακα Β2. Η συγκέντρωση του ολεανολικού οξέος (**30**) παρατηρείται σε διαφορετικά μέρη του φυτού, ανάλογα με το είδος. Στο *H.*

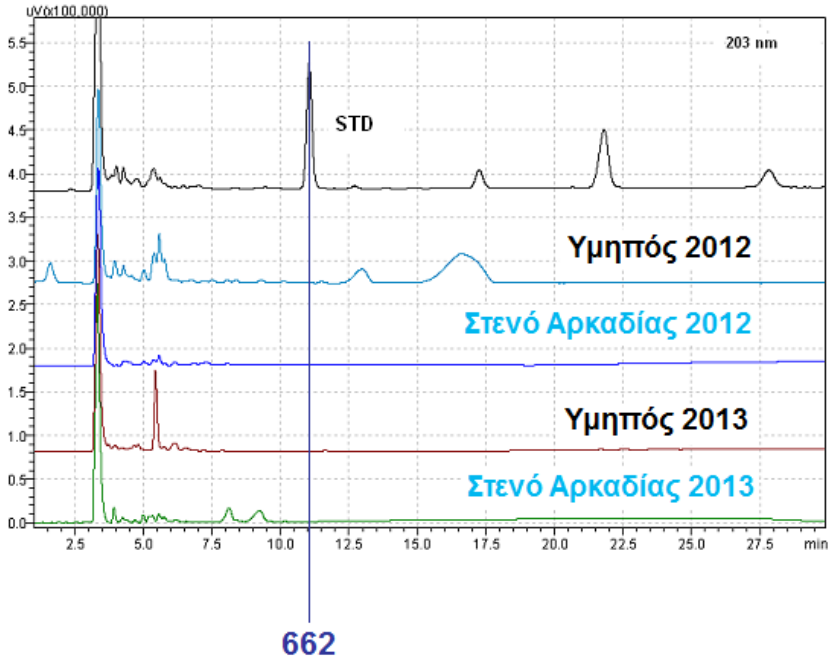
geminiflorum εντοπίζεται στις ρίζες του, στο *H. monogynum* στα άνθη και στα φύλλα και στο *H. patulum* στα άνθη του (Fai and Tao, 2009). Τέλος, στο *H. wightianum* εντοπίζεται σε όλο το φυτό (Tao et al., 2004).

Πίνακας Β2. Κατανομή του ολεανολικού οξέος (**30**) στα διάφορα φυτικά μέρη του *Hypericum* sp. (Fai and Tao, 2009; Tao et al.,2004)

Ολεανολικό οξύ (30)		
Είδη	*Μέρη φυτού*	*Βιβλιογραφία*
Hypericum geminiflorum	Ρίζες	Fai and Tao, 2009
Hypericum monogynum	Άνθη Φύλλα	Fai and Tao, 2009
Hypericum patulum	Άνθη	Fai and Tao, 2009
Hypericum wightianum	Σε όλο το φυτό	Tao et al., 2004

Β.5. ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ (29) ΣΤΟ *Hypericum perforatum*

Η ένωση (**29**) δεν εντοπίστηκε ως μεταβολίτης στις συγκομιδές των επόμενων ετών (Ιούνιος 2012 και 2013) (Γράφημα Β2), παρόλο που συγκομίσθηκε από τις ίδιες περιοχές, στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης και ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο εκχύλισης και απομόνωσής της.

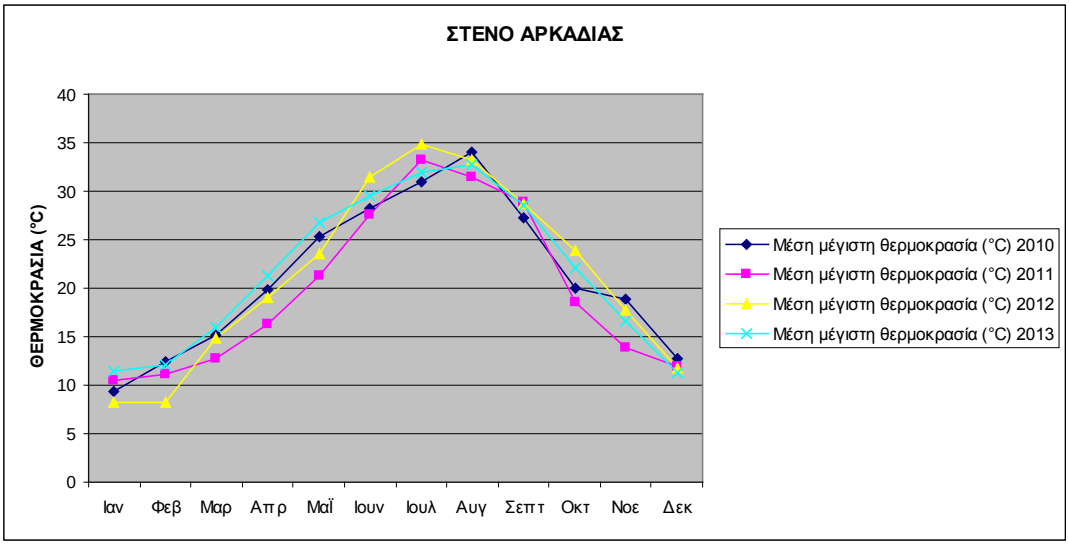


Γράφημα Β2. Ανίχνευση της ένωσης (**29**), μέσω της ανίχνευσης του αποσπασμένου μορίου με Μ.Β. 662, κατά τα έτη 2012 και 2013

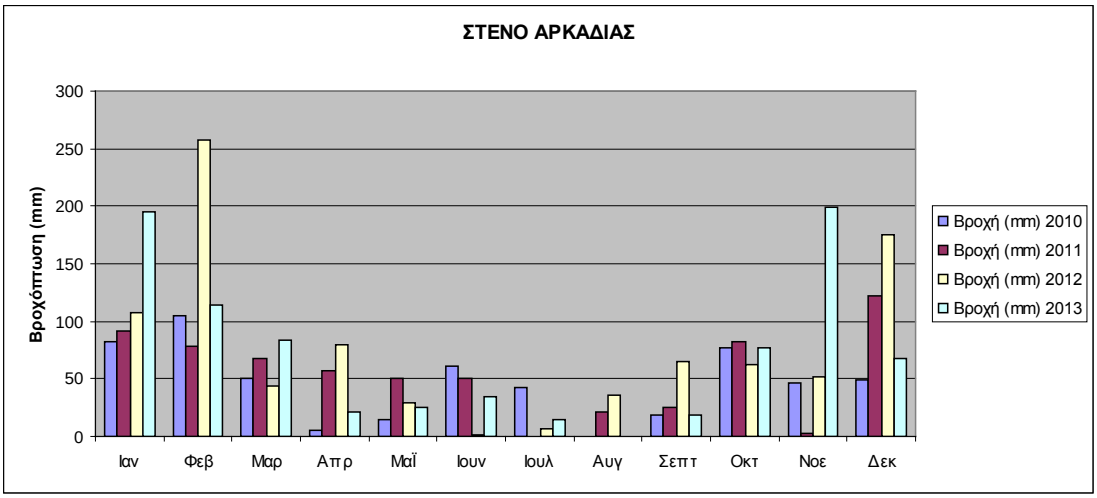
Στα φυτά η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών επηρεάζεται από τη βροχόπτωση και την θερμοκρασία. Η έλλειψη της βροχόπτωσης προκαλεί μεταβολικές αντιδράσεις, με αποτέλεσμα να ευνοείται ο σχηματισμός των μεταβολιτών. Ομοίως, και η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη σύσταση και την ποσότητα των μεταβολιτών μέσα στο φυτό (Hughes et al., 1989; Διδακτορική διατριβή του Δρ. Γ. Παναγόπουλου, 2012).

Για να ερμηνευθεί η μη ανίχνευση της ένωσης (**29**) στα εκχυλίσματα, μελετήθηκε η επίδραση του περιβάλλοντος. Οι παράγοντες, οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν η μέση μηνιαία θερμοκρασία (°C) και η μέση μηνιαία βροχόπτωση (mm), στο Στενό Αρκαδίας και στον Υμηττό, κατά τα έτη 2010-

2013. Οι μεταβολές των μέσων μηνιαίων τιμών θερμοκρασίας καθώς και η ολική μηνιαία βροχόπτωση παρουσιάζονται στα Διαγράμματα **1-4**. Τα στοιχεία πάρθηκαν από το Εθνικό Αστεροσκοπείο Αθηνών.

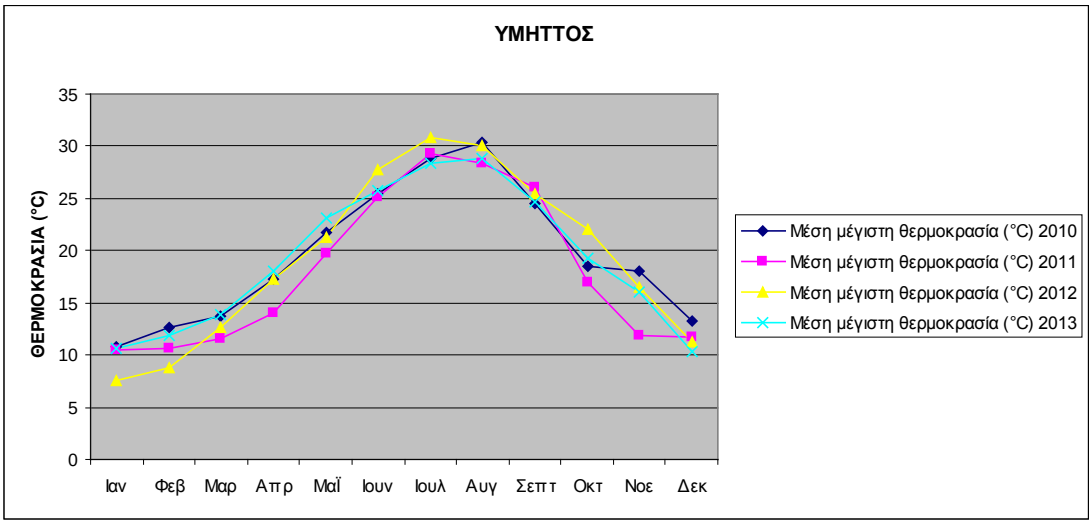


Διάγραμμα Β1. Πορεία της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας στο Στενό Αρκαδίας, κατά τα έτη 2010-2013

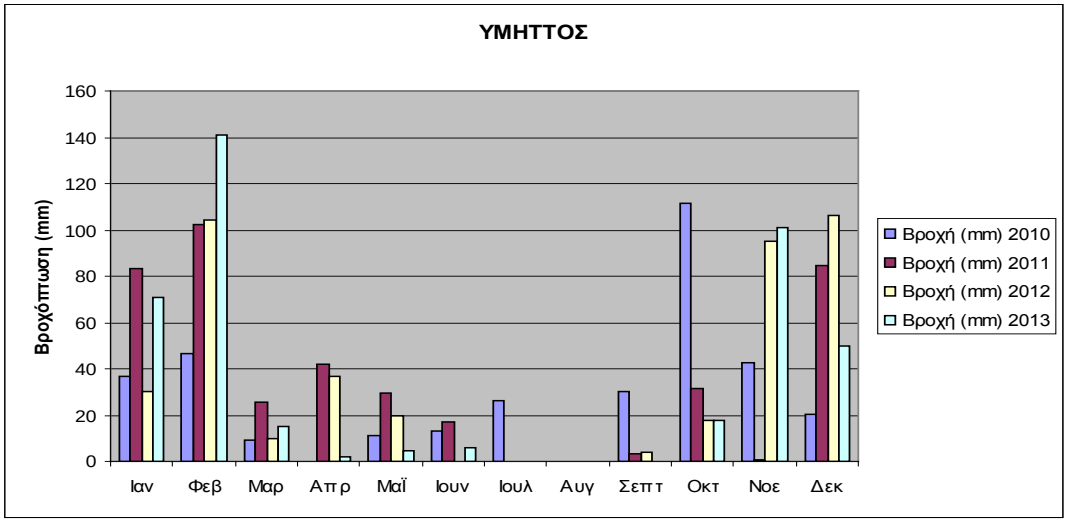


Διάγραμμα Β2. Πορεία της μηνιαίας βροχόπτωσης στο Στενό Αρκαδίας, κατά τα έτη 2010-2013

Όσον αφορά το Στενό Αρκαδίας, από τα παραπάνω Διαγράμματα **1** και **2** προκύπτει ότι η χαμηλή μέση θερμοκρασία τους μήνες Μάρτιο έως Μάιο, κατά το έτος 2011, είχε ως αποτέλεσμα, πιθανόν, τον σχηματισμό του μεταβολίτη (**29**). Η μέση ολική βροχόπτωση (κατά το έτος 2012) το Φεβρουάριο και τον Απρίλιο ήταν σε υψηλά επίπεδα σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη (2010 και 2011). Εικάζεται ότι η έλλειψη βροχόπτωσης, κατά τα έτη 2010 και 2011, μπορεί να είναι η αιτία του σχηματισμού του μεταβολίτη (**29**).



Διάγραμμα Β3. Πορεία της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας στον Υμηττό, κατά τα έτη 2010-2013



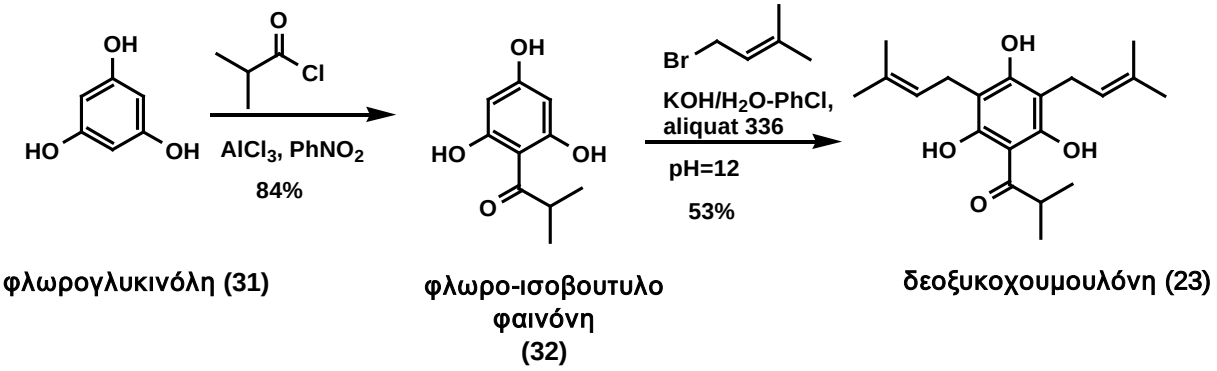
Διάγραμμα Β4. Πορεία της μηνιαίας βροχόπτωσης στον Υμηττό, κατά τα έτη 2010-2013

Αντίστοιχα, στον Υμηττό τους μήνες Μάρτιο έως Μάιο, κατά το έτος 2011, επικρατούσε η χαμηλότερη μέση θερμοκρασία σε σύγκριση με τα επόμενα έτη (2012 και 2013) αυτό είχε ως συνέπεια, πιθανόν, τον σχηματισμό του μεταβολίτη (**29**). Τον Μάρτιο και τον Απρίλιο του 2010 παρατηρείται μειωμένη βροχόπτωση, η οποία ευνόησε το σχηματισμό του μεταβολίτη (**29**). Η μέση ολική βροχόπτωση του Φεβρουαρίου του 2012 και 2013 ήταν έντονη και εικάζεται ότι αυτή εμπόδισε τον σχηματισμό του μεταβολίτη (**29**) τα συγκεκριμένα έτη.

Β.6. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΕΟΞΥΚΟΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗΣ

Για την σύνθεση των Μονοκυκλικών Πολυπρενυλιωμένων Ακυλοφλωρογλυκινολών (ΜΠΑ) έχουν δημοσιευθεί πολλές μέθοδοι (Qi and Porko, 2007; Stevens et al., 2000; Cann et al., 1984). Η σύνθεση της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) βασίστηκε στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας του Burckhhardt (Burckhhardt, 1978), η οποία ήταν ελλιπής σε λεπτομέρειες με αποτέλεσμα να διεξαχθούν πειραματικές δοκιμές για την εύρεση των καλύτερων συνθηκών για την μέγιστη απόδοση.

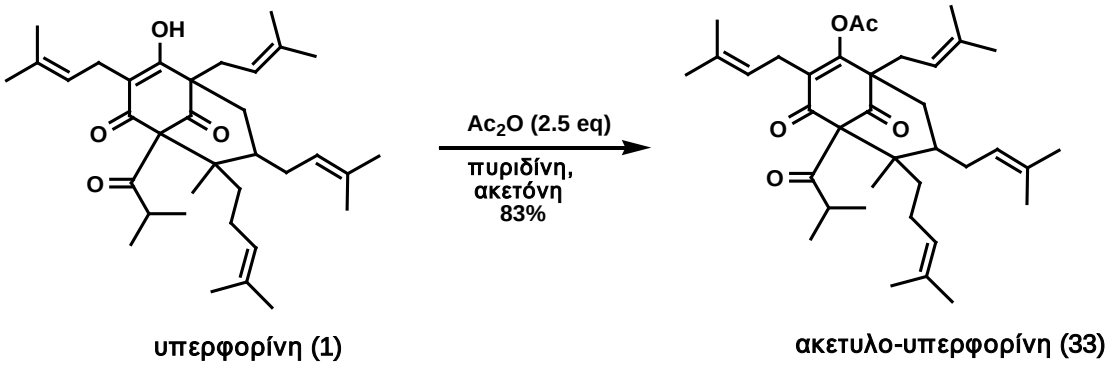
Η σύνθεση της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) επετεύχθη με την ακυλίωση της φλωρογλυκινόλης (**31**) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) και την παραλαβή της φλωρο-ισοβουτυλο-φαινόνης (**32**). Εν συνεχεία, η αλκυλίωση της (**32**) σε διφασικό σύστημα νερού–χλωροβενζολίου και καυστικό κάλιο ως βάση με pH=12 (Σχήμα Β3) έδωσε την δεοξυκοχουμουλόνη (**23**). Η αντίδραση είχε καλύτερη απόδοση (53%), όταν η ανάδευση πραγματοποιείτο με μηχανικό αναδευτήρα.



Σχήμα Β3. Σύνθεση της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**)

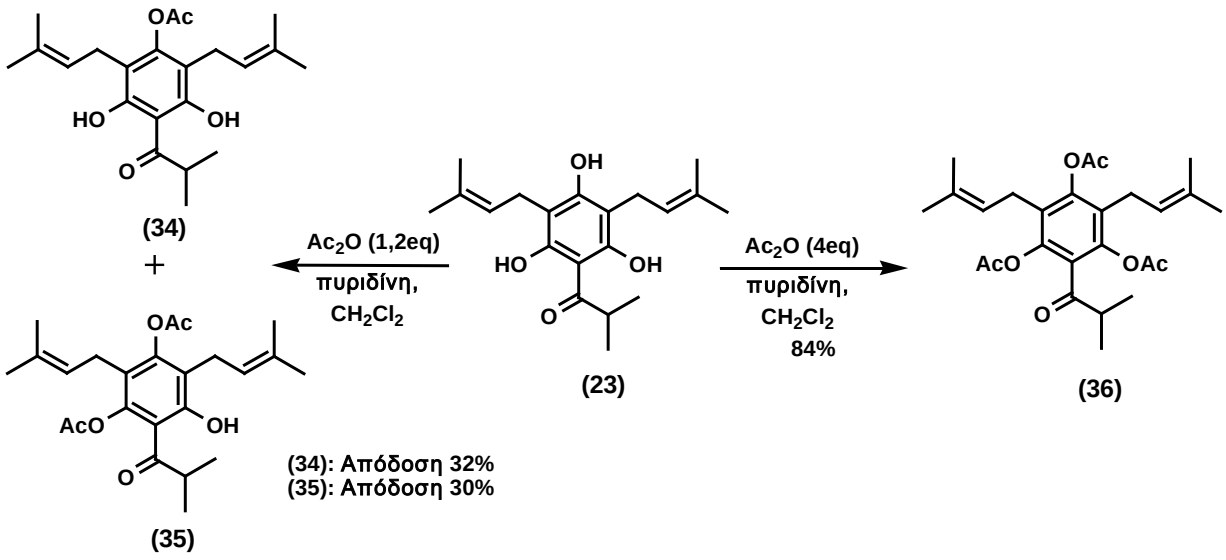
Β.7. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΚΕΤΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΕΟΞΥΚΟΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗΣ

Η υπερφορίνη (**1**) αντιδρά με τον οξικό ανυδρίτη (Ac_2O) παρουσίας πυριδίνης παρέχοντας την ακετυλο-υπερφορίνη (**33**), με απόδοση 83% (Σχήμα Β4) (Verotta et al., 2002).



Σχήμα Β4. Σύνθεση της ακετυλο-υπερφορίνης (**34**)

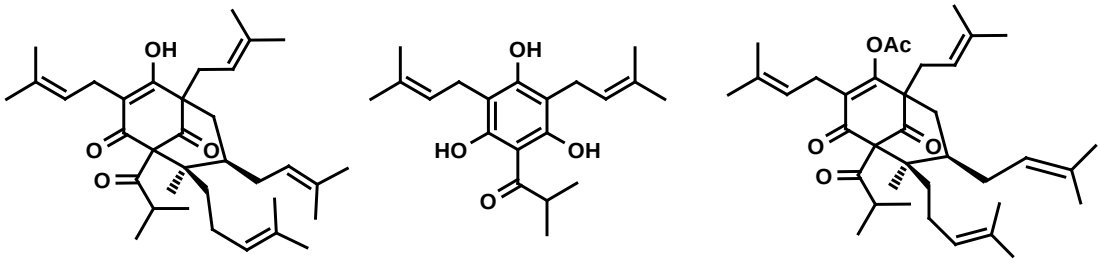
Η δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) αντιδρά με τον οξικό ανυδρίτη (Ac_2O), παρουσίας πυριδίνης για βάση, παρέχοντας τα ανάλογα: το μονο-ακετυλο-δεοξυκοχουμουλόνη (**34**), το δι–ακετυλο-δεοξυκοχουμουλόνη (**35**) και το τρι-ακετυλο-δεοξυκοχουμουλόνη (**36**) (Σχήμα Β5) (Mitsopoulou et al., 2014).

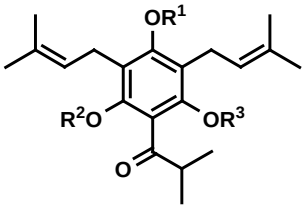


Σχήμα Β5. Σύνθεση των αναλόγων της δεοξυκοχουμουλόνης (**34**), (**35**) και (**36**)

Β.8. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΕΟΞΥΚΟΧΟΥΜΟΥΛΟΝΗΣ

Για πρώτη φορά αξιολογείται η αποτελεσματικότητα της υπερφορίνης (**1**), της πρόδρομης ένωσής της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) καθώς και των ακετυλιωμένων παράγωγων τους, εναντίον προνυμφών κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens* biotype *molestus*. Στην Εικόνα Β3 παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων οι οποίες δοκιμάστηκαν.





μονο-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (34): R^1, R^3=H, R^2= Ac
δι-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (35): R^1, R^2=Ac, R^3= H
τρι-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (36): R^1, R^2, R^3= Ac

Εικόνα Β3. Χημικές δομές των ενώσεων οι οποίες δοκιμάστηκαν

Β.8.1. Βιοδοκιμές προνυμφοκτόνου δράσης

Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens*, προερχόμενες από την εργαστηριακή αποικία του είδους που εκτρέφεται στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο.

Σε βιοδοκιμές με νέες ουσίες ενδείκνυται η χρήση εντόμων από εργαστηριακές εκτροφές καθώς έτσι μπορούμε να εξασφαλίσουμε μεγάλο αριθμό εντόμων, ίδιας ηλικίας και ομοιόμορφης καλής κατάστασης.

Η συγκεκριμένη αποικία κουνουπιών διατηρείται στο Μ.Φ.Ι. εδώ και 35 χρόνια και θεωρείται ως πληθυσμός ευαίσθητος στις διάφορες χημικές ομάδες βιοκτόνων (δεν έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα).

Β.8.2. Εκτροφή

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εργαστηριακό χώρο του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κατάλληλο για την πραγματοποίηση βιοδοκιμών, απαλλαγμένο από βιοκτόνα, χωρίς ρεύματα αέρα και απότομες αλλαγές θερμοκρασίας ενώ η θέση εκτελέσεως των βιοδοκιμών δεν βρισκόταν κάτω από την άμεση επίδραση των ηλιακών ακτινών. Οι συνθήκες πραγματοποίησης των βιοδοκιμών ήταν σε θερμοκρασία 25±2ºC, φωτοπερίοδο 14 ωρών φως και 10 ωρών σκοτάδι και σχετική υγρασία 80%.

Η εργαστηριακή εκτροφή γίνεται ως εξής: Τα ωά των κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens* τοποθετούνται σε εμαγιέ λεκάνες διαμέτρου 28 cm ανοικτού χρώματος, με λίγη τροφή για να εκκολαφθούν και να εμφανιστούν οι νέες προνύμφες. Η επώαση των ωών διαρκεί 2–3 ημέρες.

Εν συνεχεία οι προνύμφες (Εικόνα Β4) τρέφονται με αποξηραμένο ψωμί και ζύμη ώστε να εξασφαλίζονται οι απαραίτητες ποσότητες σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και μέταλλα (Bentley, 1989). Η χορήγηση τροφής στις προνύμφες γίνεται κάθε μέρα. Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση του προνυμφικού σταδίου κυμαίνεται από 7-10 μέρες, ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και τη διαθεσιμότητα τροφής.

Εικόνα Β4. Εκτροφή προνυμφών

Όταν ολοκληρωθεί το προνυμφικό στάδιο, οι προνύμφες μεταμορφώνονται σε νύμφες. Οι νύμφες συλλέγονται με ειδικούς συλλέκτες από τις λεκάνες εκτροφής σε πλαστικά κύπελλα διαμέτρου 8 cm (Εικόνα Β5) και τοποθετούνται στους κλωβούς για το τελικό στάδιο της αλλαγής τους σε τέλεια

έντομα. Η συχνότητα συλλογής νυμφών είναι κάθε δύο ημέρες. Το νυμφικό στάδιο διαρκεί περίπου 3–4 μέρες.

Τα ακμαία τρέφονται με διάλυμα νερού και ζάχαρης, το οποίο τοποθετείται μέσα στον κάθε κλωβό (Εικόνα Β6) σε ένα μικρό γυάλινο δοχείο μαζί με μια κατασκευή σαν φιτίλι από διηθητικό χαρτί και βαμβάκι, για την ευκολότερη λήψη του διαλύματος από τα έντομα. Δύο τέτοια διαλύματα είναι τοποθετημένα στον κλωβό και αντικαθιστώνται από καινούρια κάθε τέσσερις μέρες.

Εικόνα Β5. Συλλογή νυμφών από τη λεκάνη εκτροφής και τοποθέτηση αυτών σε πλαστικό κύπελλο

Εικόνα Β6. Κλωβός εκτροφής Συλλογή νυμφών από τη λεκάνη εκτροφής και τοποθέτηση αυτών σε πλαστικό κύπελλο

Β.8.3. Πείραμα προνυμφοκτονίας

Υλικά

Για την εκτέλεση της βιοδοκιμής χρησιμοποιήθηκαν:

α) Γυάλινα δοχεία ή ποτήρια ζέσεως χωρητικότητας 200 ml τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές (Εικόνα Β7).

β) Ένας ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml.

γ) Μηχανικές πιπέτες για τη μέτρηση και τοποθέτηση των ουσιών μέσα στα γυάλινα δοχεία.

δ) Προνύμφες κουνουπιών 3^{ης} - 4^{ης} ηλικίας, οι οποίες τοποθετούνται σε γυάλινα δοχεία.

ε) Νερό από το δίκτυο υδρεύσεως. Η θερμοκρασία του διαλύματος κατά την διάρκεια της βιοδοκιμής ήταν 25 ± 2 °C.

στ) Χώρος με συνθήκες κατάλληλες για την εκτέλεση της βιοδοκιμής (θερμοκρασία 25 ± 2 ^{o}C, φωτοπερίοδο 14 ωρών φως και 10 ωρών σκοτάδι και σχετική υγρασία 80% ± 1).

Εικόνα Β7. Γυάλινα δοχεία

Β.8.4. Μέθοδος βιοδοκιμής

Οι βιοδοκιμές βασίστηκαν στη μέθοδο που προτείνεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για τον έλεγχο της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας των προνυμφών των κουνουπιών (WHO, 2005). Τα βασικά στοιχεία της μεθόδου ήταν τα εξής: 20 προνύμφες κουνουπιών $3^{ης}$-$4^{ης}$ ηλικίας εμβαπτίζονται σε 2% ν/ν υδατικό διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) (98 mL νερό και 2 mL DMSO). Εν συνεχεία, προστίθεται στο κάθε γυάλινο δοχείο συγκεκριμένη συγκέντρωση (δόση) από τα μητρικά διαλύματα. Τα μητρικά διαλύματα (10% stock solution) των ενώσεων παρασκευάστηκαν με DMSO. Με τις βιοδοκιμές μελετήθηκε η μεταβολή της θνησιμότητας σε σχέση με τη μεταβολή της δόσης και εφαρμόστηκε μια σειρά δόσεων, οι οποίες έδωσαν θνησιμότητες πάνω από 0% και κάτω από 100%. Παράλληλα με τις βιοδοκιμές των ενώσεων με πιθανή προνυμφοκτόνο δράση χρησιμοποιήθηκαν και μάρτυρες οι οποίοι περιείχαν μόνο νερό και DMSO. Για κάθε ένωση πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις ανά δόση.

Η καταγραφή της θνησιμότητας έγινε 24 h μετά την έναρξη της βιοδοκιμής και οι δείκτες LC_{50} {συγκέντρωση ένωσης η οποία θανατώνει το 50% του πληθυσμού των προνυμφών} και LC_{90} {συγκέντρωση ένωσης η οποία θανατώνει το 90% του πληθυσμού των προνυμφών} κάθε ένωσης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου (SPSS 11.0).

Τα ακετυλιωμένα ανάλογα (**33**), (**35**), και (**36**) δεν είχαν καλή διαλυτότητα, γι' αυτό το λόγο το ανώτερο όριο συγκέντρωσης για τα προαναφερθέντα ήταν 150 $mgl.^{-1}$

Β.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προνυμφοκτόνος δράση της υπερφορίνης (**1**), της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**), και των ακετυλιωμένων ανάλογών τους (**33-36**) (Εικόνα Β1), για πρώτη φορά αξιολογήθηκε (Mitsopoulou et al., 2014), σε προνύμφες του *Cx . pipiens*, 3ης-4ης ηλικίας.

Για κάθε ένωση πραγματοποιήθηκε σειρά βιοδοκιμών με διαφορετικές δόσεις και τα αποτελέσματα της θνησιμότητας των προνυμφών 24 ώρες μετά την έναρξη των βιοδοκιμών, συνοψίζονται στον Πίνακα Β3. Στον πίνακα αυτό αναφέρονται οι τιμές των δεικτών LC_{50} και LC_{90}, καθώς και τα όρια εμπιστοσύνης (Confidential Limits - CL), για κάθε τιμή LC_{50} και LC_{90} για επίπεδο σημαντικότητας α= 0.05 καθώς επίσης και οι κλίσεις των ευθειών (slopes). Στατιστική διαφορά μεταξύ δύο διαφορετικών ενώσεων υπάρχει όταν τα όρια εμπιστοσύνης των αντίστοιχων τιμών LC_{50} και LC_{90} δεν επικαλύπτονται μεταξύ τους.

Πίνακας Β3. Τιμές των δεικτών LC_{50} και LC_{90} στις ουσίες (**1**), (**23**) και (**33-36**)

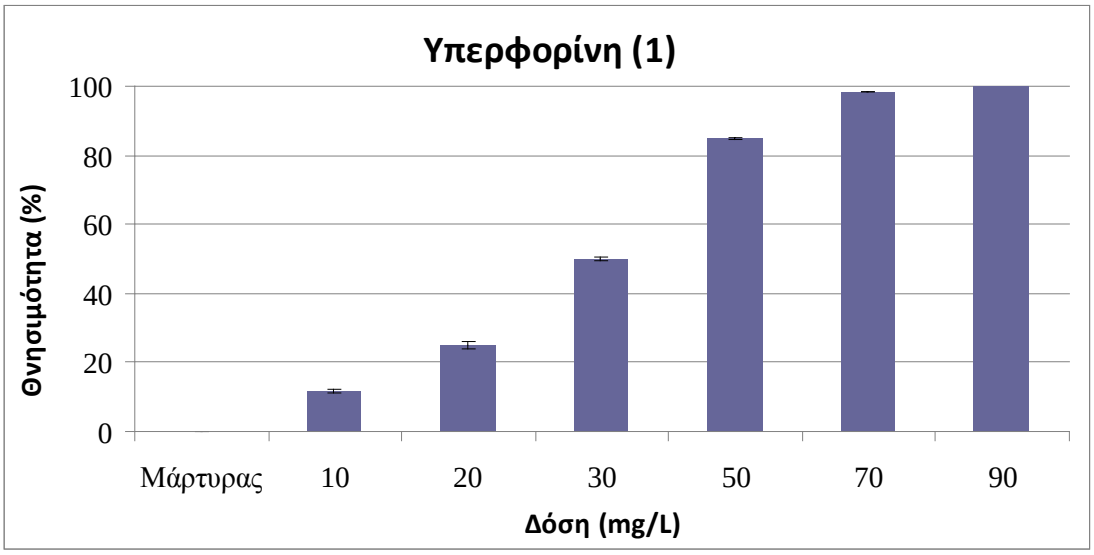
Ένωση	**LC_{50}** (95% όρια εμπιστοσύνης) [α]	**LC_{90}** (95% όρια εμπιστοσύνης)[α]	**Κλίση** (±Τ.Σ.)	**x^2**
(1)	26,72 (23,47-30,36)	53,16 (46,34-61,87)	3,90±0,32	19,42
(23)	51,03 (40,95-60,73)	118,34 (96,7-159,99)	3,5±0,34	23,27[β]
(33)	>150	-	-	-
(34)	135,92 (124,29-149,37)	245,01 (212,11-304,28)	5,0±0,44	30,03
(35)	>150	-	-	-
(36)	>150	-	-	-

[α]Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης για το επίπεδο σημαντικότητας α=0,05 (95%) δεν επικαλύπτονται.

[β]Από την στιγμή που η καλή προσαρμογή των δοκιμών είναι σημαντική (P<0.05), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης

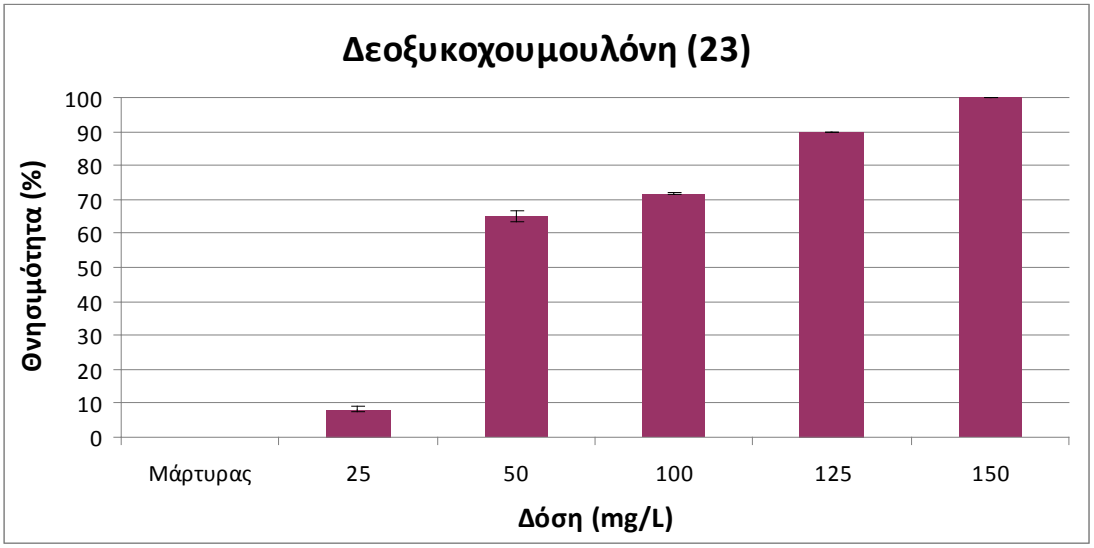
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, όλες οι ενώσεις, οι οποίες δοκιμάστηκαν εμφάνισαν αποτελεσματικότητα εναντίον των προνυμφών κουνουπιών. Επίσης, εμφάνισαν και σημαντικές διαφορές μεταξύ τους οι οποίες αποτυπώνονται και στις τιμές των αντίστοιχων δεικτών LC_{50} και LC_{90}.

Μεταξύ των ενώσεων που δοκιμάστηκαν η υπερφορίνη (**1**) ήταν η πιο αποτελεσματική (LC_{50} 26,72 mgl^{-1}, LC_{90} 53,16) (Διάγραμμα Β5), ενώ η ακετυλιωμένη της μορφή (**34**) δεν ήταν δραστική (LC_{50} > 150 mgl^{-1}).

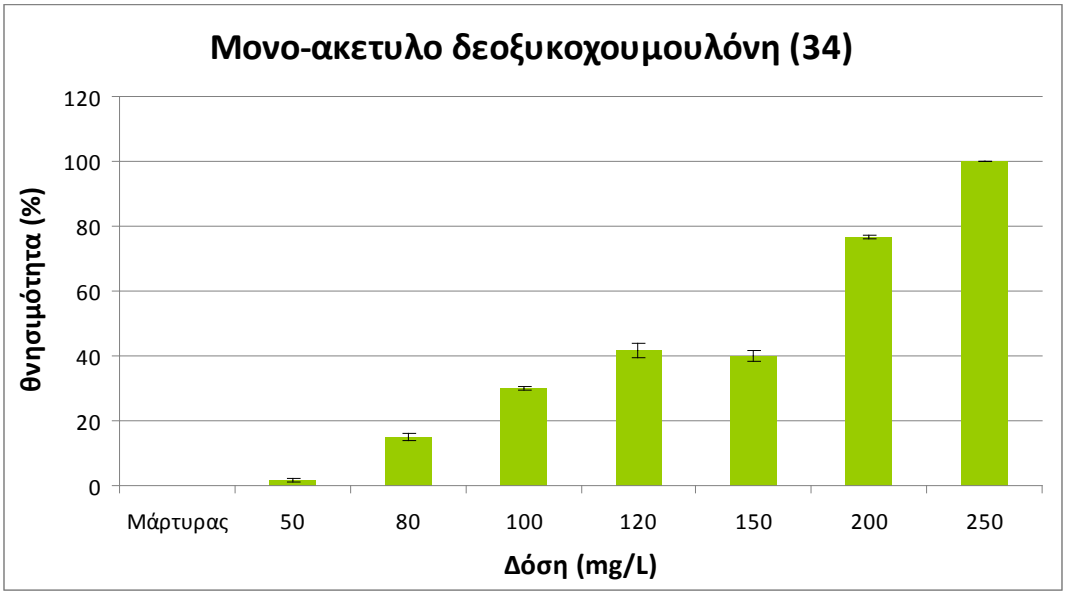


Διάγραμμα Β5. Αποτελέσματα της θνησιμότητας (%), 24 ώρες μετά την έναρξη της βιοδοκιμής, για την υπερφορίνη (**1**)

Υψηλή δραστικότητα έδειξε επίσης η δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) (LC_{50} 51,03 mgl^{-1}, LC_{90} 118,34) (Διάγραμμα Β6) σε σύγκριση με τα ακετυλιωμένα της ανάλογα (**34**), (**35**) και (**36**). Συγκεκριμένα, η μονο-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (**34**) εμφανίζει σημαντικά χαμηλότερη προνυμφοκτόνο δράση, σε σύγκριση με τη δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) αφού είχε τιμή LC_{50} 135,92 mgl^{-1} (Διάγραμμα Β7), ενώ τα άλλα δύο ακετυλιωμένα ανάλογα της δεοξυκοχουμουλόνης (**35**) και (**36**) ήταν ανενεργά ακόμη και σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 150 mgl^{-1}.

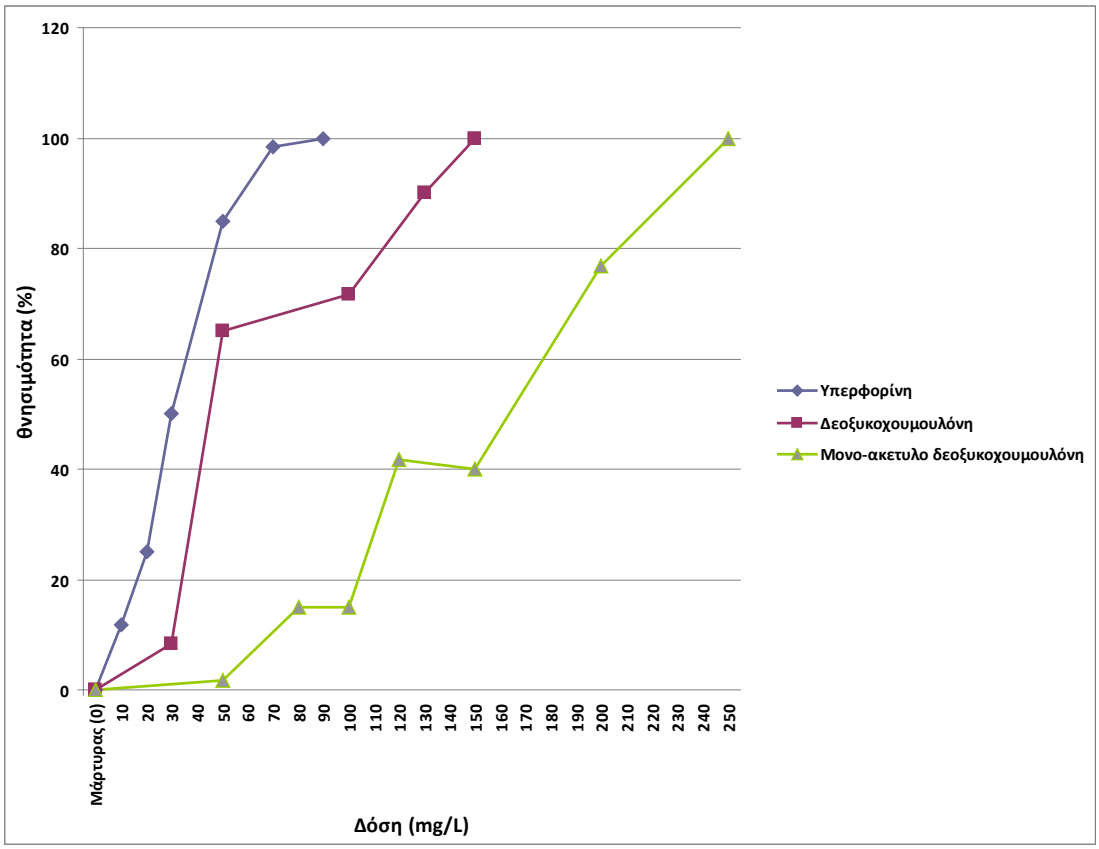


Διάγραμμα Β6. Αποτελέσματα της θνησιμότητας (%), 24 ώρες μετά την έναρξη της βιοδοκιμής, για τη δεοξυκοχουμουλόνη (**23**)



Διάγραμμα Β7. Αποτελέσματα της θνησιμότητας (%), 24 ώρες μετά την έναρξη της βιοδοκιμής, για τη μονο-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (**34**)

Στο Διάγραμμα Β8 συνοψίζεται η αποτελεσματικότητα της υπερφορίνης (**1**), της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) και της μονο-ακέτυλο δεοξυκοχουμουλόνης (**34**). Φαίνεται η τοξικότητα της υπερφορίνης (**1**), αφού η συγκέντρωση η οποία θανατώνει το 50% του πληθυσμού των προνυμφών είναι μικρότερη σε σύγκριση με τις ενώσεις (**23**) και (**34**).



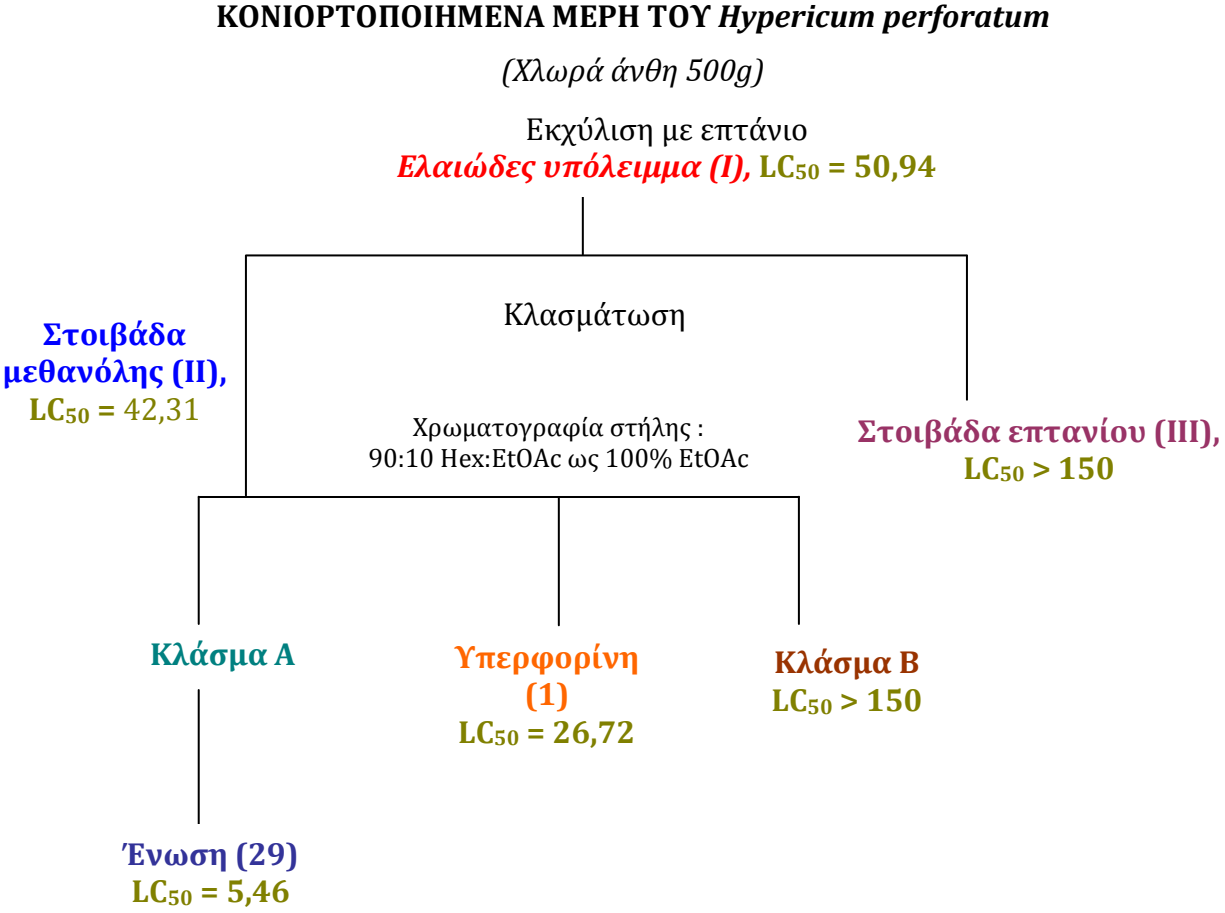
Διάγραμμα Β8. Αποτελέσματα από τις μετρήσεις της θνησιμότητας (%) συναρτήσει της δόσης (mg/L)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ύπαρξη υδροξυλικής ομάδας ενισχύει την προνυμφοκτόνο δράση των παραπάνω μορίων έναντι προνυμφών του *Cx . pipiens*. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να είναι σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες, οι οποίες αφορούν άλλα φυσικά προϊόντα όπως π.χ. αλκανίνη, σικονίνη και κουρκουμίνη, όπου ομοίως η δράση των ακετυλιωμένων αναλόγων επηρεάζεται από την απουσία του υδροξυλίου (Michaelakis et al., 2009; Sagnou et al., 2012).

Η σύγκριση των τιμών των δεικτών LC_{50} και LC_{90}, έδειξε ότι υπερφορίνη (**1**), και η δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) είναι οι πιο τοξικές από όλες τις ενώσεις, υπό δοκιμή, έχοντας τιμές LC_{90} 53,16 και 118,34 mgl^{-1}, αντίστοιχα. Μεταξύ των ακετυλιωμένων παραγώγων μόνο η μονο-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (**34**) εμφάνισε δραστικότητα, με τιμή LC_{90} από 245,01 mgl^{-1}.

Β.10. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ *Hypericum perforatum*

Για πρώτη φορά αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητά των επιμέρους κλασμάτων του εκχυλίσματος του *H. perforatum,* εναντίον προνυμφών κουνουπιών του είδους *Cx. pipiens* biotype *molestus*. Στο Σχήμα Β6 παρατίθενται τα αποτελέσματα της προνυμφοκτόνου δράσης του *H. perforatum*, που συγκομίσθηκε από τον Υμηττό, το 2011.



Σχήμα Β6: Σχηματική απεικόνιση της απομόνωσης των κλασμάτων του *Hypericum perforatum* και της προνυμφοκτόνου δράσης τους. Οι τιμές του δείκτη LC_{50} αντιστοιχούν σε mg/L

Για κάθε στοιβάδα και κλάσμα του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σειρά βιοδοκιμών και τα αποτελέσματα της θνησιμότητας των προνυμφών στις 24 ώρες μετά την έναρξη των βιοδοκιμών, σημειώνονται στο Σχήμα Β5. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο, όπως περιγράφθηκε αναλυτικά στην παράγραφο Β.9.4. (Μέθοδος βιοδοκιμής). Το ανώτερο όριο συγκέντρωσης για τις ενώσεις, οι οποίες δεν είχαν καλή διαλυτότητα, ήταν το 150 $mgl.^{-1}$ Στο Σχήμα Β5 αναφέρονται οι τιμές του δείκτη LC_{50}, όπως υπολογίστηκε από τη στατιστική επεξεργασία (SPSS 11.0). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα Β4.

Πίνακας Β4. Τιμές των δεικτών LC_{50} και LC_{90} των επιμέρους κλασμάτων του εκχυλίσματος του *H. perforatum*

Ένωση	**LC_{50}** (95% όρια εμπιστοσύνης)[α]	**LC_{90}** (95% όρια εμπιστοσύνης)[α]	**Κλίση** (±Τ.Σ.)
Ελαιώδες υπόλειμμα (I)	50,94 (42,93-58,83)	157,63 (132,29-198,49)	2,61±0,25
Στοιβάδα μεθανόλης (II)	42,31 (31,96-52,34)	80,09 (69,74-129,09)	4,02±0,37[β]
Στοιβάδα επτανίου (III)	>150	-	-
Ένωση (29)	5,46 (3,20-8,24)	21,30 (13,02-61,43)	2,17±0,2[β]
Υπερφορίνη (1)	26,72 (23,47-30,36)	53,16 (46,34-61,87)	3,90±0,32
Κλάσμα Β	>150	-	-

[α]Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης για το επίπεδο σημαντικότητας α=0,05 (95%) δεν επικαλύπτονται.

[β]Από την στιγμή που η καλή προσαρμογή των δοκιμών είναι σημαντική (P<0.05), ένας ετερογενής παράγοντας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα το εκχύλισμα του *H. perforatum,* δηλαδή το Ελαιώδες υπόλειμμα (**I**), έδειξε υψηλή δραστικότητα (LC_{50} 50,94 mgl^{-1}, LC_{90} 157,63). Στη βιβλιογραφία έχει αξιολογηθεί το μεθανολικό εκχύλισμα του *H. perforatum,* ενάντια σε προνύμφες *Cx. quinquefasciatus* (Pavela, 2009), το οποίο είχε πολύ χαμηλή τοξικότητα (LD_{50} 496 mgl^{-1}, LD_{90} 980) και το εκχύλισμα από

απόσταξη μεθ' υδρατμών του *H. scabrum,* ενάντια σε προνύμφες *Cx. pipiens* (Cetin et al., 2011), το οποίο είχε ικανοποιητική τοξικότητα (LC_{50} 82,2 mgl^{-1}, LC_{90} 185,9).

Όσον αφορά τα επιμέρους κλάσματα του υπέρικου, η στοιβάδα μεθανόλης (**II**) έδειξε υψηλή δραστικότητα (LC_{50} 42,31 mgl^{-1}, LC_{90} 80,09 mgl^{-1}), ενώ η στοιβάδα επτανίου (**III**) ήταν ανενεργή (LC_{50} >150 mgl^{-1}). Η ένωση (**29**) του κλάσματος Α είχε την υψηλότερη προνυμφοκτόνο δράση από όλα τα επιμέρους κλάσματα του εκχυλίσματος του υπέρικου (LC_{50} 5,46 mgl^{-1}, LC_{90} 21,30 mgl^{-1}), ενάντια σε προνύμφες *Cx. pipiens*. Τέλος, το Κλάσμα Β του εκχυλίσματος του *H. perforatum* ήταν ανενεργό (LC_{50} >150 mgl^{-1}).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παναγόπουλος Γ. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012.

Adam, P.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4786-4793.

Amer, A.; Mehlhorn, H. *Parasitol. Res.* **2006a**, *99*, 473–477.

Amer, A.; Mehlhorn, H. *Parasitol. Res.* **2006b**, *99*, 478–490.

Bentley, M.D.; Day, J.F. *Annu. Rev. Entomol.* **1989**, *34*, 401-421.

Burckhardt, U.; Troxler, R.J.; Werthemann, L. Process for the production of deoxy-alpha-acids; US 4,101,585; 1978.

Cann, M.R.; Davis, A.M.; Shannon, P.V.R. *J. Chem. S. Perkin Transactions* **1984**, *1*, 1413-1421.

Cetin, H.; Yanikoglu, A.; Cilek, J. *Parasitol. Res.* **2011**, *108*, 943-948.

Cheng, S.S.; Liu, J.Y.; Tsai, K.H.; Chen, W.J.; Chang, S.T. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4395-4400.

El Hag, E.A.; El Nadi, A.H.; Zaitton, A.A. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 388-392.

Fai, Y.M.; Tao, C.C. *Nat. Prod. Med.* **2009**, *2*, 77–290.

Hughes, S.G.; Bryant, J.A.; Smirnoff, N. In: Hamlym, G.J.; Flower, T.J.; Jones, M.B. eds; Plants under stress; Cambridge Univ. Press; New York, 1982; pp 131-135.

Michaelakis, A.; Strongilos, A.T.; Bouzas, E.A.; Koliopoulos, G.; Couladouros, E.A.; *Parasitol. Res.* **2009**, *104*, 657-662.

Mitsopoulou, K.P.; Vidali, V.P.; Koliopoulos, G.; Couladouros, E.A.; Michaelakis, A. *Chemosphere* **2014**, *100*, 124-129.

Mongelli, E.; Coussio, J.; Ciccia, G. *Phytother. Res.* **2002**, *16,* S71-S72.

Pavela, R. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 887-892.

Pollier, J.; Goossens, A. *Phytochemistry* **2012**, *77*, 10–15.

Qi, J.; Porco, Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12682-12683.

Ratnayake, R.; Karunaratne, V.; Ratnayake Bandara, B.M.; Kumar, V.; MacLeod, J.K.; Simmonds, P. *J. Nat. Prod*. **2001**, *64*, 376-378.

Sagnou, M.; Mitsopoulou, K.P.; Koliopoulos, G.; Pelecanou, M.; Couladouros, E.A.; Michaelakis, A. *Acta Trop.* **2012**, *123*, 190-195.

Stevens, J.F.; Taylor, A.W.; Nickerson, G.B.; Ivancic, M.; Henning, J.; Haunold, A.; Deinzer, M.L. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 759-775.

Tao, S.H.; Wu, F.E. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2004**, *6*, 307-310.

Trabousli, A.F.; Taoubi, K.; El-Haj, S.; Bessiere, J.M.; Rammal, S. *Pest Manag. Sci.* **2002**, *58*, 491-495.

Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Bianchi, F.; Sterner, O.; Lovati, M.; Bombardelli, E. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 433-438.

WHO Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides World Health Organization (WHO) communicable disease control, prevention and eradication WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES); World Health Organization, Switzerland, Geneva, 2005; p 1-41.

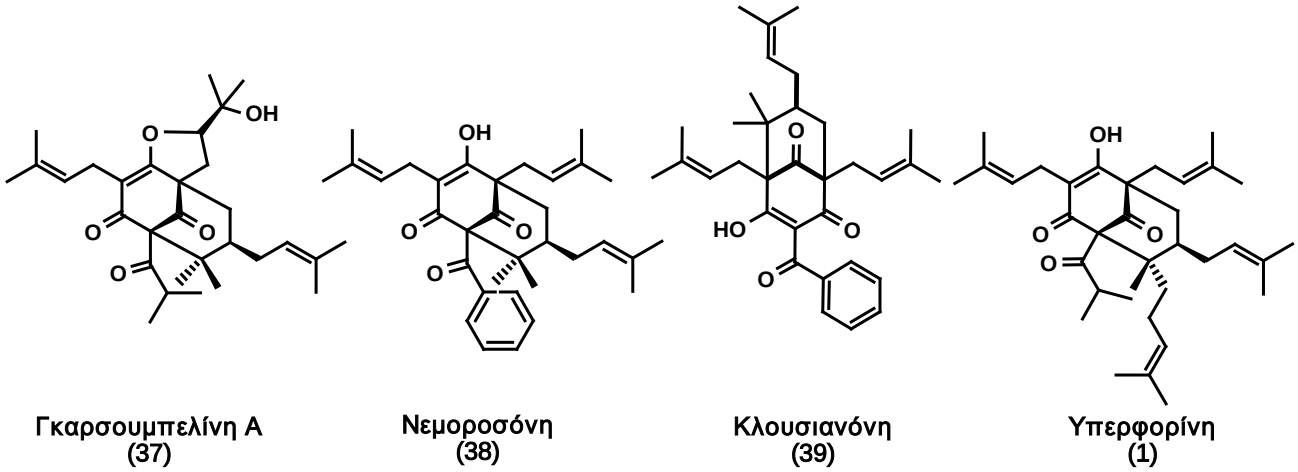
ΠΗΓΕΣ

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Pyrethrin

ΜΕΡΟΣ Γ

Γ.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, στην οικογένεια των ΠΠΑ ανήκουν τουλάχιστον 80 μέλη. Οι πιο γνωστές είναι: η Γκαρσουμπελίνη Α (**37**), η Νεμοροσόνη (**38**), η Κλουσιανόνη (**39**) και φυσικά η υπερφορίνη (**1**) (Εικόνα Γ1). Όπως φαίνεται από το παρακάτω σχήμα η δομή τους είναι τύπου δικυκλο[3.3.1]εννεαν-2,4,9-τρικέτο ανθρακικού σκελετού με πολλά τεταρτοταγή κέντρα.



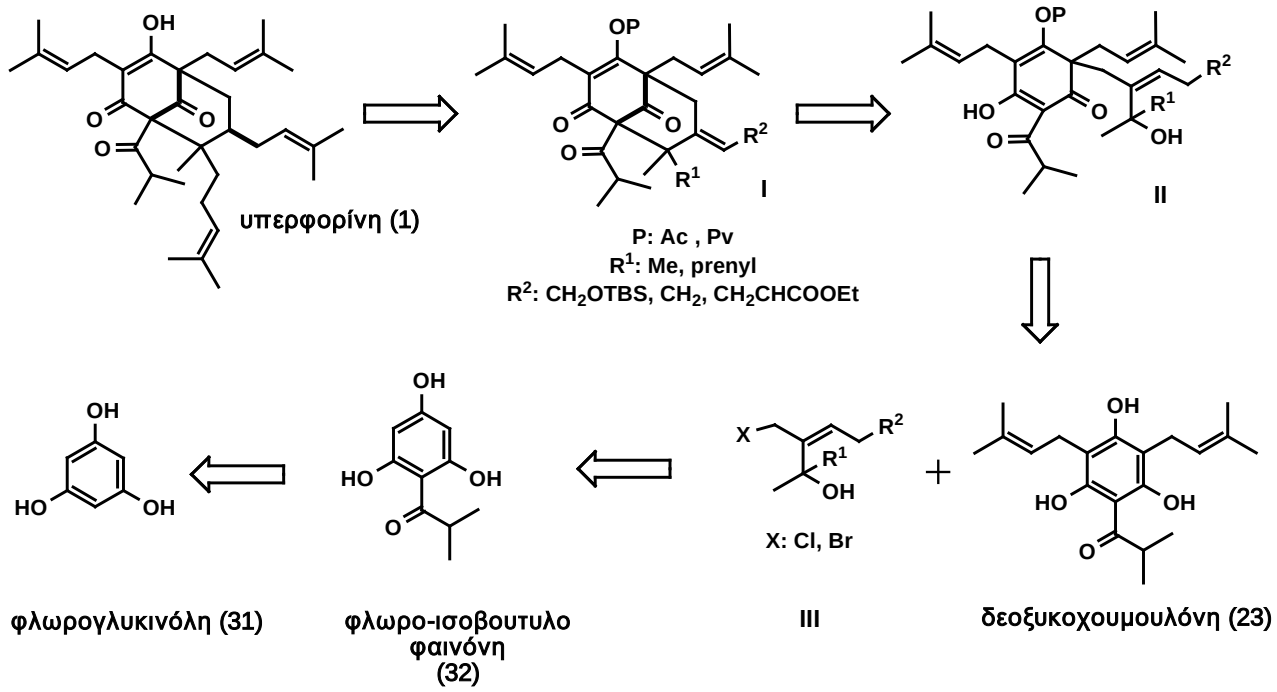
Εικόνα Γ1. Γκαρσουμπελίνη Α (**38**), Νεμοροσόνη (**39**), Κλουσιανόνη (**40**) και υπερφορίνη (**1**)

Μετά από μακροχρόνια μελέτη, η οποία είχε διεξαχθεί στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με στόχο την ολική σύνθεση της υπερφορίνης (**1**) (Διδακτορική διατριβή της Δρ. Μ. Δακανάλη, 2008) αναπτύχθηκε μία συνθετική πορεία, η οποία οδήγησε στη σύνθεση της δεϋδρο-υπερφορίνης (**40**). Πρόκειται για μία σύντομη βιομιμητική πορεία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νέες ΠΠΑ διαφορετικές από αυτές που απαντώνται στη φύση.

*Στόχος του παρόντος τμήματος της διατριβής είναι να συντεθούν δεϋδρο-ανάλογα της υπερφορίνης (**1**), να μελετηθεί η βιολογική τους δράση και να συσχετιστεί με αυτήν της υπερφορίνης (**1**).*

Προς τούτο, σχεδιάστηκε το παρακάτω ρετροσυνθετικό σχήμα (Σχήμα Γ1), το οποίο μιμείται το βιοσυνθετικό μονοπάτι που έχει προταθεί για τις ΠΠΑ (Εισαγωγή, Σχήμα Ε1). Τα σχεδιασμένα παράγωγα περιγράφονται από το γενικό τύπο **I**, ο οποίος μπορεί να προκύψει από την δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) και μία

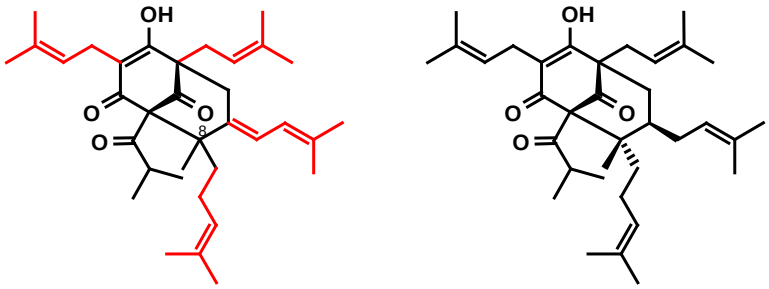
αλλυλική αλκοόλη **III** με διπλή αλκυλίωση. Η δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) μπορεί να συντεθεί από την φλωρο-ισοβουτυλο φαινόνη (**32)** (έχει ανιχνευτεί στη βιοσύνθεση των ΠΠΑ) με διαλλυλίωση. Τέλος, η (**32)** μπορεί να προέλθει από την φλωρογλυκινόλη (**31**). Το ρετροσυνθετικό σχήμα το οποίο σχεδιάστηκε είναι το ακόλουθο:



Σχήμα Γ1. Ρετροσυνθετικό σχήμα για την σύνθεση των αναλόγων της υπερφορίνης (**1**)

Γ.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ

Στόχος ήταν η σύνθεση του δεϋδρο-αναλόγου της υπερφορίνης (**40**), το οποίο θα είχε επάνω όλες τις πρενυλο-αλυσίδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ2.

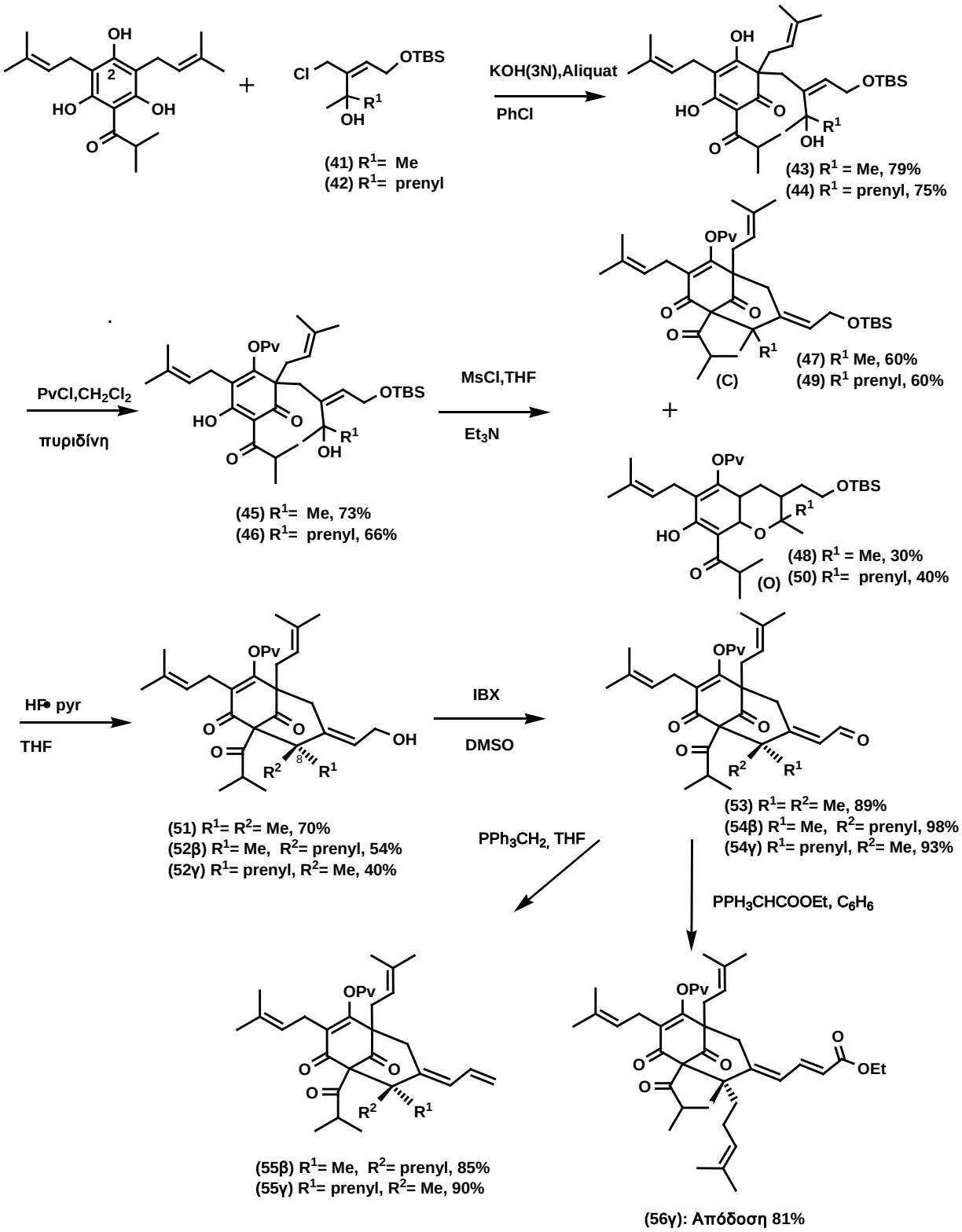


δεϋδρο-υπεφορίνη (40) **υπερφορίνη (1)**

Εικόνα Γ2. Ανάλογο της υπερφορίνης (**40**) και η υπερφορίνη (**1**)

Έχοντας συνθέσει τη δεοξυκοχουμουλόνη (**23**) (Μέρος Β) και τα κατάλληλα χλωρίδια (**41**) και (**42**) σειρά είχε η αλκυλίωση τους με στόχο τη σύνθεση της ένωσης Τύπου ΙΙ, όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω ρετροσυνθετικό Σχήμα Γ1. Ο σωστός συνδυασμός βάσης–διαλύτη για την πραγματοποίηση της αλκυλίωσης οδήγησαν στο επιθυμητό προϊόν ενώ σημαντικό ρόλο είχε η προηγούμενη εργαστηριακή εμπειρία σε αυτές τις αντιδράσεις (Διδακτορική διατριβή της Δρ. Μ. Δακανάλη, 2008). Στο Σχήμα Γ2 περιγράφεται η αλκυλίωση της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) με τα αλλυλικά χλωρίδια (**41**) και (**42**), και η παρασκευή των ενώσεων (**43**) και (**44**) σε διφασικό σύστημα διαλυτών νερού–χλωροβενζολίου, σε pH=14. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η προστασία του υδροξυλίου C-2 με τη μορφή εστέρα του πιβαλοϋλο οξέος (Pv) και η σύνθεση των ενώσεων (**45**) και (**46**). Η επίδραση της τριτοταγούς αλλυλικής αλκοόλης (**45**) και (**46**) (Σχήμα Γ6) με το χλωρίδιο του μέθυλο-σουλφονικού οξέος παρουσία βάσης τριαιθυλαμίνης, σε διαλύτη THF και στους -40 °C, έδωσε δύο κυκλοποιημένα προϊόντα C- (**47, 49**) και O- (**48, 50**). Τα C- κυκλοποιημένα προϊόντα (**47, 49**) σε όξινες συνθήκες αποπροστασίας με HF·pyr σε THF έδωσαν τις αλλυλικές αλκοόλες (**51**), (**52β**) και (**52γ**). Οι ενώσεις (**52β**) και (**52γ**) είναι δύο διαστερεϊσομερή, στα οποία δεν έχει διευκρινιστεί η στερεοχημεία και η διαφορά ανάμεσα στα δύο διαστερεϊσομερή έγκειται στο ενεργό κέντρο που βρίσκεται στον άνθρακα C_8. Η οξείδωση της (**51**) και των (**52β**) και (**52γ**) προς τις αντίστοιχες αλδεΰδες (**53**), (**54β**) και (**54γ**) πραγματοποιήθηκε με IBX. Τέλος, με αντίδραση Wittig (Chen et al., 1994) του

(**54β**) και του (**54γ**) τόσο με το σταθεροποιημένο υλίδιο όσο και με το μη σταθεροποιημένο άλας $CH_3Ph_3P^+Br^-$ οδήγησε στη σύνθεση των αντίστοιχων αναλόγων (**55β**), (**55γ**) και (**56γ**).



Σχήμα Γ2. Σύνθεση αναλόγων της υπερφορίνης

Για τα πιβαλοϋλο-ανάλογα (**52β**), (**52γ**), (**55β**), (**55γ**) και (**56γ**) δεν επετεύχθη η αποπροστασία τους. Στον Πίνακα Γ1 καταγράφονται οι δοκιμές αποπροστασίας.

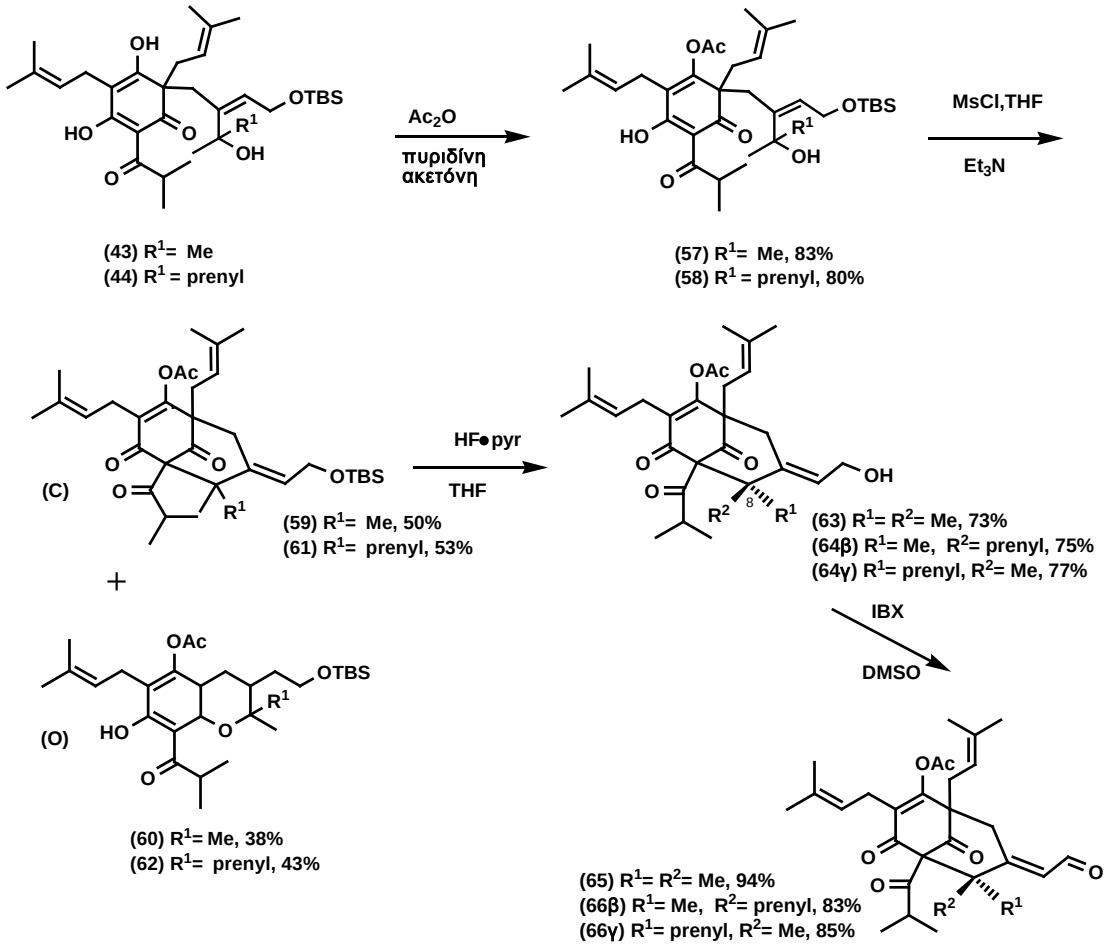
Πίνακας Γ1. Δοκιμές αποπροστασίας των αναλόγων (**52**), (**55**) και (**56**)

Συνθήκες	**Υπόστρωμα**	**Θερμοκρασία**	**Προϊόν**
CH_3COOH:H_2O (8:2)	55β, 55γ, 56γ	25 - 100 °C	Καταστροφή πρώτης ύλης
Αμμωνία:Μεθανόλη (1:9)	52β, 52γ, 55β, 55γ, 56γ	25 - 100 °C	Καταστροφή πρώτης ύλης
HCl:Μεθανόλη (2:8)	55β, 55γ	25 - 85 °C	Καταστροφή πρώτης ύλης
Υδρίδιο του Na	52β, 52γ, 55β, 55γ, 56γ	25 - 50 °C	Όχι αντίδραση
MeONa Μεθανόλη	55β, 55γ, 56γ	40 °C	Όχι αντίδραση
CH_3CH_2ONa Αιθανόλη	55β, 55γ	25 -50 °C	Καταστροφή πρώτης ύλης
HCl:Μεθανόλη:H_2O (1:8:1)	56γ	25 - 40 °C	Καταστροφή πρώτης ύλης
KCN Et_3N	56γ	25 °C	Καταστροφή πρώτης ύλης
KCN	56γ	25 °C	Όχι αντίδραση

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω Πίνακα Γ1 αρχικά επιχειρήθηκε η αποπροστασία της (**55β**) και (**55γ**) με όξινες συνθήκες (οξικό οξύ και υδροχλώριο) αλλά και με βασικές (αμμωνία, Υδρίδιο του Na, MeONa και CH_3CH_2ONa), χωρίς θετικό αποτέλεσμα. Το ίδιο επαναλήφθηκε και στα υποστρώματα (**52β**), (**52γ**) και (**56γ**), χωρίς τελικά τη σύνθεση του τελικού προϊόντος. Η επιτυχημένη απομάκρυνση του πιβαλοϋλο-εστέρα είναι ανέφικτη στα συγκεκριμένα μόρια. Για τους παραπάνω λόγους επαναλήφθηκε η παραπάνω συνθετική πορεία με ακετυλο-εστέρες, των οποίων η αποπροστασία τους είναι ευκολότερη σε πιο ήπιες συνθήκες (Βλέπε ενότητα Γ.3.).

Γ.3. ΜΙΑ ΚΑΙΝΟΥΡΙΑ ΤΥΠΟΥ 5-5 ΔΙΚΥΚΛΙΚΗ ΕΝΩΣΗ

Για τη σύνθεση των αλδεϋδών (**65**), (**66β**) και (**66γ**) (Σχήμα Γ3) ακολουθήθηκε η συνθετική πορεία, του προηγούμενου κεφαλαίου με προστατευτική ομάδα τον ακετυλο-εστέρα.



Σχήμα Γ3. Σύνθεση των αλδεϋδών (**65**) (**66β**) και (**66γ**)

Σύμφωνα με το Σχήμα Γ3 (Couladouros et al., 2009), προστασία των (**43, 44**) με τον ακετυλο-εστέρα και κυκλοποίηση των (**57**) και (**58**) με το χλωρίδιο του μεθυλο-σουλφονικού οξέος έδωσε δύο κυκλοποιημένα προϊόντα C- (**59, 61**) και δύο O- (**60, 62**). Τα C- κυκλοποιημένα προϊόντα (**59, 61**) σε όξινες συνθήκες αποπροστασίας με HF·pyr σε THF έδωσαν τις αλλυλικές αλκοόλες (**63**), (**64β**) και (**64γ**). Οι ενώσεις (**64β**) και (**64γ**) είναι δύο διαστερεϊσομερή, στα οποία δεν έχει διευκρινιστεί η στερεοχημεία και η διαφορά ανάμεσα στα δύο διαστερεϊσομερή έγκειται στο ενεργό κέντρο που βρίσκεται στον άνθρακα C_8. Η

οξείδωση της (**63**), της (**64β**) και της (**64γ**) προς τις αντίστοιχες αλδεΰδες (**65**), (**66β**) και (**66γ**) πραγματοποιήθηκε με IBX.

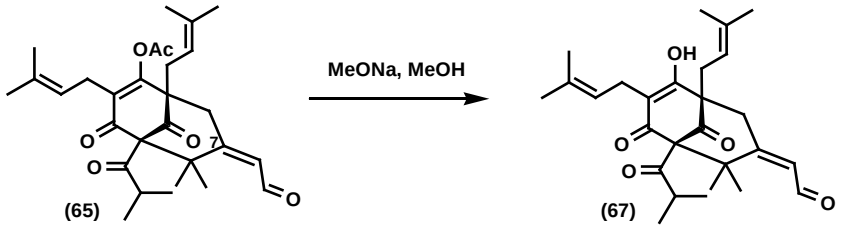
Στο παρελθόν είχαν γίνει προσπάθειες κορεσμού του διπλού δεσμού στις ενώσεις (**59**), (**63**), (**64β**) και (**64γ**), οι οποίες ήταν ανεπιτυχείς, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης στη θέση C_7 (Couladouros et al., 2009). Για τον λόγο αυτό συντέθηκε η α,β-ακόρεστη αλδεΰδη (**65**) με σκοπό να γίνουν αντιδράσεις τύπου Michael. Οι πρώτες δοκιμές δεν έδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα (Πίνακας Γ2).

Πίνακας Γ2. Δοκιμές προσθήκης Michael θειοφαινόλης στην α,β-ακόρεστη αλδεΰδη (**65**)

Α.Α	**Βάση / Nu/ Διαλύτης**	**Θερμοκρασία**	**Προϊόν**
1	-/PhSH/THF	25 - 60 °C	Όχι αντίδραση
2	-/PhSH/CH_2Cl_2	25 - 40 °C	Όχι αντίδραση
3	-/PhSH/-	25 - 60 °C	Όχι αντίδραση
4	pyridine/PhSH/THF	25 - 60 °C	Όχι αντίδραση
5	PPTS/PhSH/THF	0 - 60 °C	Όχι αντίδραση
6	DMAP/PhSH/THF	25 °C	Πλήθος παραπροϊόντων*
7	Et_3N/PhSH/THF	0 - 25 °C	Πλήθος παραπροϊόντων*
8	Et_3N/PhSH/CH_2Cl_2	0 - 25 °C	Πλήθος παραπροϊόντων*
9	α. MeONa/MeOH β. DBU/PhSH/THF	25 °C	Όχι αντίδραση*

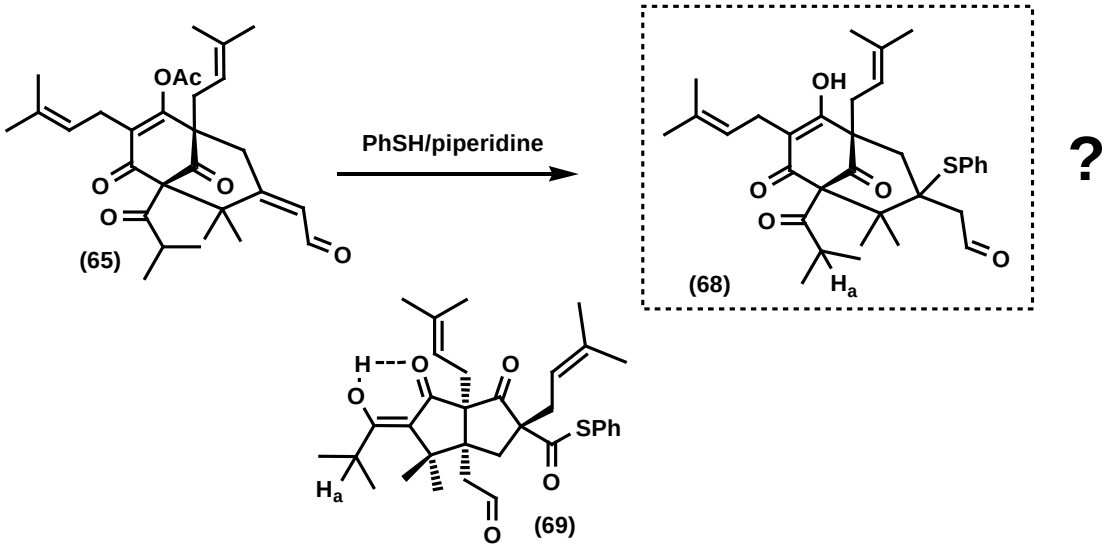
* Αρχικά συντίθεται η ένωση (**67**)

Σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε κανένας μετασχηματισμός του αρχικού προϊόντος (**65**), εκτός εάν συνέβαινε αποπροστασία και σχηματισμός του (**67**), οπότε ή ακολουθούσε πλήθος δευτερευόντων προϊόντων (Πίνακας Γ2, δοκιμές 6-8) ή δεν συνεχιζόταν η αντίδραση (Πίνακας Γ2, δοκιμή 9). Το αποπροστατευμένο προϊόν (**67**), απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε σύμφωνα με την αντίδραση σαπωνοποίησης του Σχήματος Γ4.

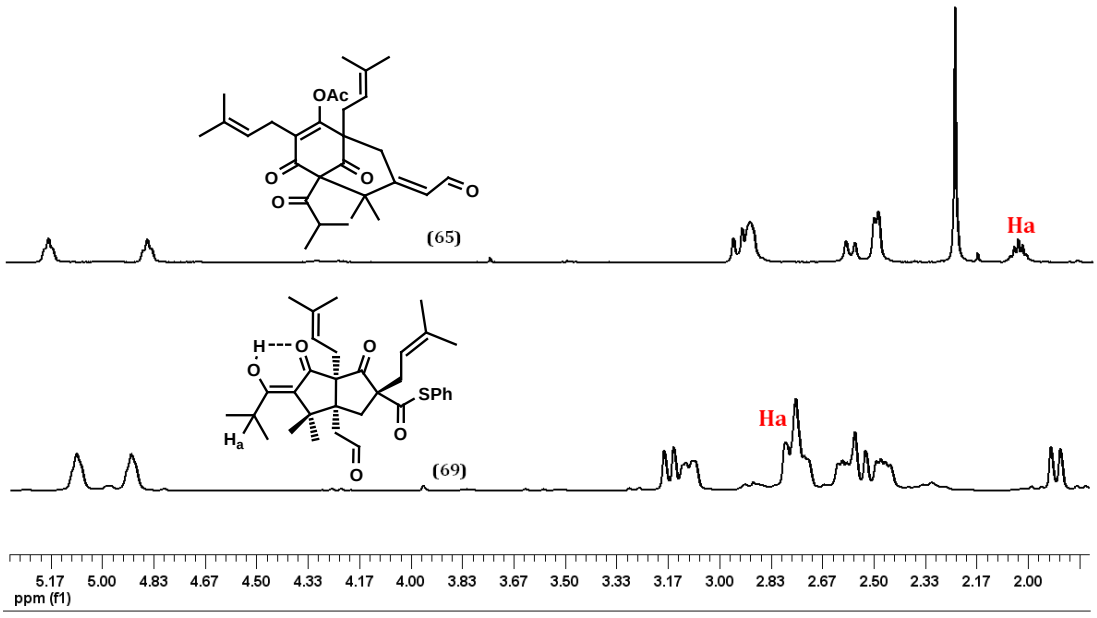


Σχήμα Γ4. Αποπροστασία της α,β-ακόρεστη αλδεΰδης (**65**) με MeONa

Η μόνη δοκιμή, η οποία έδωσε ένα νέο και μοναδικό προϊόν ήταν αυτή η οποία περιγράφεται στο Σχήμα Γ5 με πιπεριδίνη και θειοφαινόλη. Το ^{1}H NMR της οποίας, όπως φαίνεται και από την Σχήμα Γ5 υποστήριζε την αναμενόμενη ένωση (**68**), εκτός από μία σημαντική μετατόπιση του Ha, από τα 2,04 ppm στα 2,78 ppm (Εικόνα Γ3), η οποία δεν δικαιολογείτο από τη δομή (**68**).

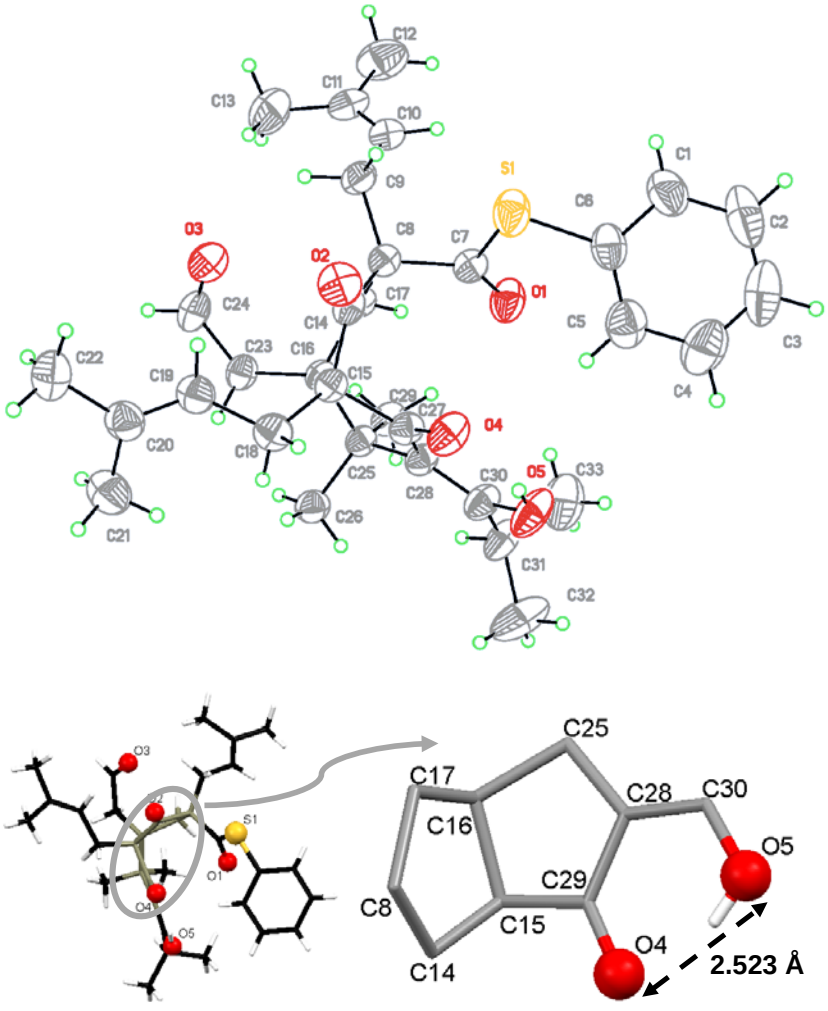


Σχήμα Γ5. Μετατροπή της α,β–ακόρεστης αλδεϋδης (**65**) στην ένωση (**69**)



Εικόνα Γ3. Φάσματα ^{1}H NMR των ενώσεων (**65**) και (**69**)

Για να εξακριβωθεί η δομή της ένωσης αποφασίστηκε να μελετηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Συντέθηκε μεγάλη ποσότητα της ένωσης και με ανακρυστάλλωση από βενζόλιο σχηματίστηκαν μονοκρύσταλλοι. Η ανάλυση των ακτίνων Χ έδειξε ότι τελικά η σωστή δομή της ένωσης είναι η (**69**) (Σχήμα Γ5), η οποία παγιώνεται με έναν δεσμό υδρογόνου (O···O 2.523 Å, Εικόνα Γ4), ενώ εξηγεί και την αποπροάσπιση του Ha από τα 2,04 ppm στα 2,78 ppm (Εικόνα Γ3), εφ' όσον πλέον είναι σε αλλυλική θέση ως προς τον ενολικό διπλό δεσμό (Vidali et al., 2013).



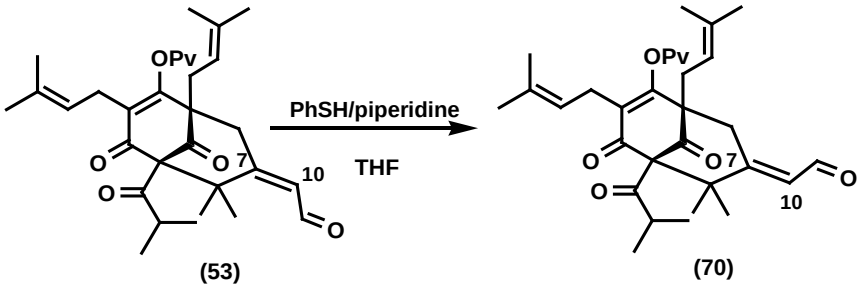
Εικόνα Γ4. Κρυσταλλική δομή της ένωσης (**69**)

Περισσότερες αντιδράσεις τύπου Michael πραγματοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του μηχανισμού της σύνθεσης της νέας ένωσης (**69**) (Πίνακας Γ3). Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικού τύπου βάσεις, με τις οποίες έγινε αντιληπτό ότι το pH δεν παίζει ρόλο στη σύνθεση του νέου μορίου (**69**), αλλά η παρουσία πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινών (Πίνακας Γ3, Δοκιμές 1-4, βλέπε και παραδείγματα Πίνακα Γ2).

Πίνακας Γ3. Δοκιμές προσθήκης Michael θειοφαινόλης στην (**66**)

Α.Α	**Βάση / Nu/ Διαλύτης**	**Θερμοκρασία**	**Προϊόν (Απόδοση %)**
1	Piperidine/PhSH/THF	25 °C	(**69**)(73%)
2	α. MeONa/MeOH β. Piperidine/PhSH/THF	25 °C	(**69**) (81%)
3	α. MeONa/MeOH β. Bu_2NH/PhSH/THF	25 °C	(**69**) (70%)
4	α. MeONa/MeOH β. $BuNH_2$/PhSH/THF	25 °C	(**69**) (79%)

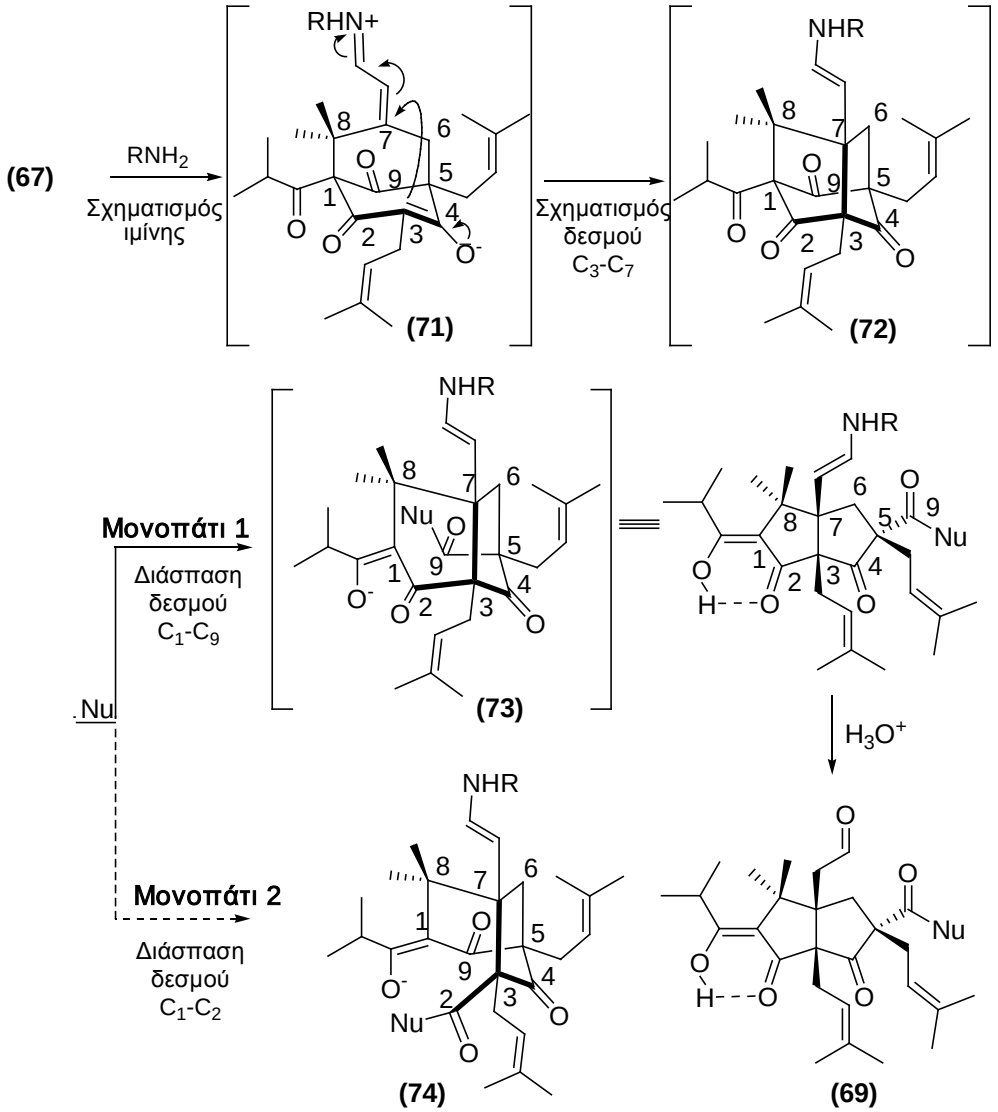
Επίσης, δοκιμάστηκε και στην αλδεΰδη (**53**) η αντίδραση προσθήκης Michael θειοφαινόλης. Σχηματίστηκε και απομονώθηκε ένα προϊόν (**70**) (Σχήμα Γ6), στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί η ισομερίωση του διπλού δεσμού του α, β-ακόρεστου συστήματος. Το παραπάνω δείχνει ότι είναι απαραίτητη η αποπροστασία του μορίου για να σχηματιστεί ο ανθρακικός σκελετός (δικυκλο[3.3.0]οκτανιο) τύπου 5,5.



Σχήμα Γ6. Ισομερίωση του διπλού δεσμού στην ένωση (**53**)

Από όλες τις παραπάνω δοκιμές προτείνεται ο μηχανισμός, ο οποίος περιγράφεται στο Σχήμα Γ7. Πιο αναλυτικά, το καρβονύλιο της αποπροστατευμένης αλλυλικής αλδεΰδης (**67**) αντιδρά με τις αμίνες και

σχηματίζεται ως ενδιάμεσο η ιμίνη (**71**), η οποία αυξάνει τον ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα του C_7, επιτρέποντας την προσβολή του από το ενολικό ανιόν C_3, το οποίο προέρχεται από την απροστατευμένη υδροξυλομάδα C_4 (**71** → **72**). Το υψηλής τάσης τρικυκλικό σύστημα (**72**) μπορεί να απελευθερώσει ενέργεια μέσω οκτώ πιθανών ρετρο-αλδολικών αντιδράσεων (δύο από το C_4-καρβονύλιο, τρεις από το C_2-καρβονύλιο και τρεις από το C_9-καρβονύλιο). Η διάσπαση των C_1-C_9 ή C_1-C_2 δεσμών (Μονοπάτι 1 ή 2) είναι πιθανότερες διότι οδηγούν σε ένα απεντοπισμένο ενολικό σύστημα. Σε αντίθεση με το Μονοπάτι 2 από το οποίο θα σχηματιζόταν το δικυκλικό σύστημα τύπου 6,5 (**74**) απομονώθηκε μόνο το προϊόν από το Μονοπάτι 1 (**73**) το οποίο είναι ένας ανθρακικός σκελετός (δικυκλο[3.3.0]οκτανιο) τύπου 5,5.

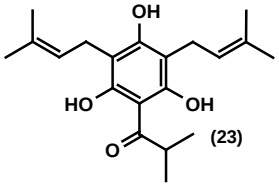


Σχήμα Γ7. Προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης προσθήκης Michael θειοφαινόλης

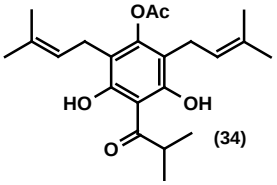
Ο φαρμακοφόρος (drug-like) ανθρακικός σκελετός δικυκλο[3.3.0]οκτανιο εμφανίζεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία και παρουσιάζει αξιόλογη βιολογική δράση (Βλ. ενότητα Γ5).

Γ.4. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ

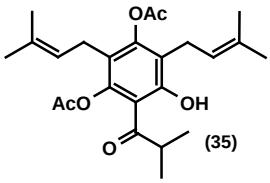
Συνοπτικά παρακάτω παρατίθενται τα ανάλογα μόρια της υπερφορίνης, τα οποία συντέθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.



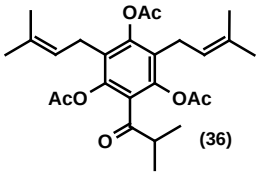
(23)



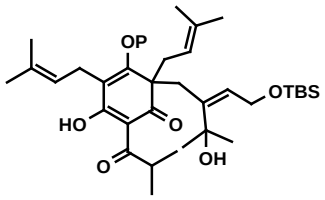
(34)



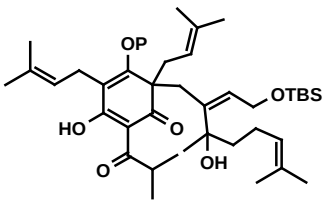
(35)



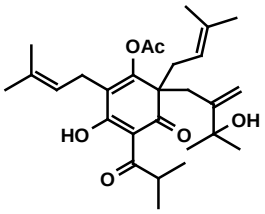
(36)



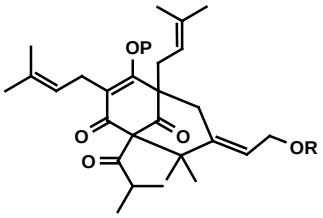
(43): P= H
(57): P= Ac
(45): P= Pv



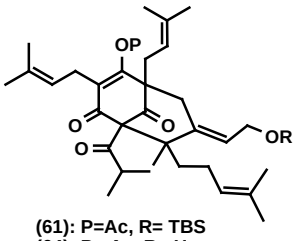
(44): P= H
(58): P= Ac
(46): P= Pv



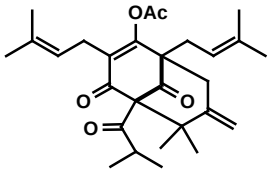
(75)



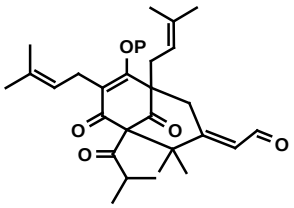
(59): P=Ac, R= TBS
(63): P= Ac, R= H
(47): P= Pv, R= TBS
(51): P= Pv, R= H



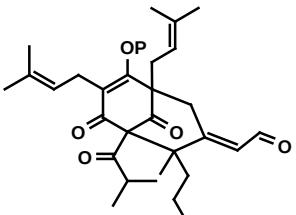
(61): P=Ac, R= TBS
(64): P= Ac, R= H
(49): P= Pv, R= TBS
(52): P= Pv, R= H



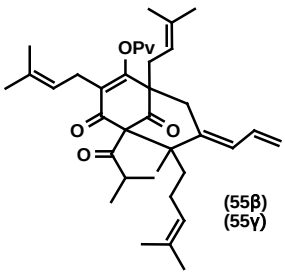
(76)



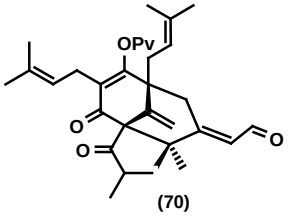
(65): P= Ac
(53): P= Pv



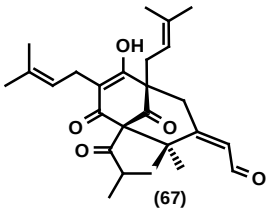
(66): P= Ac
(54): P= Pv



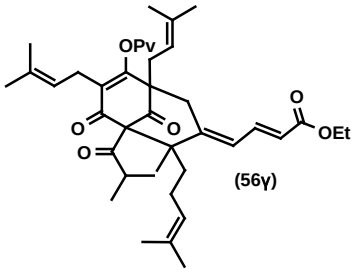
(55β)
(55γ)



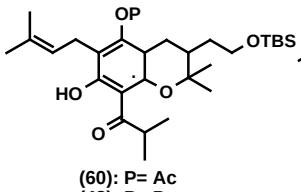
(70)



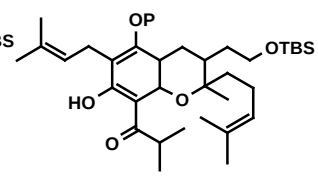
(67)



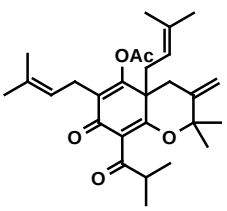
(56γ)



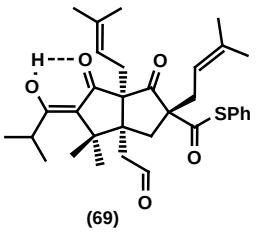
(60): P= Ac
(48): P= Pv



(62): P= Ac
(50): P= Pv



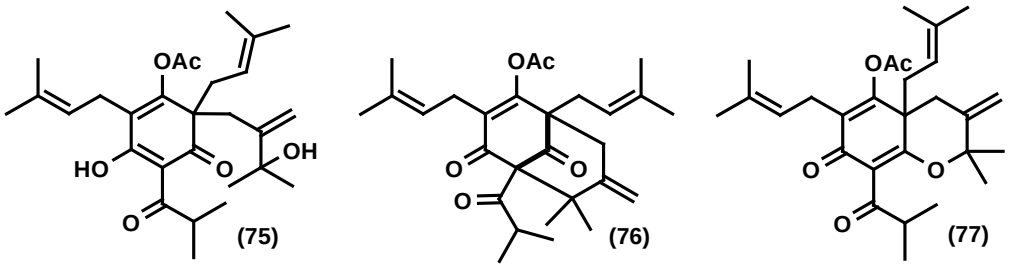
(77)



(69)

Γ.5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Τα αναλόγα της υπερφορίνης, τα οποία συντέθηκαν στάλθηκαν στο NIH (Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας Αμερικής) για την αξιολόγησή τους, από τα οποία επιλέχθηκαν για αξιολόγηση τα ανάλογα (**75**), (**76**) και (**77**). Το NIH χρησιμοποιεί 60 καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες περιλαμβάνουν τη λευχαιμία, το μελάνωμα και τους καρκίνους του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του εγκεφάλου, των ωοθηκών, του μαστού, του προστάτη και του νεφρού. Στόχος του NIH είναι να αξιολογηθούν συνθετικές ενώσεις και φυσικά προϊόντα για την αναστολή της ανάπτυξης ή την επιλεκτική θανάτωση καρκινικών κυττάρων. Η αξιολόγηση αποτελείται από δύο στάδια. Στο Στάδιο Ι αξιολογείται κάθε ένωση έναντι των 60 καρκινικών κυτταρικών σειρών σε μία μόνο δόση των 10 μM. Αν η ένωση εμφανίσει σημαντική αναστολή, τότε εξετάζεται στο Στάδιο ΙΙ σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Πηγή 1).



Εικόνα Γ5. Δομές των ενώσεων (**75**), (**76**) και (**77**)

Από τα ανάλογα (**75**), (**76**) και (**77**), τα οποία εξετάσθηκαν, το ανάλογο (**76**) είχε σημαντική αναστολή ανάπτυξης σε 60 καρκινικές κυτταρικές σειρές σε συγκεντρώσεις της τάξεως των μM (Πίνακας Γ4). Πιο συγκεκριμένα, το ανάλογο (**76**) σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 2 μM παρουσίασε σημαντική αναστολή ανάπτυξης κατά του μελανώματος, του ρινικού καρκίνου, του καρκίνου του πνεύμονα και του καρκίνου του κεντρικού νευρικού συστήματος (Γράφημα Γ1). Συμπληρωματικά, το ανάλογο (**76**) έδειξε χαμηλή κυτταροτοξικότητα (όπως φαίνεται από τις τιμές LC_{50}, οι οποίες είναι μεγαλύτερες του 0.1 mM). Γι' αυτό το λόγο προσδιορίστηκε ο θεραπευτικός δείκτης (Therapeutic Index, TI), δηλαδή ο λόγος LC_{50}/GI_{50}, ο οποίος ήταν

άριστος σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, οι αποκλίσεις των τιμών του LC_{50}, στις περιπτώσεις της λευχαιμίας, του καρκίνου του εντέρου και του μελανώματος έδειξαν ισχυρή εκλεκτικότητα (Πίνακας Γ5). Αντίθετα, τα ανάλογα (**75**) και (**77**) ήταν μη δραστικά σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές (Παράρτημα ΙΙ). Στην ικανότητα αναστολής ανάπτυξης των κυτταρικών καρκινικών σειρών, πρωτεύοντα ρόλο έπαιξε το δικυκλικό σύστημα του C αλκυλιωμένου αναλόγου (**76**).

Δείκτης LC_{50} {η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, η οποία θανατώνει το 50% του πληθυσμού των κυττάρων}

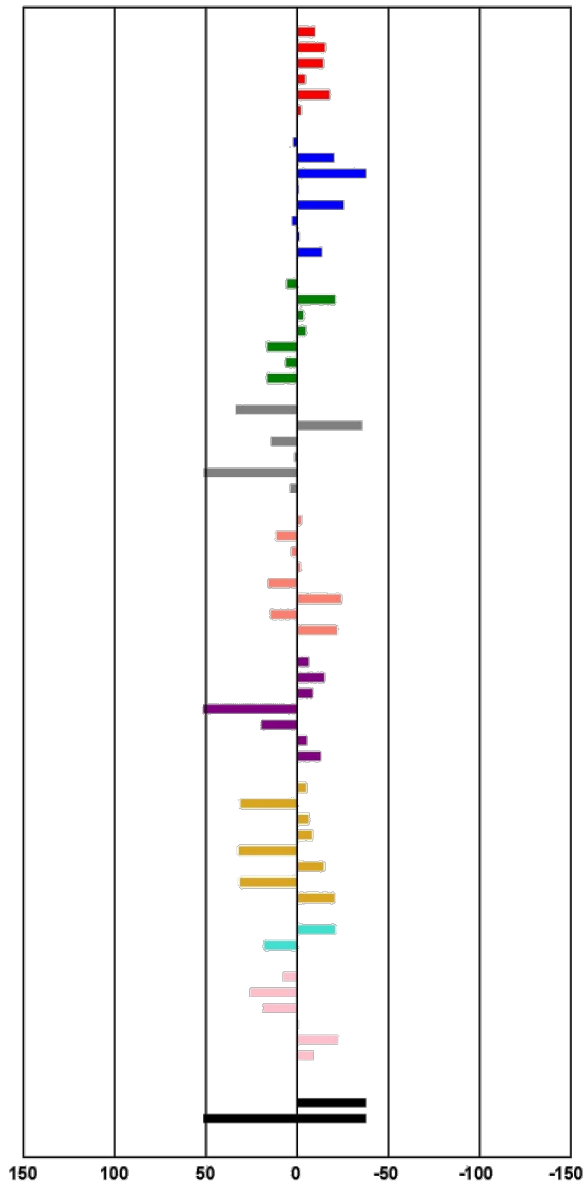
Δείκτης GI_{50} {η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας, η οποία προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο 50% των κυττάρων}

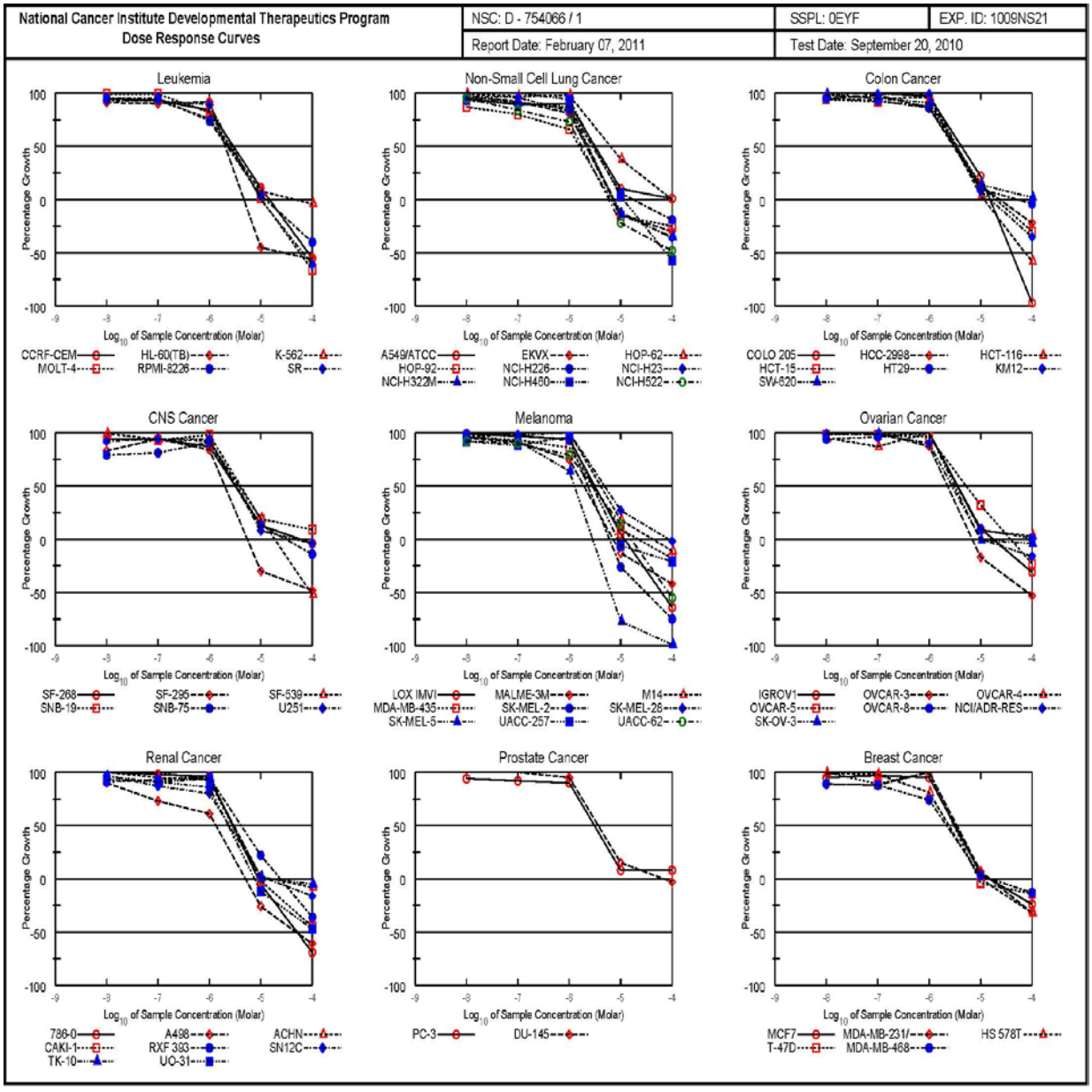
Πίνακας Γ4. Αποτελέσματα του Ι Σταδίου της ένωσης (**76**)

Developmental Therapeutics Program
One Dose Mean Graph

NSC: D-754066 / 1	Conc: 1.00E-5 Molar	Test Date: Aug 16, 2010
Experiment ID: 1008OS10		Report Date: Sep 20, 2010

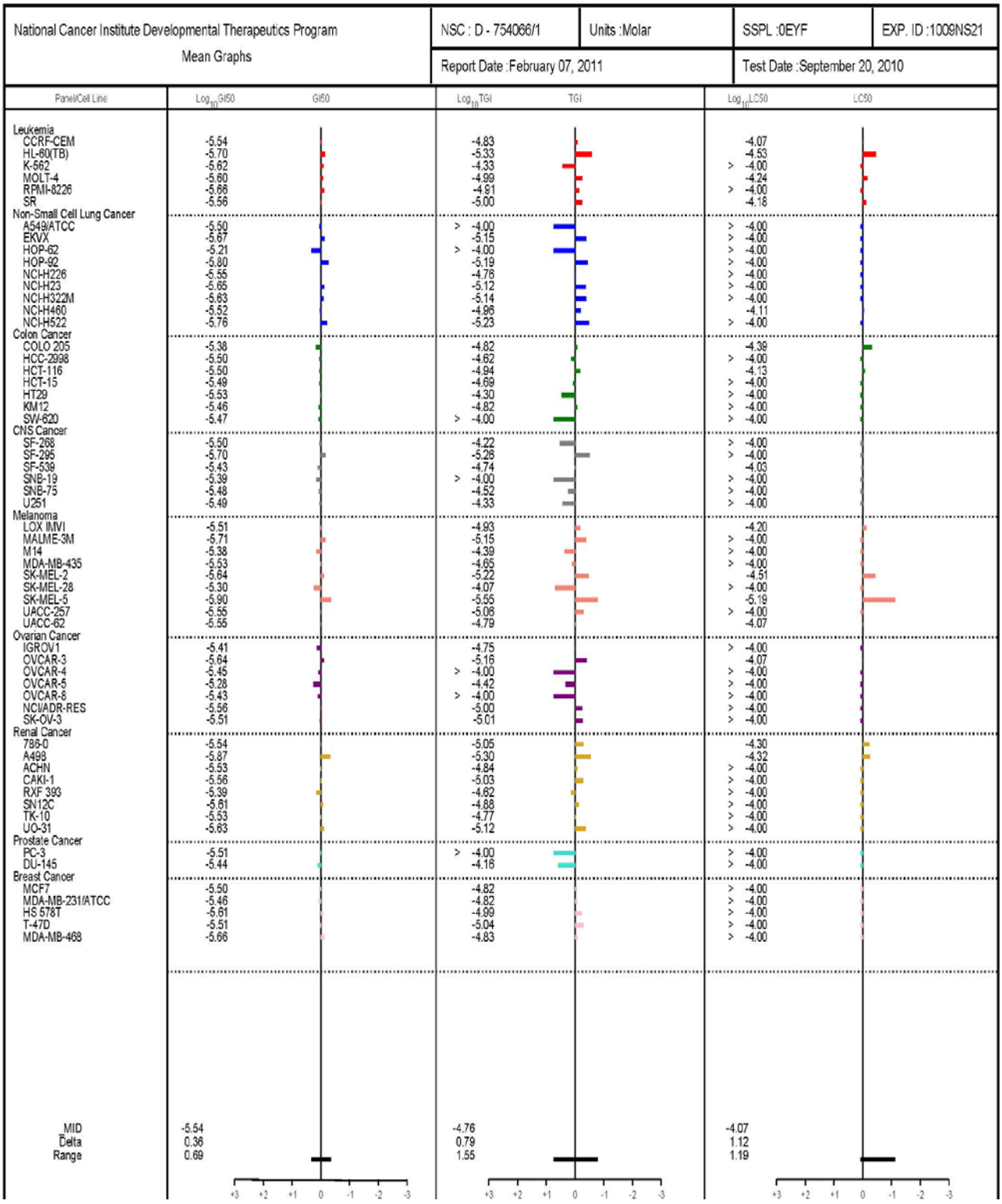
Panel/Cell Line	Growth Percent
Leukemia	
CCRF-CEM	31.09
HL-60(TB)	25.63
K-562	26.54
MOLT-4	36.39
RPMI-8226	23.11
SR	38.65
Non-Small Cell Lung Cancer	
A549/ATCC	41.82
EKVX	20.45
HOP-92	2.90
NCI-H226	39.74
NCI-H23	15.33
NCI-H322M	42.27
NCI-H460	39.46
NCI-H522	27.25
Colon Cancer	
COLO 205	45.27
HCC-2998	19.91
HCT-116	37.28
HCT-15	36.19
HT29	56.16
KM12	46.01
SW-620	55.95
CNS Cancer	
SF-268	73.18
SF-295	5.12
SF-539	53.97
SNB-19	41.15
SNB-75	90.76
U251	43.41
Melanoma	
LOX IMVI	38.32
M14	51.01
MDA-MB-435	42.76
SK-MEL-2	38.96
SK-MEL-28	55.32
SK-MEL-5	16.60
UACC-257	54.33
UACC-62	18.79
Ovarian Cancer	
IGROV1	34.36
OVCAR-3	25.95
OVCAR-4	32.16
OVCAR-5	91.02
OVCAR-8	59.13
NCI/ADR-RES	35.45
SK-OV-3	27.83
Renal Cancer	
786-0	35.69
A498	70.73
ACHN	34.39
CAKI-1	32.71
RXF 393	71.84
SN12C	26.12
TK-10	71.10
UO-31	20.23
Prostate Cancer	
PC-3	19.76
DU-145	57.63
Breast Cancer	
MCF7	47.38
MDA-MB-231/ATCC	65.48
HS 578T	58.22
BT-549	39.83
T-47D	18.24
MDA-MB-468	31.61
Mean	40.31
Delta	37.41
Range	88.12





Γράφημα Γ1. Αποτελέσματα του ΙΙ Σταδίου της ένωσης (**76**)

Πίνακας Γ5. Αποτελέσματα του ΙΙ Σταδίου της ένωσης (**76**)



National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program — Mean Graphs

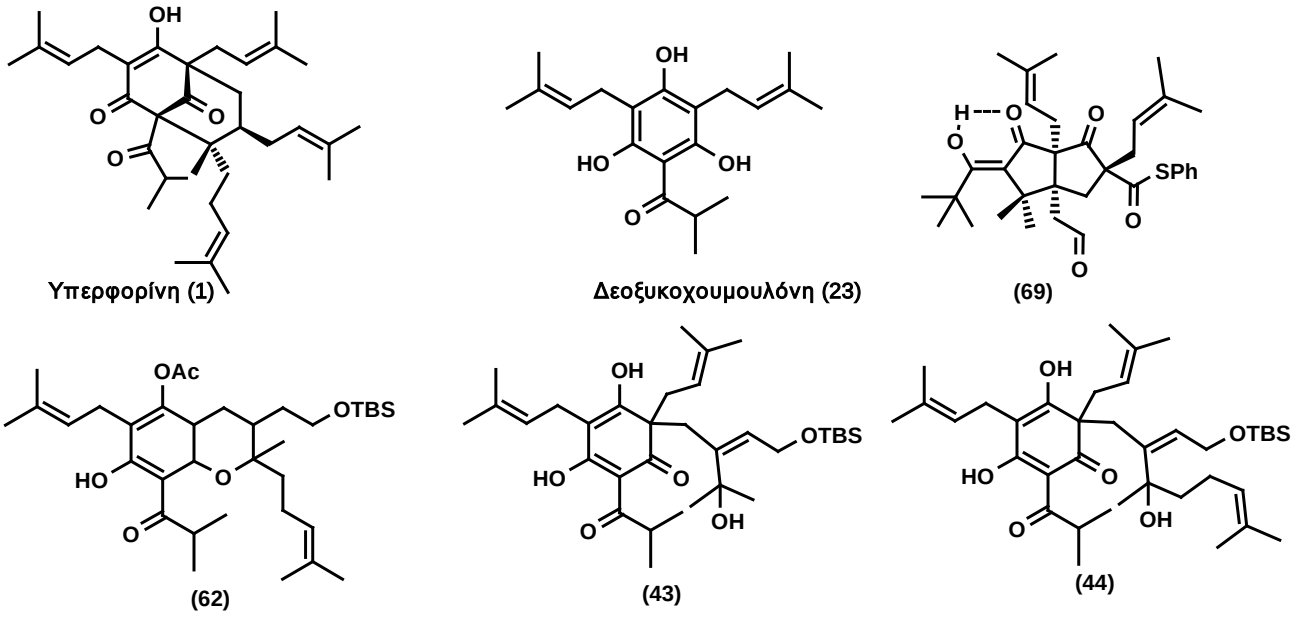
NSC : D - 754066/1 | Units :Molar | SSPL :0EYF | EXP. ID :1009NS21

Report Date :February 07, 2011 | Test Date :September 20, 2010

Panel/Cell Line	Log_{10}GI50	GI50	Log_{10}TGI	TGI	Log_{10}LC50	LC50
Leukemia						
CCRF-CEM	-5.54		-4.83		-4.07	
HL-60(TB)	-5.70		-5.33		-4.53	
K-562	-5.62		-4.33		> -4.00	
MOLT-4	-5.60		-4.99		-4.24	
RPMI-8226	-5.66		-4.91		> -4.00	
SR	-5.56		-5.00		-4.18	
Non-Small Cell Lung Cancer						
A549/ATCC	-5.50		> -4.00		> -4.00	
EKVX	-5.67		-5.15		> -4.00	
HOP-62	-5.21		> -4.00		> -4.00	
HOP-92	-5.80		-5.19		> -4.00	
NCI-H226	-5.55		-4.76		> -4.00	
NCI-H23	-5.65		-5.12		> -4.00	
NCI-H322M	-5.63		-5.14		> -4.00	
NCI-H460	-5.52		-4.96		-4.11	
NCI-H522	-5.76		-5.23		> -4.00	
Colon Cancer						
COLO 205	-5.38		-4.82		-4.39	
HCC-2998	-5.50		-4.62		> -4.00	
HCT-116	-5.50		-4.94		-4.13	
HCT-15	-5.49		-4.69		> -4.00	
HT29	-5.53		-4.30		> -4.00	
KM12	-5.46		-4.82		> -4.00	
SW-620	-5.47		> -4.00		> -4.00	
CNS Cancer						
SF-268	-5.50		-4.22		> -4.00	
SF-295	-5.70		-5.26		> -4.00	
SF-539	-5.43		-4.74		-4.03	
SNB-19	-5.39		> -4.00		> -4.00	
SNB-75	-5.48		-4.52		> -4.00	
U251	-5.49		-4.33		> -4.00	
Melanoma						
LOX IMVI	-5.51		-4.93		-4.20	
MALME-3M	-5.71		-5.15		> -4.00	
M14	-5.38		-4.39		> -4.00	
MDA-MB-435	-5.53		-4.65		> -4.00	
SK-MEL-2	-5.64		-5.22		-4.51	
SK-MEL-28	-5.30		-4.07		> -4.00	
SK-MEL-5	-5.90		-5.55		-5.19	
UACC-257	-5.55		-5.06		> -4.00	
UACC-62	-5.55		-4.79		-4.07	
Ovarian Cancer						
IGROV1	-5.41		-4.75		> -4.00	
OVCAR-3	-5.64		-5.16		-4.07	
OVCAR-4	-5.45		> -4.00		> -4.00	
OVCAR-5	-5.28		-4.42		> -4.00	
OVCAR-8	-5.43		> -4.00		> -4.00	
NCI/ADR-RES	-5.56		-5.00		> -4.00	
SK-OV-3	-5.51		-5.01		> -4.00	
Renal Cancer						
786-0	-5.54		-5.05		-4.30	
A498	-5.87		-5.30		-4.32	
ACHN	-5.53		-4.84		> -4.00	
CAKI-1	-5.56		-5.03		> -4.00	
RXF 393	-5.39		-4.62		> -4.00	
SN12C	-5.61		-4.88		> -4.00	
TK-10	-5.53		-4.77		> -4.00	
UO-31	-5.63		-5.12		> -4.00	
Prostate Cancer						
PC-3	-5.51		> -4.00		> -4.00	
DU-145	-5.44		-4.16		> -4.00	
Breast Cancer						
MCF7	-5.50		-4.82		> -4.00	
MDA-MB-231/ATCC	-5.46		-4.82		> -4.00	
HS 578T	-5.61		-4.99		> -4.00	
T-47D	-5.51		-5.04		> -4.00	
MDA-MB-468	-5.66		-4.83		> -4.00	
MID	-5.54		-4.76		-4.07	
Delta	0.36		0.79		1.12	
Range	0.69		1.55		1.19	

Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των ενώσεων (**1**), (**23**), (**69**), (**62**), (**43**) και (**44**) ανατέθηκε στην Δρ. Αν. Οδυσσέως και στην Δρ. Γ. Χρήστου, οι οποίες συνεργάζονται με το Πανεπιστήμιο της Κύπρου.

Μετρήθηκε η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκινικού προστάτη PC-3, των ενώσεων που φαίνονται στην Εικόνα Γ6.



Εικόνα Γ6. Ανάλογα, τα οποία δοκιμάστηκαν

Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε με την χρήση της δοκιμασίας Crystal Violet (CV) (Reinhardt and Travis 2000; Vraka et al., 2006). Η μέθοδος βασίζεται στη μεταβολή του χρώματος της ένωσης Crystal Violet (CV) [hexamethyl pararosaniline chloride] ως αποτέλεσμα της επώασής της με ζωντανά κύτταρα. Πιθανή κυτταροτοξική δράση των υπό εξέταση ενώσεων και επομένως μείωση του κυτταρικού αριθμού ως προς την καλλιέργεια αναφοράς (μάρτυρας: α-TOS, ηλεκτρικός εστέρας της α-τοκοφερόλης) οδηγεί σε μείωση της χρώσης του Crystal Violet (CV) και τελικά σε αναλογική ελάττωση της απορρόφησης στο μήκος κύματος (620 nm).

Τα αποτελέσματα, τα οποία συνοψίζονται και παρατίθενται στον Πίνακα Γ6, έδειξαν ότι οι ενώσεις (**1**) και (**23**) είχαν υψηλή κυτταροτοξικότητα (IC_{50} 18,85 και IC_{50} 19,00 αντίστοιχα) στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Οι ενώσεις (**69**, **62**, **43** και **44**) έδειξαν πολύ καλή δραστικότητα (IC_{50} 24,05, IC_{50} 20,21 και IC_{50} 24,17 και IC_{50} 27,02 αντίστοιχα). Συνολικά, όλες οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν είχαν πολύ καλύτερη δράση σε σύγκριση με την α-TOS (IC_{50} 43,13) (Vidali et al., 2013).

Πίνακας Γ6. Αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (IC σε μg/mL)

Ένωση	**IC_{20}**	**IC_{50}**	**IC_{80}**
(1)	7,54	18,86	30,17
(23)	7,60	19,00	30,40
(69)	9,62	24,05	38,48
(62)	8,08	20,21	32,37
(43)	9,67	24,17	38,68
(44)	10,81	27,02	43,23
Μάρτυρας (α-TOS)	17,25	43,13	69,01

IC (συγκέντρωση αναστολής): Συγκέντρωση της ουσίας (μg/mL) που απαιτείται για να ανασταλεί το 20% , το 50% και το 80% του πληθυσμού (IC_{20}, IC_{50} και IC_{80}).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δακανάλη, Μ. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2008.

Chen, J.; Wang, T.; Zhao, K. *Tetahedron Lett.* **1994**, *35*, 2827-2828.

Couladouros, E.A.; Dakanali, M.; Demadis, D.K.; Vidali, P.V. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4430-4433.

Reinhardt, C.; Travis, A.S. Kluwer Academic, ISBN 0-7923-6602-6; Dordrecht, Netherlands, 2000; pp.208–209.

Vidali, V.P.; Mitsopoulou, K.P.; Dakanali, M.; Demadis, K.D.; Odysseos, A.D.; Christou, Y.A.; Couladouros, E.A. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5404–5407.

Vraka, P.S.; Drouza, C.; Rikkou, M.P.; Odysseos, A.D.; Keramidas, A.D. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2684-2696.

ΠΗΓΕΣ

1. http://dtp.nci.nih.gov/

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γενικές παρατηρήσεις

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων στο εργαστήριο σύνθεσης φυσικών προϊόντων και βιοοργανικής χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε αδρανή ατμόσφαιρα αργού και με πρόσφατα αποσταγμένους διαλύτες, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Για την ανάδευση χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικοί αναδευτήρες και μαγνήτες με περίβλημα Teflon ή μηχανικός αναδευτήρας. Σε όλες τις αντιδράσεις η θερμοκρασία μετρήθηκε εξωτερικά. Στις αντιδράσεις που απαιτούνταν άνυδρες συνθήκες, τα γυάλινα σκεύη στεγνώθηκαν σε κλίβανο (120 °C για 24 ώρες) ή με φλόγα υπό κενό (flame dried).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν στην υψηλότερη δυνατή καθαρότητα (Aldrich, Merck, Acros ή Alfa) και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά. Το τετραϋδροφουράνιο (THF) και ο διαιθυλαιθέρας (Et_2O) αποστάχθηκαν από μεταλλικό νάτριο και βενζοφαινόνη, το τολουόλιο και το βενζόλιο από μεταλλικό νάτριο, ενώ το διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) από υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2).

Η πορεία των αντιδράσεων παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC), για την οποία χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες πλάκες (0.25 mm) επιστρωμένες με silica gel (60F-254). Για την εμφάνιση χρησιμοποιήθηκε υπεριώδης ακτινοβολία (UV), καθώς και διαλύματα π-ανισαλδεΰδης, 7% αιθανολικού φωσφομολυβδαινικού οξέος και υπερμαγγανικού καλίου. Για τη χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε silica gel από τη Merck ή την SDS μεγέθους 0.040 – 0.063 mm.

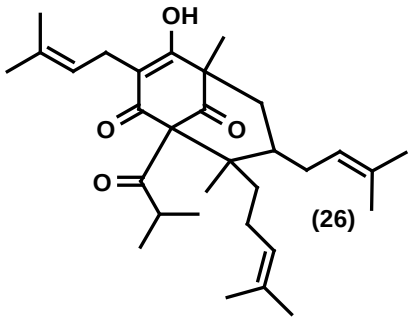
Τα Φάσματα υπερύθρου (IR) ελήφθησαν σε όργανο NICOLET 6700 FT-IR. Τα φάσματα μαζών (MS) ελήφθησαν σε όργανο Shimadzu 2010 EV LC-MS και σε όργανο LC-ESI(+)-TOF. Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ελήφθησαν σε όργανο Bruker DRX – 500 και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα MestReC 2.3 ή 4.7 ή MestRe Nova 5.2.4. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) μετρήθηκαν σε μέρη στο εκατομμύριο (ppm) ως προς το δευτεριωμένο διαλύτη, που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα. Οι

πολλαπλότητες στην ανάλυση των φασμάτων συμβολίζονται ως απλή (s), ευρεία απλή (brs), διπλή (d), ευρεία διπλή (bd), διπλή διπλής (dd), διπλή διπλής διπλής (ddd), τριπλή (t), πολλαπλή (m). Όπου κρίθηκε απαραίτητο, το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο διηθήθηκε από άνυδρο ανθρακικό κάλιο για την απομάκρυνση τυχόν όξινων υπολειμμάτων.

ΜΕΡΟΣ Α

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ *Hypericum triquetrifolium*

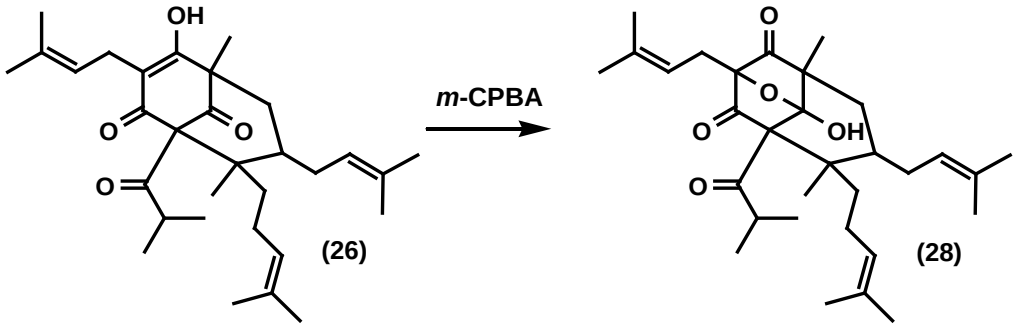
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ Hyperibine J (26)

Hyperibine J (26)			
			
M.T.	**M.B.**	**M.B. (μονοϊσοτοπικό)**	**TLC**
$C_{31}H_{46}O_4$	482.69	482.34	R*f* = 0.36 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος Εκχύλισης: Όσον αφορά την εκχύλιση του *H. triquetrifolium* ακολουθήθηκε όμοια πειραματική διαδικασία με το *H. perforatum* (Περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό του Β μέρους).

Πιο αναλυτικά, τα φρέσκα άνθη (11.9 g) κονιορτοποιήθηκαν σε γουδί παρουσία υγρού αζώτου. Εν συνεχεία, μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη στην οποία προστέθηκαν 24.5 mL επτάνιο. Για 20 λεπτά τοποθετήθηκαν σε συσκευή συμπύκνωσης με περιστροφή (Rotavapor) χωρίς κενό, σε θερμοκρασία 40 °C. Ακολούθησε διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό υπό ελαττωμένη πίεση. Το ελαιώδες υπόλειμμα (270 mg) διαλύθηκε με συνολική ποσότητα 2 x 14 mL επτάνιο και 14 mL μεθανόλη. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση [3x (12 mL μεθανόλη/2 mL επτάνιο)] συλλέγοντας την στοιβάδα της μεθανόλης η οποία περιείχε την Hyperibine J (**26**). Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο: AcOEt 95:5 έως 90:10) παρέχει την Hyperibine J (**26**) (45 mg) ως υποκίτρινο ελαιώδες υγρό. Για την παραπάνω διαδικασία απαιτείται σκοτάδι.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 °C CD_3OD**	*δ:* 5.08 (1H, m, H-27), 5.02 (1H, m, H-17), 4.99 (1H, m, H-22), 3.0 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H_2-26), 2.18 (1H, m, H-16a), 2.09 (1H, m, H-11), 2.01 (1H, m, H-21a), 1.90 (1H, m, H-8a), 1.77 (1H, m, H-16b), 1.76 (1H, m, H-15a), 1.74 (1H, m, H-21b), 1.72 (3H, s, H_3-29), 1.68 (3H, s, H_3-25), 1.66 (3H, s, H_3-20), 1.65 (3H, s, H_3-30), 1.60 (3H, s, H_3-19), 1.59 (3H, s, H_3-24), 1.57 (1H, m, H-15b), 1.39 (1H, m, H-8b), 1.25 (3H, s, H_3-31), 1.07 (1H, m, H-7), 1.08 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H_3-12), 1.03 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H_3-13), 0.99 (3H, s, H_3-14)
^{13}C NMR	*δ:* 212.1, 209.3, 134.2, 133.6, 131.9, 131.9, 126.1, 123.8, 122.6, 121.3, 63.1, 56.5, 43.6, 42.9, 42.0, 37.9, 28.6, 26.1, 26.0, 25.9, 25.7, 22.7, 22.1, 21.2, 18.2, 18.1, 17.9, 16.9, 15.1
LC-ESI(+)-TOF	$[M+H]^+_{\theta\varepsilon\omega\rho.}$: 483.3396; $[M+H]^+_{\pi\varepsilon\iota\rho\alpha\mu.}$: 483.3458
IR	ν_{max} 3350, 2970, 2916, 2849, 1722, 1600, 1448, 1377, 1370, 1215, 1172, 1103, 1071 cm^{-1}
$[\alpha]_D$	+ 7.2° (1 gr/100 mL, MeOH)

Οξειδωμένο προϊόν της Hyperibine J (28)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B. (μονοϊσοτοπικό)**	**TLC**
77%	$C_{31}H_{46}O_5$	498.69	498.33	R*f* = 0.75 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της Hyperibine J (**26**) (10 mg, 0.021 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (1 mL) προστίθεται *m*-CPBA (5.4 mg, 0.031 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 30 περίπου λεπτά. Στο μίγμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$. Στη συνέχεια προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 95:5) παρέχει την Hyperibone J (**28**) (8 mg).

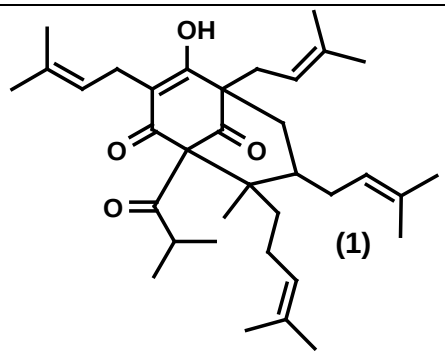
^{1}H NMR (500 MHz) **25 °C $CDCl_3$**	*δ:* 7.74 (1H, brs, 0H-9), 5.01 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-27), 4.96 (1H, t, *J* = 6.3 Hz, H-17), 4.89 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-22), 3.18 (1H, sept, *J* = 6.6 Hz, H-11), 2.72 (1H, dd, *J* = 15.7, 6.9 Hz, H-26a), 2.53 (1H, dd, *J* = 15.5, 7.6 Hz, H-26b), 2.23 (1H, m, H-16a), 2.06 (1H, m, H-21a), 1.86 (1H, dd, *J* = 14.4, 3.4 Hz, H-8eq), 1.78 (1H, m, H-16b), 1.71 (1H, m, H-15a), 1.67 (3H, s, H_3-25), 1.65 (3H, s, H_3-20), 1.62 (1H, m, H-21b), 1.62 (6H, s, H_3-29 και

	H_3-30), 1.56 (1H, m, H-15b), 1.56 (3H, s, H_3-19), 1.54 (3H, s, H_3-24), 1.28 (1H, m, H-8ax), 1.13 (3H, s, H_3-31), 1.08 (3H, d, J = 6.4 Hz, H_3-12), 1.03 (1H, m, H-7), 0.98 (3H, s, H_3-14), 0.91 (3H, d, J = 6.7 Hz, H_3-13)
^{13}C NMR	*δ:* 217.8, 209.8, 206.8, 136.0, 133.5, 131.8, 124.0, 122.0, 115.8, 107.7, 97.1, 70.9, 51.4, 47.1, 41.6, 39.2, 36.8, 34.1, 28.4, 25.8, 25.8, 25.7, 23.9, 23.7, 19.1, 18.0, 17.9, 17.8, 17.5, 16.7, 15.4
IR	ν_{max} 3350, 2970, 2916, 2849, 1722, 1600, 1448, 1377, 1370, 1215, 1172, 1103, 1071 cm^{-1}
$[\alpha]_D$	+15° (*c* 0.3 $CHCl_3$)

ΜΕΡΟΣ Β

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ *Hypericum perforatum*

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΥΠΕΡΦΟΡΙΝΗΣ

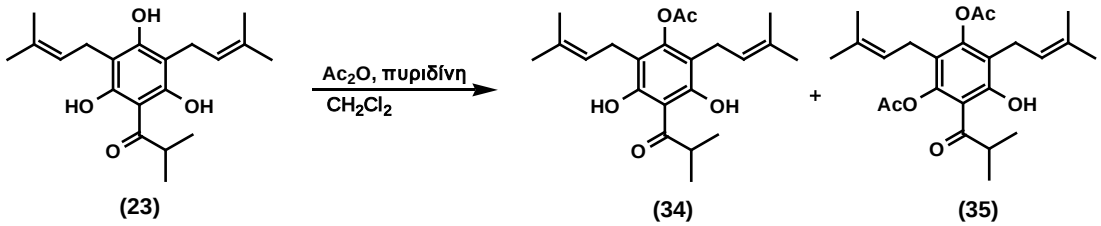
Υπερφορίνη (1)			
 **(1)**			
Μ.Τ.	**Μ.Β.**	**Μ.Β. (μονοϊσοτοπικό)**	**TLC**
$C_{35}H_{52}O_4$	536.785	536.387	R*f* = 0.40 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος Εκχύλισης:

Για την εκχύλιση και απομόνωση των δραστικών συστατικών του *H. perforatum* ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Adam. Τα φρέσκα άνθη (150 g) του φυτού κονιορτοποιήθηκαν σε γουδί παρουσία υγρού αζώτου. Εν συνεχεία, μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη στην οποία προστέθηκαν 360 mL επτάνιο. Για 20 λεπτά τοποθετήθηκαν σε συσκευή συμπύκνωσης με περιστροφή (Rotavapor) χωρίς κενό και σε θερμοκρασία 40ºC. Ακολούθησε διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό (Στάδιο Ι). Το ελαιώδες υπόλειμμα (5 g) διαλύθηκε σε μείγμα επτανίου:μεθανόλης (1:1, συνολική ποσότητα 210 mL επτάνιο και 210 mL μεθανόλη). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση [3x (180 mL μεθανόλη/ 30 mL επτάνιο)]. Παρελήφθη η στοιβάδα της μεθανόλης (Στάδιο ΙΙ, ≈2.3 g) και του επτανίου (Στάδιο ΙΙΙ, ≈2.7 g). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο: AcOEt 90:10 ως 100% EtOAc) για το μεθανολικό εκχύλισμα, το οποίο περιείχε την υπερφορίνη (**1**). Η υπερφορίνη (**1**) που απομονώθηκε ήταν 1038 mg. Επίσης, απομονώθηκε η μη πολική ένωση

(**29**), σε ποσότητα 7 mg (Βλ. παρακάτω), καθώς και το Κλάσμα Β (1140 mg), το οποίο περιείχε πολικές ενώσεις (σε σχέση με την υπερφορίνη (**1**)).

Μονο-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (34)
Δι-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (35)

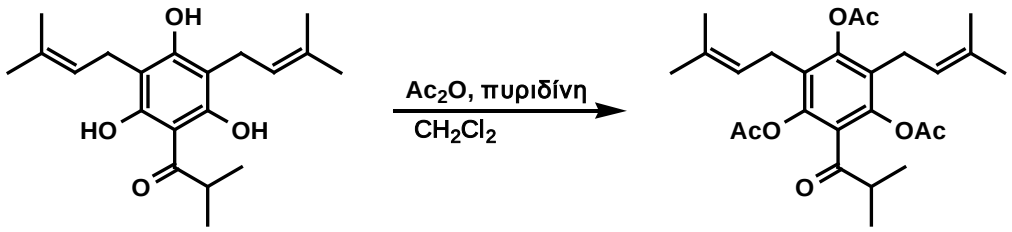


Απόδοση	**Μ.Τ.**	**Μ.Β.**	**Μ.Β.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
32% για το (**34**)	$C_{22}H_{30}O_5$	374.471	374.209	R*f* = 0.27 Εξάνιο/AcOEt 9:1
30% για το (**35**)	$C_{24}H_{32}O_6$	416.507	416.220	R*f* = 0.18 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) (0.628 g, 1.89 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (3.0 mL) προστίθεται πυριδίνη (0.107 mL, 1.32 mmol) και οξικός ανυδρίτης (0.123 mL, 1.32 mmol), στους 0 °C και το μίγμα αναδεύεται για τρεις ώρες σε αυτή την θερμοκρασία. Στη συνέχεια προστίθεται ξανά πυριδίνη (0.076 mL, 0.945 mmol) και οξικός ανυδρίτης (0.088 mL, 0.945 mmol) στους 0 °C και το μίγμα αναδεύεται για μία ώρα σε αυτή την θερμοκρασία. Η αντίδραση τελείωσε με την προσθήκη πυριδίνης (0.030 mL, 0.378 mmol) και οξικού ανυδρίτη (0.035 mL, 0.378 mmol). Στη συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 10 λεπτά. Στο μίγμα προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl, νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Χρωματογραφία στήλης παρέχει τη μονο-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη

(**34**) (227 mg), ως υποκίτρινο παχύρρευστο ελαιώδες υγρό και τη δι-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (**35**) (236 mg), ως υποκίτρινο παχύρρευστο ελαιώδες υγρό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	(**34**): *δ:* 1.13 (6H, d, *J* = 6.8 Hz; -COCHC(CH_3)$_2$), 1.67 (6H, brs; CH=C(CH_3)$_2$), 1.75 (3H, brs; CH=C(CH_3)$_2$), 1.78 (3H, brs; -CH=C(CH_3)$_2$), 2.31 (3H, s; -COCH_3), 3.17 (2H, brs; -CH_2CH=C(CH_3)$_2$), 3.46 (1H, m;-COCH(CH_3)$_2$), 5.04 (1H, brt; -CH=C-), 5.04 (1H, brt; -CH=C-) (**35**): *δ:* 1.19 (6H, d, *J* = 6.8 Hz; -COCHC(CH_3)$_2$), 1.64–1.78 (12H, τρεις singlets; -CH=C(CH_3)$_2$), 2.30 (3H, s; -COCH_3), 2.32 (3H, s; -COCH_3), 3.04 (2H, brs; -CH_2CH=C-), 3.24 (2H, brs; -CH_2CH=C-), 3.44 (1H, m; -COCH(CH_3)$_2$), 4.97 (1H, brs; -CH=C-), 5.13 (1H, brs; -CH=C-), 12.39 (1H, s; -OH)
^{13}C NMR	(**34**): *δ:* 210.34, 168.43, 161.43, 159.90, 152.67, 147.07, 134.06, 131.97, 131.75, 121.53, 121.24, 120.98, 118.47, 113.17, 39.07, 38.57, 25.46, 25.29, 24.23, 23.36, 21.94, 20.72, 20.23, 19.27, 17.63 (**35**): *δ:* 210.47, 168.64, 168.18, 160.05, 152.72, 147.13, 132.29, 131.96, 121.71, 121.59, 120.99, 118.51, 113.30, 39.21, 29.65, 25.63, 25.48, 24.36, 23.50, 20.99, 20.49, 19.46, 17.86, 17.79
IR	(**34**): *ν* 3435, 2967, 2911, 1773, 1620, 1423, 1387, 1368, 1188, 1137, 1077 cm^{-1} (**35**): *ν* 2967, 2924, 1777, 1620, 1419, 1366, 1188, 1170, 1118, 1075 cm^{-1}
LC-MS (ESI)	(**34**): $C_{22}H_{30}O_5$ $[M+H]^+$ 375; found 375 (**35**): $C_{24}H_{32}O_6$ $[M+H]^+$ 417; found 417

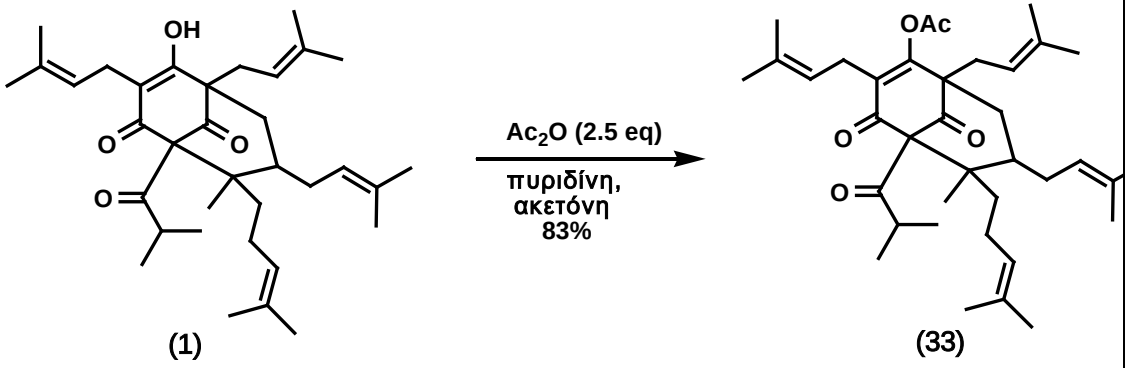
Τρι-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (36)				
 **(23)** **(36)**				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
84%	$C_{26}H_{34}O_7$	458.544	458.230	R*f* = 0.25 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της δεοξυκοχουμουλόνης (**23**) (0.70 g, 1.2mmol) σε διχλωρομεθάνιο (3.5 mL) προστίθεται πυριδίνη (0.388 mL, 4.80 mmol) και οξικός ανυδρίτης (0.450 mL, 4.80 mmol), στους 0 °C και το μίγμα αναδεύεται για τρεις ώρες σε αυτή την θερμοκρασία. Στη συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 10 λεπτά. Στο μίγμα προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl, νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Χρωματογραφία στήλης παρέχει την τρι-ακετυλο δεοξυκοχουμουλόνη (**36**) (470 mg, 84 %), ως υποκίτρινο παχύρρευστο ελαιώδες υγρό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 5.02 (2H, brt; $(CH_3)_2C$=C*H*–), 3.10 (4H, brs; -C*H*$_2$–CH=C-),2.96 (1H, spt; -COC*H*$(CH_3)_2$), 2.14-2.29 (9H, δύο singlets; –COC*H*$_3$), 1.69 (12H, s;$(CH_3)_2$C=CH), 1.13 (6H, d, *J* = 6.9 Hz; -COCH(C*H*$_3)_2$)

^{13}C NMR	*δ:* 205.14, 168.02, 149.52, 144.58, 132.26, 126.82, 126.42, 120.74, 41.43, 25.44, 24.71, 20.37, 18.12, 17.77
IR	ν 2971, 2928, 1771, 1704, 1368, 1186, 1161, 1071, 893, 861, 588 cm^{-1}
LC-MS (ESI)	$C_{26}H_{34}O_7$ $[M+NH_4]^+$ 476; found 476

Ακετυλο-υπερφορίνη (33)



Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
83%	$C_{37}H_{54}O_5$	578.822	578.397	R*f* = 0.27 Εξάνιο/AcOEt 8:2

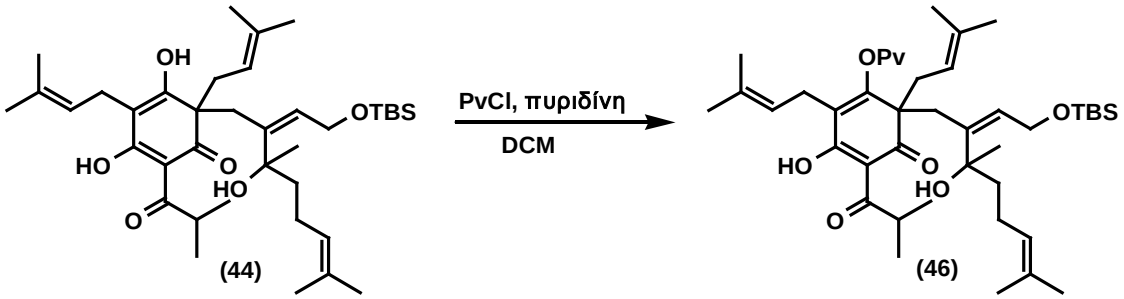
Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της υπερφορίνης (**1**) (0.137 g, 0.25 mmol) σε ακετόνη (2.0 mL) προστίθεται πυριδίνη (0.048 mL, 0.51 mmol) και οξικός ανυδρίτης (0.052 mL, 0.63 mmol), στους 0 °C και το μίγμα αναδεύεται για τρεις ώρες σε αυτή την θερμοκρασία. Στη συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 10 λεπτά. Στο μίγμα προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl, νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Χρωματογραφία στήλης παρέχει την ακετυλο-υπερφορίνη (**33**) (120 mg, 83 %), ως υποκίτρινο παχύρρευστο ελαιώδες υγρό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 0.99 (3H, d, *J*=6.5Hz; $(CH_3)_2CH-$), 1.02 (3H, s; CH_3-C-), 1.12 (3H, d, *J*= 6.5Hz; $(CH_3)_2CH-$), 1.27-1.49 (2H, two multiplets overlapping, -CH_aH_b- of ring, -

	C*H*$_a$H$_b$-CH$_2$C=C-), 1.57 (3H, brs; (C*H*$_3$)$_2$C=CH−), 1.61 (3H, brs; (C*H*$_3$)$_2$C=CH−), 1.66 (6H, two brs; (C*H*$_3$)$_2$C=CH−), 1.69 (6H, brs; (C*H*$_3$)$_2$C=CH−), 1.75-1.68 (17H, m, τρεις singlets; -C*H*-, (C*H*$_3$)$_2$C=CH-,-CH$_a$*H*$_b$- of ring, -CH$_2$CH=C(CH$_3$)$_2$), 1.76-2.19 (6H, m; -C*H*$_2$-CH=C-, (CH$_3$)$_2$C*H*CO-), 2.25 (3H, s; *CH*$_3$CO), 2.31 (1H, dd, *J*=15.0 Hz, *J*=6.0 Hz;-C*H*$_2$−CH=C−), 2.52 (1H, dd, *J*=15.0Hz, J=6.2 Hz; C*H*$_2$−CH=C−), 2.86 (1H, dd, *J* =14.5, *J* =6.7 Hz; C*H*$_2$−CH=C−), 3.06 (1H, dd, *J*=14.5 Hz, *J*=6.7 Hz; −C*H*$_2$−CH=C−), 5.01 (4H, m; (CH$_3$)$_2$C=C*H*−)
^{13}C NMR	*δ:* 208.5, 206.3, 193.5, 166.2, 162.7, 134.1, 134.0, 133.8, 133.0, 131.1, 124.4, 122.2, 119.5, 118.8, 84.1, 56.8, 49.5, 42.6, 41.9, 37.8, 36.1, 29.7, 29.4, 26.8, 25.6, 25.4, 24.7, 23.6, 20.8, 20.2, 20.1, 17.8, 17.6, 17.4, 17.4, 13.3
IR	ν 2971, 2909, 2872, 1775, 1734, 1720, 1655, 1634, 1448, 1378, 1333, 1188, 1143, 1077, 1047, 867, 838, 797 cm^{-1}
LC-MS (ESI)	C$_{37}$H$_{54}$O$_5$ [M+Na]$^+$ 579; found 579

ΜΕΡΟΣ Γ

Παράγωγο της πιβαλοϋλο-προστατευμένης κολουπουλόνης (46)

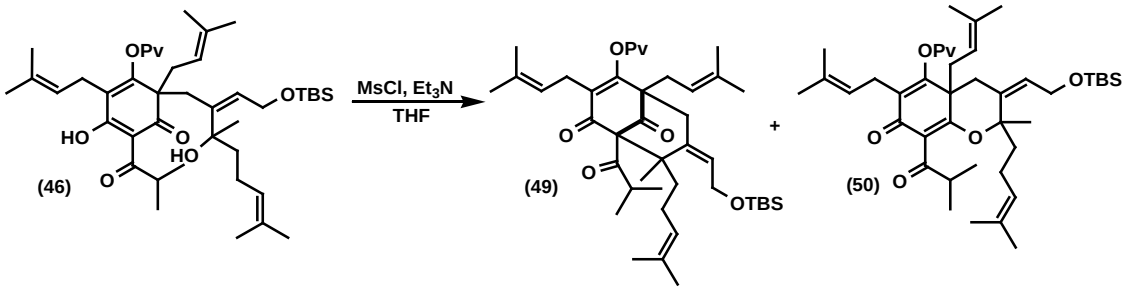


Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
66%	$C_{43}H_{70}O_7Si$	727.097	726.489	R*f* = 0.36 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της (**44**) (200 g, 0.31 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (1 mL) προστίθεται πυριδίνη (0.08 mL, 0.62 mmol) και κατόπιν οξικός ανυδρίτης (0.06 mL, 0.78 mmol), στους 0 °C και εν συνεχεία το μίγμα αναδεύεται για μία ώρα στους 25 °C. Στη συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 10 λεπτά. Στο μίγμα προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl, νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Χρωματογραφία στήλης παρέχει την (**46**) (150 mg) ως υποκίτρινο ελαιώδες υγρό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 °C $CDCl_3$**	*δ:* 5.44-5.21 (1H, m, C=C*H*-CH_2OTBS), 5.15 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.02 (2H, m, , C=C*H*-CH_2), 4.27-3-39 (3H, m, CH-C*H*$_2$-OTBS, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$), 3.10-2.78 (4H, m, CH-C*H*$_2$-C), 2.78-2.45 (2H, m, C-C*H*$_2$-C), 2.45-2.13 (2H, m, C-C*H*$_2$-CH_2), 2.13-1.84 (2H, m, CH_2-CH_2-CH), 1.73-1.63 (12H, σειρά από s, C*H*$_3$), 1.59-1.55 (3H, s, C*H*$_3$), 1.37-1.31 (9H, σειρά από s, C*H*$_3$, -O*Pv*), 1.30-

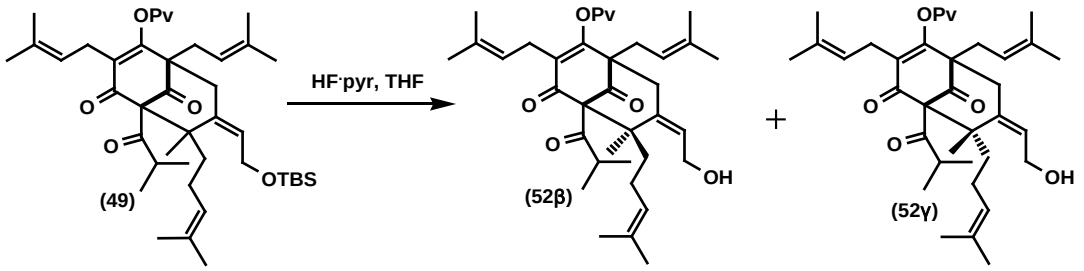
	1.20 (6H, m, CH_3), 1.19-1.06 (6H, m, C(O)-CH-(CH_3)$_2$), 0.86 (9H, s, -O*TBS*), -0.02 (s, 6 H, -O*TBS*)
^{13}C NMR	*δ:* 209.92, 208.99, 196.99, 195.50, 189.03, 183.14, 173.78, 161.88, 142.52, 135.31, 126.48, 125.91, 125.00, 124.68, 124.43, 120.80, 120.07, 117.46, 116.90, 75.39, 60.05, 59.70, 41.66, 40.59, 39.91, 38.66, 38.05, 36.20, 35.77, 29.63, 28.97, 28.67, 28.26, 27.73, 27.17, 25.76, 25.61, 23.82, 23.59, 22.55, 22.40, 19.57, 18.60, 18.41, 17.89, 17.60
IR	
LC-MS (ESI)	

Δικυκλικές ενώσεις (49) και (50)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B. (μονοϊσοτοπικό)**	**TLC**
60% για το (**49**) 40% για το (**50**)	$C_{43}H_{68}O_6Si$	709.0819	708.4785	R*f* (**49**) = 0.66 R*f* (**50**) = 0.50 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος παρασκευής: Διάλυμα της (**46**) (1069 mg, 1.47 mmol) σε άνυδρο THF (11 mL) ψύχεται στους -40 ^oC και προστίθεται Et_3N (1.14 mL, 8.085 mmol) και MsCl (0.35 mL, 4.41 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 5 λεπτά σε αυτή τη θερμοκρασία και προστίθενται εκ νέου Et_3N και MsCl. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου διαπιστωθεί η πλήρης κατανάλωση της (**46**). Στο μίγμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και αφήνεται υπό ανάδευση για 15 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 98:2 έως 8:2) παρέχει την C–κυκλοποιημένη (**49**) (622 mg) και την O– κυκλοποιημένη (**50**) (414 mg) ως υποκίτρινα ελαιώδη υγρά.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 °C $CDCl_3$**	Μείγμα δύο διαστερεϊσομερών: (**49**): *δ:* 5.38 (1H, brs C=C*H*-CH_2OTBS), 5.23 (1H, brs, C=C*H*-CH_2), 5.04 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 4.88 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.20 (1H, dd, *J* = 15.9 και 6.5 Hz, CH-C$H_a$$H_b$-OTBS), 4.09 (1H, dd, *J* = 15.9 και 6.5 Hz, CH-$CH_a$$H_b$-OTBS), 3.04 (1H, m, CH-C$H_a$$H_b$-C), 2.85-2.67 (3H, m, CH-$CH_a$$H_b$-C, CH-C$H_2$-C), 2.54-2.43 (2H, m, C-CH_2-C), 2.40-2.33 (2H, m, C-CH_2-CH_2), 2.24-2.13 (2H, m, CH_2-CH_2-CH), 2.02 (1H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$), 1.71 (3H, s, CH_3), 1.68 (3H, s, CH_3), 1.67 (3H, s, CH_3), 1.63 (3H, s, CH_3), 1.61 (3H, s, CH_3), 1.59 (3H, s, CH_3), 1.33 (9H, s, -O*Pv*), 1.24 (3H, s, CH_3), 1.04 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, C(O)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$), 0.94 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, C(O)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$), 0.87 (9H, s, -O*TBS*), 0.02 (6H, s, -O*TBS*) (**50**): *δ:* 5.47 (1H, brs, C=C*H*-CH_2OTBS), 5.01 (1H, t, *J* = 6.3 Hz, C=C*H*-CH_2), 4.91 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.86 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.44-4.22 (2H, m, CH-CH_2-OTBS), 2.96 (1H, dd, *J* = 14.6 και 6.0 Hz, CH-C$H_a$$H_b$-C), 2.88 (1H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$), 2,73-2,65 (2H, m, CH-$CH_a$$H_b$-C, C-$CH_a$$H_b$-C), 2.61 (1H, dd, *J* = 13.6 και 8.1 Hz, CH-C$H_a$$H_b$-C), 2,30 (1H, dd, *J* = 13.3 και 6.4 Hz, C-$CH_a$$H_b$-$CH_2$), 2,17-2.14 (2H, m, CH-$CH_a$$H_b$$CH_2$, CH-$CH_a$$H_b$$CH_2$), 2.04 (1H, m, C-$CH_a$$H_b$-$CH_2$), 1.89-1.81 (2H, m, C-C$H_2$-C), 1.64 (9H, σειρά από s, CH_3), 1.62 (3H, s, CH_3), 1.58-1.55 (6H, σειρά από s, CH_3), 1.35 (s, 9H, -O*Pv*), 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.12-1.08 (6H, m, C(O)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$, C(O)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$), 0.91 (s, 9H, -O*TBS*), 0.08 (s, 6H, -O*TBS*)
^{13}C NMR	(**50**): *δ:* 206.41, 184.25, 174.66, 166.97, 158.49, 135.98, 135.87, 132.11, 130.11, 129.95, 123.09,

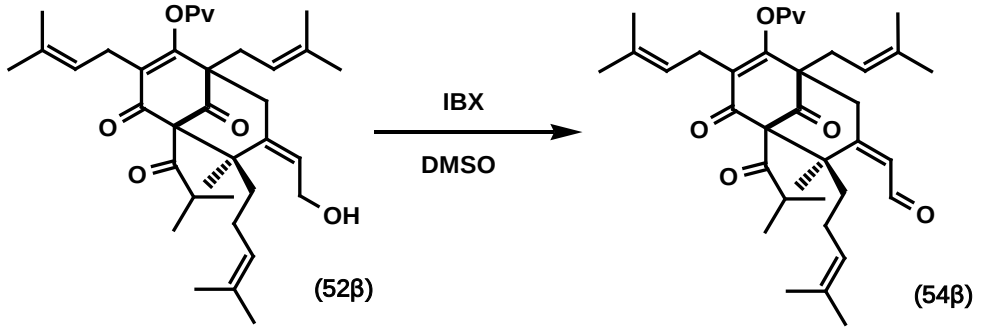
	122.83, 120.40, 120.37, 117.06, 87.49, 59.99, 59.82, 46.38, 46.09, 41.60, 40.54, 39.97, 39.68, 39.57, 35.41, 34.90, 27.03, 26.20, 25.95, 25.70, 25.44, 22.67, 22.53, 17.74, 17.48, 17.28, 17.16, 17.05
HRMS (ESI)	

Δικυκλική ένωση (52)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
54% για το (**52β**) 40% για το (**52γ**)	$C_{37}H_{54}O_6$	594.8211	594.3920	R*f* (**52β**) = 0.38 R*f* (**52γ**) = 0.47 Εξάνιο/AcOEt 8:2

Μέθοδος παρασκευής: Διάλυμα της (**49**) (444 mg, 0.63 mmol) σε THF (14.0 mL) ψύχεται στους 0 ^oC και προστίθεται στάγδην HF·pyr μέχρι την πλήρη κατανάλωση του (**49**). Στο μίγμα προστίθεται στάγδην κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ μέχρι την πλήρη εξουδετέρωση του οξέος και στη συνέχεια προστίθεται AcOEt και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης παρέχει τα διαστερεϊσομερή (**52β**) (202 mg) και (**52γ**) (151 mg). ως υποκίτρινα ελαιώδη υγρά.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^oC $CDCl_3$**	(**52β**) *δ:* 5.55 (1H, brs, C=C*H*-CH_2OH), 5.21 (1H, brs, C=C*H*-CH_2), 4,99 (1H, brs, $(CH_2)_2$-C*H*=C), 4.90 (1H, brs, C=C*H*-CH_2), 4.32-4.23 (2H, m, CH-CH_aH_b-OH), 3.01-2.76 (2H, m, C-CH_aH$_b$-C, C-CH_aH$_b$-CH), 2.69 (2H, m, C-CH_2=CH), 2.45 (1H, m, CH_2-CH_aH$_b$-CH) 2.40-2.28 (2H, m, C-CH$_a$$H_b$-C, C-CH$_a$$H_b$-$CH_2$)), 2.26-2.18 (1H, m, CH_2-

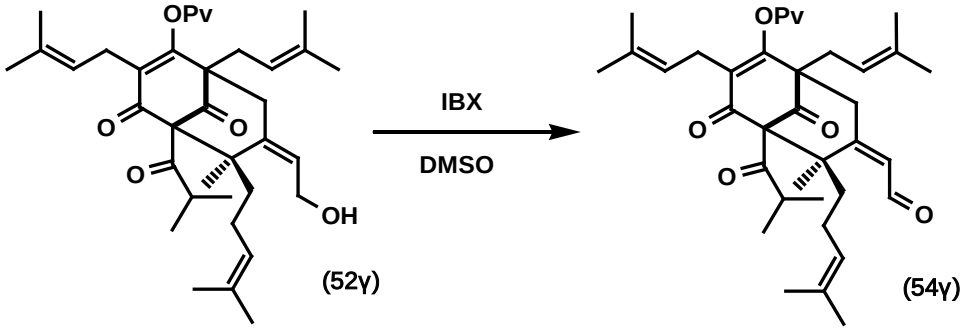
	CH_aH_b-CH), 2.01-1.87 (3H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$, C-C$H_a$$H_b$-$CH_2$, C-$CH_a$$H_b$-CH), 1.70 (6H, σειρά από s, CH_3), 1.65 (3H, s, CH_3), 1.63 (6H, σειρά από s, CH_3), 1.54 (3H, s, CH_3), 1.44 (3H, s, CH_3), 1.34 (s, 9H, -O*Pv*), 1.08 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, (CO)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$), 0.96 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, (CO)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$) (**52γ**) *δ:* 5.44 (1H, brs, C=C*H*-CH_2OH), 5.21 (1H, brs, C=C*H*-CH_2), 5.04 (1H, brs, $(CH_2)_2$-C*H*=C), 4.92 (1H, brs, C=C*H*-CH_2), 4.12 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, CH-C$H_a$$H_b$-OH), 2.95 (1H, m, C-C$H_a$$H_b$-C), 2.83 (3H, m, C-C$H_2$=CH, CH_2-C$H_a$$H_b$-C), 2.48-2.36 (3H, m, C-$CH_a$$H_b$-C, C-C$H_2$=CH), 2.31-2.21 (1H, m, CH_2-C$H_a$$H_b$-CH), 2.20-2.12 (1H, m, CH_2-$CH_a$$H_b$-CH), 2.10-2.04 (1H, m, CH_2-$CH_a$$H_b$-C), 2.03-1.97 (1H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$), 1.69 (6H, σειρά από s, CH_3), 1.66 (6H, σειρά από s, CH_3), 1.62 (3H, s, CH_3), 1.58 (3H, s, CH_3), 1.33 (9H, s, -O*Pv*), 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.04 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, (CO)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$), 0.96 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, (CO)-CH-(CH_3)$_a$(CH_3)$_b$)
^{13}C NMR	(**52β**) *δ:* 208.25, 203.78, 193.10, 174.89, 162.60, 137.74, 135.17, 134.01, 133.64, 133.34, 131.55, 123.82, 119.88, 118.77, 82.58, 59.87, 58.17, 53.75, 44.50, 42.77, 39.63, 34.46, 29.68, 28.36, 27.14, 25.72, 25.61, 25.57, 23.81, 23.10, 20.54, 20.10, 18.08, 18.05, 17.90, 17.52 (**52γ**) *δ:* 208.40, 203.64, 193.38, 175.03, 161.90, 135.31, 135.13, 134.23, 134.05, 133.76, 131.94, 123.68, 119.78, 118.71, 82.40, 59.71, 58.63, 52.33, 44.73, 42.64, 39.63, 31.58, 29.68, 28.53, 27.13, 25.79, 25.67, 25.57, 23.83, 23.68, 20.73, 20.04, 19.76, 18.04, 17.95, 17.89
HRMS (ESI)	

Δικυκλική ένωση (54β)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
98%	$C_{37}H_{52}O_6$	592.8052	592.3764	R*f* (**54β**) = 0.65 Εξάνιο/AcOEt 8:2

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της (**52β**) (234 mg, 0.40 mmol) σε DMSO (9 mL) προστίθεται IBX (223 mg, 0.80 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους 25 ^oC για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και το μίγμα διηθείται από celite. Στο διήθημα προστίθεται AcOEt (5 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης παρέχει την (**54β**) (232 mg) ως υποκίτρινο ελαιώδες υγρό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 10.09 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, CH-C(O)*H*), 6.02 (1H, brs, C=C*H*-C(O)H), 5.22 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.99 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.81 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 3.06-2.7 (4H, m, CH-C*H*$_2$-C, C-CH_aH_b-C), 2.54-2.35 (4H, m, CH-C*H*$_2$-C, CH-*C*H_aH_b-CH_2), 2.10-1.89 (3H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$, C-C$H_aH_b$$CH_2$), 1.72 (6H, brs, C*H*$_3$), 1.66 (3H, s, C*H*$_3$), 1.63 (3H, s, C*H*$_3$), 1.60 (3H, s, C*H*$_3$), 1.52 (3H, s, C*H*$_3$), 1.35 (s, 9H, -O*Pv*), 1.12 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, C(O)-CH-(C*H*$_3$)$_a$$(CH_3)_b$), 0.99 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, C(O)-CH-

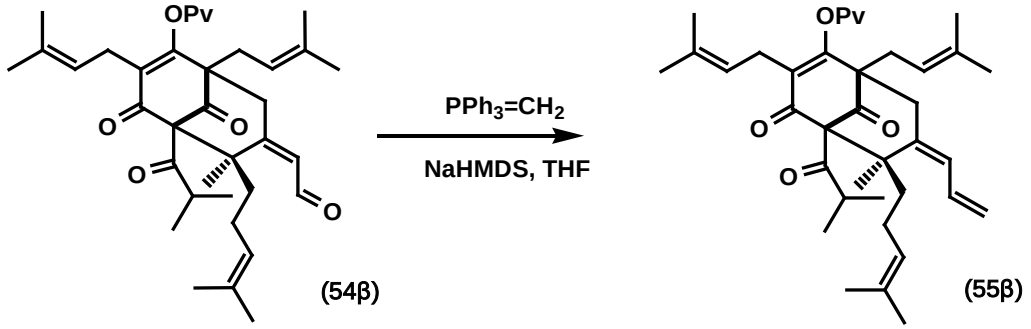
	$(CH_3)_a(CH_3)_b)$
^{13}C NMR	*δ:* 207.66, 202.40, 192.12, 191.53, 162.76, 154.07, 136.90, 136.08, 134.41, 133.59, 132.20, 123.02, 119.33, 118.09, 82.29, 57.70, 55.10, 44.56, 43.01, 34.51, 29.65, 28.27, 27.08, 25.74, 25.58, 25.48, 23.65, 23.09, 21.23, 20.64, 20.11, 18.06, 17.87, 17.52
HRMS (ESI)	

Δικυκλική ένωση (54γ)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
93%	$C_{37}H_{52}O_6$	592.8052	592.3764	R*f* (**54γ**) = 0.63 Εξάνιο/AcOEt 8:2

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της (**52γ**) (239 mg, 0.40 mmol) σε DMSO (9 mL) προστίθεται IBX (225 mg, 0.80 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους 25 ^oC για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ και το μίγμα διηθείται από celite. Στο διήθημα προστίθεται AcOEt (5 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης παρέχει την (**54γ**) (220 mg) ως υποκίτρινο ελαιώδες υγρό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 9.69 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, CH-C(O)*H*), 5.87 (1H, brs, C=C*H*-C(O)H), 5.20 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.99 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 4.78 (1H, m, C=C*H*-CH_2), 3.00-2.76 (3H, m, CH-C*H*$_2$-C, C-C*H*$_a$H$_b$-C), 2.54-2.28 (4H, m, CH-C*H*$_2$-C, C-CH$_a$*H*$_b$-C, CH_2-C*H*$_a$H$_b$-C), 2.20 (1H, m, CH_2-CH$_a$*H*$_b$-C), 2.09-1.95 (2H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$, CH-C*H*$_a$H$_b$-CH_2), 1.87 (1H, m, CH-CH$_a$*H*$_b$-CH_2), 1.71 (3H, brs, C*H*$_3$), 1.66 (3H, s, C*H*$_3$), 1.64 (3H, s, C*H*$_3$), 1.62

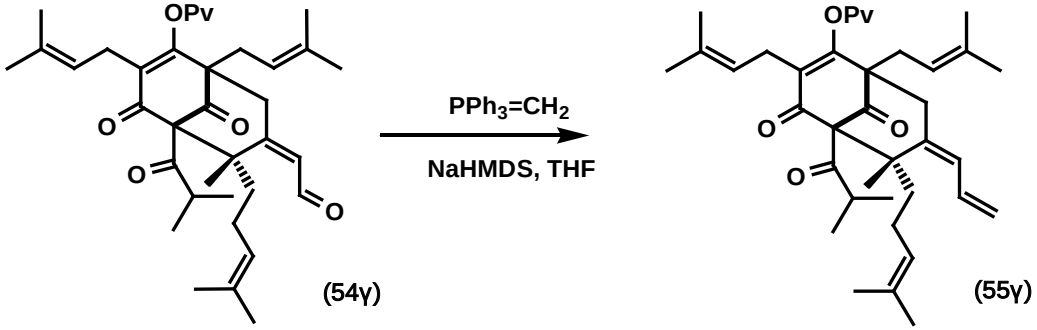
	(3H, s, C*H₃*), 1.59 (3H, s, C*H₃*), 1.54 (3H, s, C*H₃*), 1.39 (3H, s, C*H₃*), 1.33 (9H, s, -O*Pv*), 1.07 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, C(O)-CH-(C*H₃*)$_a$(CH$_3$)$_b$), 0.99 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, C(O)-CH-(CH$_3$)$_a$(C*H₃*)$_b$)
^{13}C NMR	*δ:* 207.93, 202.40, 192.56, 191.55, 175.00, 162.24, 152.65, 135.97, 134.34, 133.92, 132.67, 122.52, 119.36, 118.06, 82.35, 58.18, 53.52, 44.79, 42.93, 39.60, 32.89, 28.46, 27.08, 25.82, 25.65, 25.45, 23.63, 22.83, 20.99, 20.19, 19.81, 18.06, 17.88
HRMS (ESI)	

Δικυκλική ένωση (55β)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
85%	$C_{38}H_{54}O_5$	590.8324	590.3971	R*f* (**55β**) = 0.54 Εξάνιο/AcOEt 9:1

Μέθοδος παρασκευής: Διάλυμα του υλιδίου $PPh_3{=}CH_2$ (62 mg, 0.172 mmol), σε THF (0.03 mL) ψύχεται στους 0 ^oC και κατόπιν προστίθεται NaHMDS (1 M σε THF, 0.02 mL, 0.141 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα της αλδεΰδης (**54β**) (60 mg, 0.101 mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 15 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (15 mL), προστίθεται AcOEt (15 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 6.38 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 6.07 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.16 (3H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.00 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 4.38 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 2.93-2.78 (2H, m, CH-CH_2-C), 2.78-2.68 (1H, m, CH-CH_aH_b-CH_2), 2.55-2.42 (2H, m, CH-CH_2-C), 3.39-2.35 (2H, m, CH_2-CH_aH_b-C), 2.29-2.23 (2H, m, CH-CH_aH_b-CH_2, C-CH_aH_b-C), 1.98 (1H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$), 1.91 (2H, m, C-CH_aH_b-C), 1.72-1.50 (18H, s, CH_3), 1.34 (12H, s, -O*Pv,*

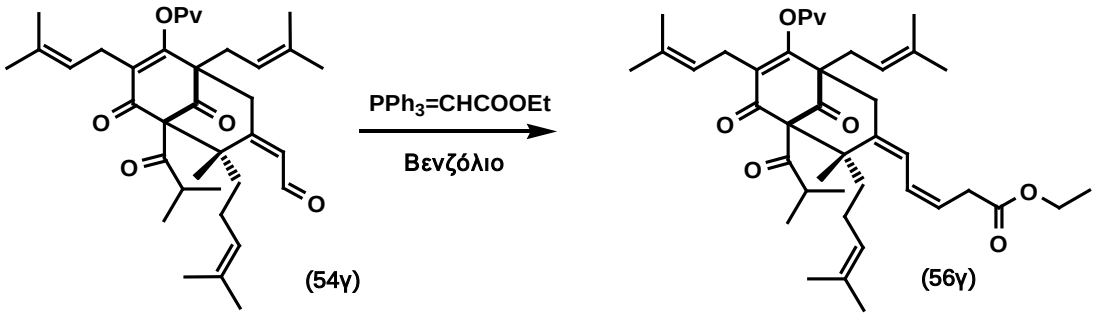
	C*H*$_3$), 1.07 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, C(O)-CH-(C*H*$_3$)$_a$(CH$_3$)$_b$), 0.96 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, C(O)-CH-(CH$_3$)$_a$(C*H*$_3$)$_b$)
^{13}C NMR	*δ:* 208.80, 203.88, 192.79, 180.16, 174.98, 161.80, 135.04, 134.47, 134.01, 133.60, 133.34, 132.77, 131.50, 123.90, 122.04, 120.00, 118.82, 58.69, 52.97, 52.82, 45.18, 45.10, 42.61, 31.73, 29.68, 28.53, 27.13, 25.77, 25.38, 23.59, 23.41, 21.23, 20.08, 19.82, 18.05, 17.92
HRMS (ESI)	

Δικυκλική ένωση (55γ)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
90%	$C_{38}H_{54}O_5$	590.8324	590.3971	R*f* (**55γ**) = 0.83 Εξάνιο/AcOEt 8:2

Μέθοδος παρασκευής: Διάλυμα του υλιδίου $PPh_3{=}CH_2$ (42 mg, 0.057 mmol), σε THF (0.023 mL) ψύχεται στους 0 ^oC και κατόπιν προστίθεται NaHMDS (1 M σε THF, 0.01 mL, 0.048 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα της αλδεΰδης (**55γ**) (40 mg, 0.034 mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για επιπλέον 15 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (10 mL), προστίθεται AcOEt (10 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt (3 x 10 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 6.52 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.93 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.23 (3H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.00 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 4.84 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 3.01-2.78 (3H, m, CH-CH_2-C, CH-CH_aH_b-CH_2), 2.55-2.40 (2H, m, CH-CH_2-C), 2.20-2.00 (4H, m, CH_2-CH_aH_b-C, 1H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$, CH-CH_aH_b-CH_2,), 1.98-1.90 (3H, m, C-CH_aH_b-C, C-CH_aH_b-C), 1.78-1.530 (18H, s, CH_3), 1.34-1.26 (12H, s, -O*Pv,* CH_3), 1.06 (3H, d, *J* = 6.3 Hz,

	C(O)-CH-(CH_3)$_a$(CH$_3$)$_b$), 0.97 (3H, d, J = 6.4 Hz, C(O)-CH-(CH$_3$)$_a$(CH_3)$_b$)
^{13}C NMR	*δ:* 208.76, 203.92, 192.78, 174.99, 161.79, 135.02, 134.47, 134.09, 133.59, 133.33, 132.76, 131.49, 123.89, 122.03, 119.99, 118.82, 82.68, 58.69, 52.96, 45.20, 42.61, 39.58, 34.71, 31.73, 29.68, 28.55, 27.12, 25.75, 25.38, 23.59, 23.41, 21.23, 20.08, 19.82, 18.04, 17.91
HRMS (ESI)	

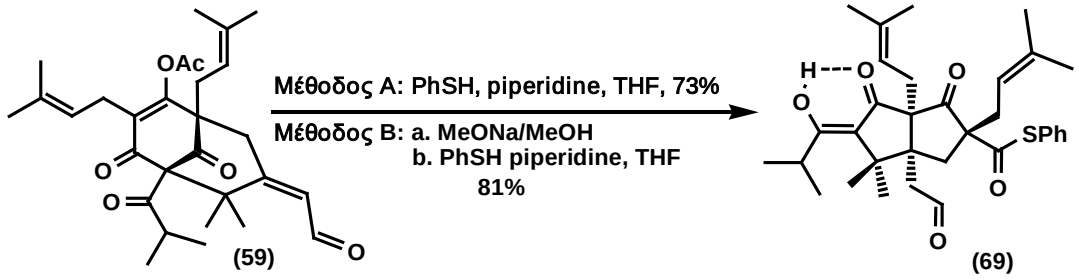
Δικυκλική ένωση (56γ)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
81%	$C_{41}H_{58}O_7$	662.8950	662.4183	R*f* = 0.36 Τολουόλιο/ Εξάνιο 5:5

Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της (**54γ**) (50 mg, 0.084 mmol) σε βενζόλιο (1mL) προστίθεται το υλίδιο PPh_3=CHCOOEt (35mg, 0.10 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στους 25 ^oC για 30 περίπου λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (15 mL), προστίθεται AcOEt (15 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 ^{o}C $CDCl_3$**	*δ:* 7.40 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 6.07(1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.80 (3H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 5.21 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 4.78 (1H, m, C=C*H*-$(CH_2)_2$), 4.18 (1H, m, $OCH_aH_bCH_3$), 2.86 (2H, m, CH-CH_2-C), 2.44 (1H, m, CH-CH_aH_b-CH_2), 2.40 (1H, m, CH-CH_aH_b-CH_2), 2.19-2.10 (3H, m, CH-CH_2-C, CH_2-CH_aH_b-C,), 2.00 (1H, m, C(O)-C*H*-$(CH_3)_2$), 1.80 (2H, m, C-CH_aH_b-C, C-CH_aH_b-C), 1.70-1.50 (18H, s, CH_3), 1.34-1.25 (15H, s, -O*Pv,* CH_3, $OCH_aH_bCH_3$), 1.06 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, C(O)-CH-

	$(CH_3)_a(CH_3)_b$), 0.98 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, C(O)-CH-$(CH_3)_a(CH_3)_b$)
^{13}C NMR	*δ:* 208.39, 203.60, 192.48, 175.34, 166.46, 161.88, 142.16, 139.39, 135.36, 134.05, 133.74, 132.02, 131.17, 126.18, 123.21, 119.59, 118.51, 82.72, 60.32, 58.57, 53.40, 45.29, 42.74, 39.59, 31.53, 29.66, 28.56, 27.10, 25.79, 25.74, 25.40, 23.63, 23.42, 21.16, 20.16, 19.83, 18.04, 17.85, 17.81, 14.31
HRMS (ESI)	

Δικυκλική ένωση (69)

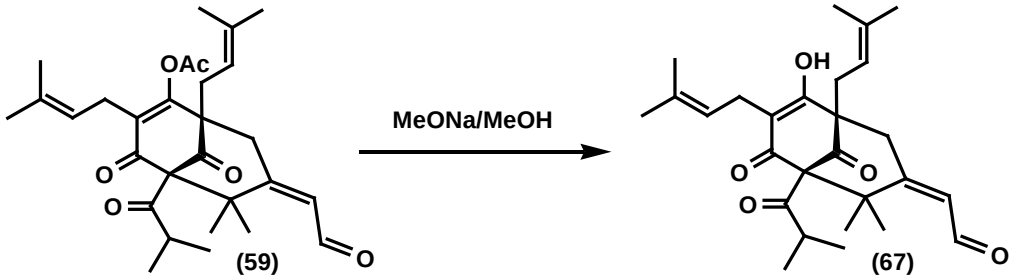


Απόδοση	**Μ.Τ.**	**Μ.Β.**	**Μ.Β.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
Α: 73% Β: 81%	$C_{33}H_{42}O_5S$	550.75	550.28	R*f* = 0.25 Εξάνιο/AcOEt 8:2

Μέθοδος παρασκευής Α: Σε διάλυμα της (**59**) (14 mg, 0.029 mmol) σε THF (0.1 mL) προστίθεται PhSH (0.02 mL, 0.0019 mmol) και κατόπιν πιπεριδίνη (0.0015 mL, 0.015 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 30 περίπου λεπτά. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και χρωματογραφία στήλης για να προκύψει σε καθαρή μορφή η (**69**) (12 mg) ως υποκίτρινο στερεό.

Β: Σε διάλυμα της (**59**) (100 mg, 0.21 mmol) σε MeOH (1.5 mL) προστίθεται MeONa (28 mg, 0.52 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 20 περίπου λεπτά. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. και προστίθεται THF (3 mL), PhSH (0.22 mL, 2.1 mmol) και πιπεριδίνη (0.03 mL, 0.315 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 30 περίπου λεπτά. Στη συνέχεια, στο μίγμα προστίθεται AcOEt και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt (2 x 10 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και χρωματογραφία στήλης για να προκύψει σε καθαρή μορφή η (**69**) (94 mg) ως υποκίτρινο στερεό.

^{1}H NMR (500 MHz) **25 °C $CDCl_3$**	*δ:* 14.96 (brs, 1H; -O*H*), 9.84 (brs, 1H; -C*H*O), 5.08 (bs, 1H; (CH3)2C=C*H*-), 4.91 (brs, 1H; $(CH_3)_2C=CH$-), 3.16 (d, ^{2}J =15.4 Hz, 1H; -C-CH_aH$_b$-C-), 3.10 (dd, ^{2}J =14.4 Hz, ^{3}J =4.7 Hz, 1H; $(CH_3)_2C=CH$-CH_aH$_b$-), 2.81-2.69 (m, 3H; C=C(OH)C*H*$(CH_3)_2$, $(CH_3)_2C=CH$-CH_aH$_b$-, -CH_aH$_b$CHO), 2.59 (dd, ^{2}J =14.5 Hz, ^{3}J =7.0 Hz, 1H; $(CH_3)_2C=CH$-CH$_a$$H_b$-), 2.54 (d, ^{2}J =15.4 Hz, 1H; -CH$_a$$H_b$CHO), 2.47 (dd, ^{2}J =15.1 Hz, ^{3}J =7.1 Hz, 1H; $(CH_3)_2C=CH$-CH$_a$$H_b$-), 1.90 (d, ^{2}J =15.4 Hz, 1H; -C-CH$_a$$H_b$-C), 1.699-1.54 (four broad singlets overlapping, 12H; $(CH_3)_2C=CH$), 1.46 (brs, 3H; -C(CH_3)$_a$$(CH_3)_b$), 1.26 (brs, 3H; -C$(CH_3)_a$(C$H_3$)$_b$), 1.17 (d, ^{3}J = 6.0 Hz, 3H;-C=C(OH)CH(CH_3)$_a$$(CH_3)_b$), 1.12 (d, ^{3}J =6.0 Hz, 3H;-C=C(OH)CH$(CH_3)_a$(CH_3)$_b$)
^{13}C NMR	*δ:* 206.6, 201.0, 198.0, 196.3, 189.1, 136.5, 135.1, 135.0, 133.7, 129.6, 129.3, 127.7, 120.8, 117.8, 117.1, 116.8, 73.0, 68.5, 51.8, 47.1, 45.4, 36.4, 35.5, 32.0, 31.4 28.8, 26.2, 26.0, 25. 9, 20.0, 19.6, 18.4, 18.2
HRMS (ESI)	(ESI): m/z calcd for $C_{33}H_{42}O_5S$ [*M*+Na]$^{+}$: 573.2645; found: 573.2654.
Mp (°C)	125 °C

Δικυκλική ένωση (67)				
				
Απόδοση	**M.T.**	**M.B.**	**M.B.** (μονοϊσοτοπικό)	**TLC**
	$C_{27}H_{36}O_5$	440.57	440.26	R*f* = 0.45 Εξάνιο/AcOEt 1:1

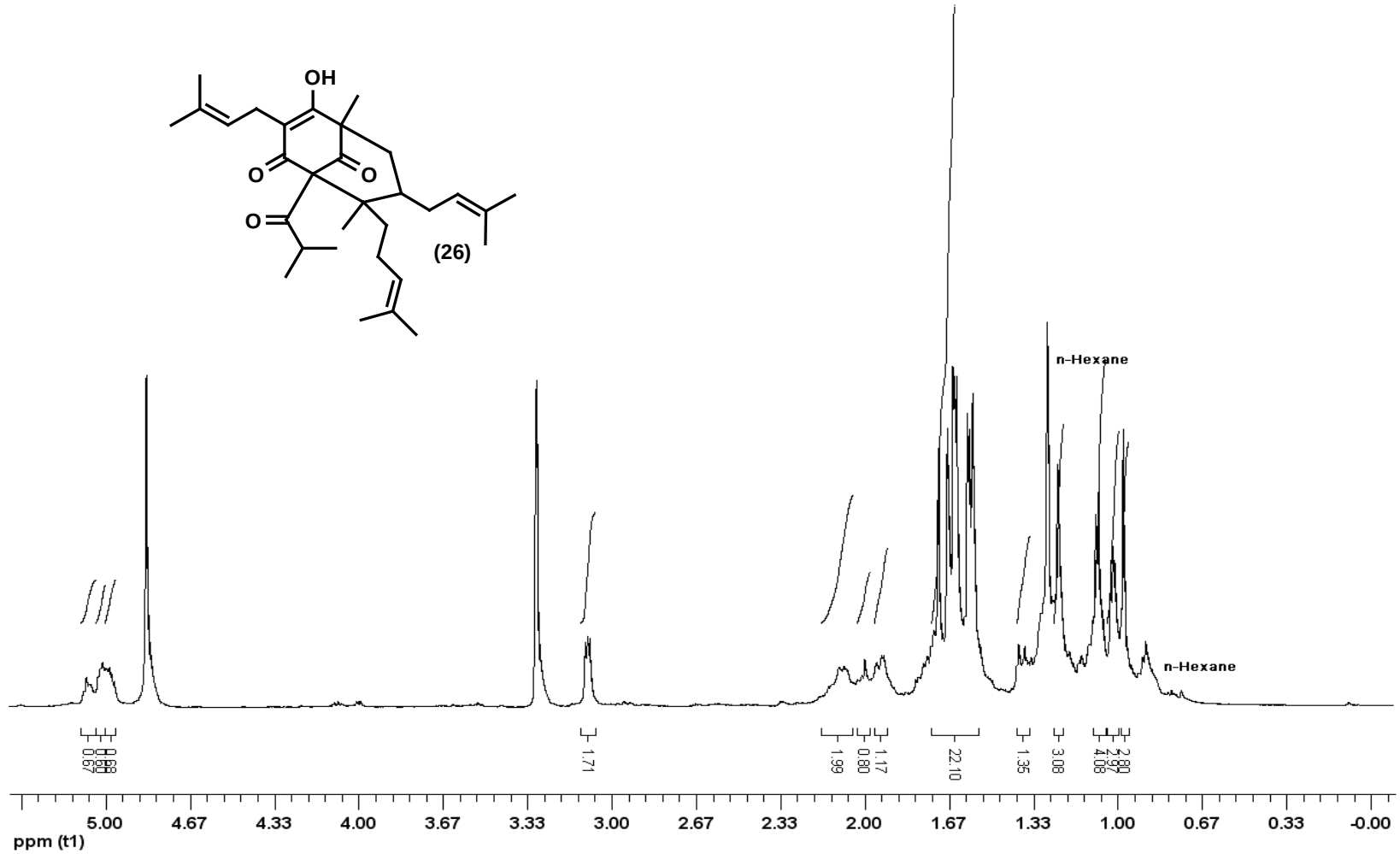
Μέθοδος παρασκευής: Σε διάλυμα της (**59**) (35 mg, 0.07 mmol) σε MeOH (0.5 mL) προστίθεται MeONa (10 mg, 0.18 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 20 περίπου λεπτά. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Στη συνέχεια, στο μίγμα προστίθεται AcOEt και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt (2 x 10 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση και χρωματογραφία στήλης για να προκύψει σε καθαρή μορφή η (**67**). Μετά την αποπροστασία της ένωσης και λόγω της ευαισθησίας της, το μόριο χαρακτηρίστηκε με ^{1}H NMR.

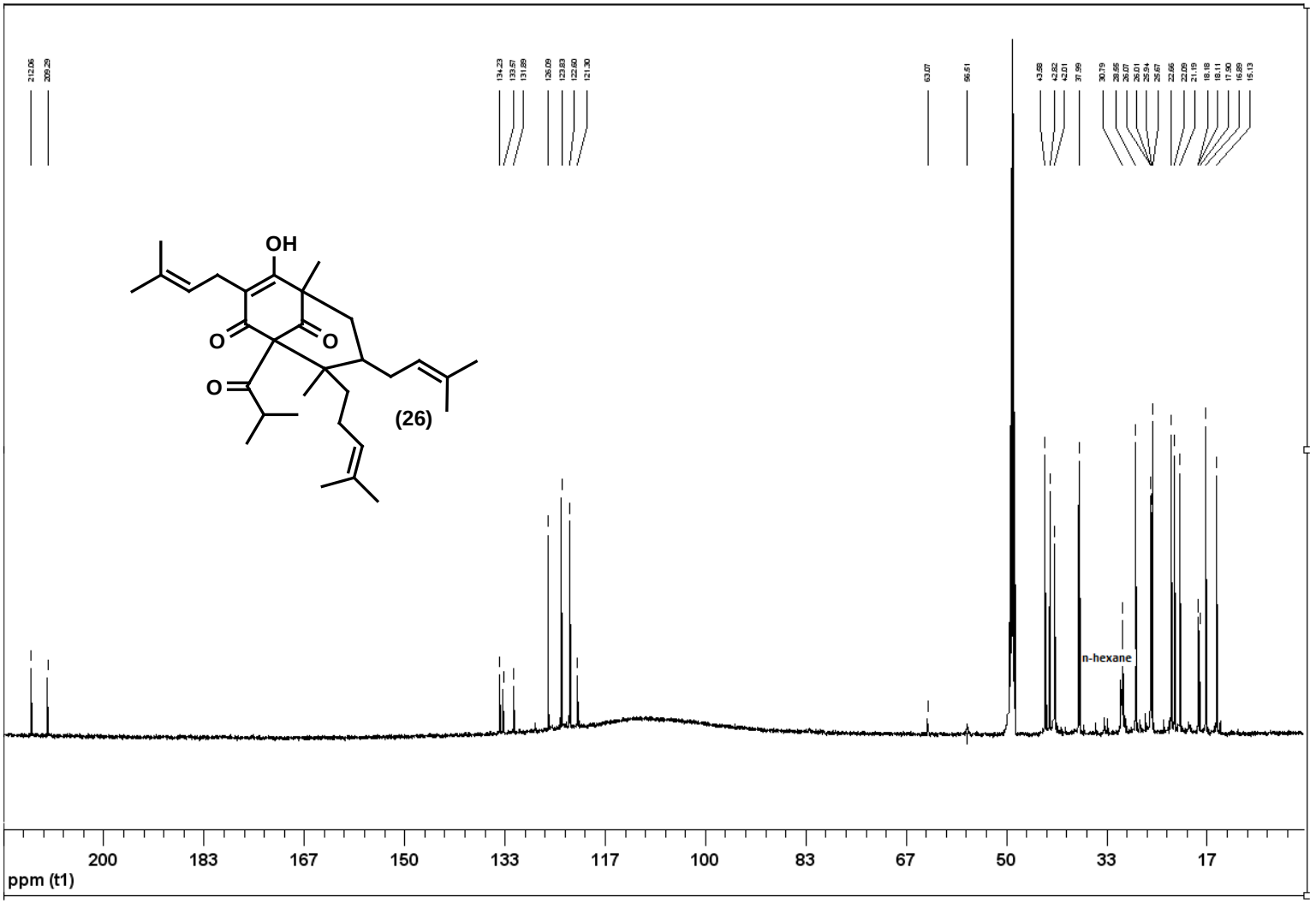
^{1}H NMR (500 MHz) **25 °C CD_3OD**	*δ:* 10.16 (d, ^3J =7.4 Hz, 1H; -C*H*O), 5.68 (d, ^3J =7.4 Hz, 1H; -C=C*H*-CHO), 5.10 (broad t, 1H; $(CH_3)_2C$=C*H*-), 4.85 (broad triplet overlapping with CD_3OD signal, 1H; $(CH_3)_2C$=C*H*-), 3.05-2.94 (m, 4H; $(CH_3)_2C$=CH-C*H*$_2$,$(CH_3)_2C$=CH-C*H*$_a$H$_b$-, -C-C*H*$_a$H$_b$-C-), 2.48 (m, 1H; $(CH_3)_2C$=CH-CH$_a$*H*$_b$-), 2.35 (d, ^2J =14.7 Hz, 1H; -C-CH$_a$*H*$_b$-C-), 2.22 (m, 1H; -COC*H*$(CH_3)_2$), 1.79-1.61 (four singlets overlapping, 12H; (C*H*$_3$)$_2$C=CH-), 1.56 (s, 3H; -C(C*H*$_3$)$_a$(CH$_3$)$_b$), 1.41 (s, 3H; -C(CH$_3$)$_a$(C*H*$_3$)$_b$),

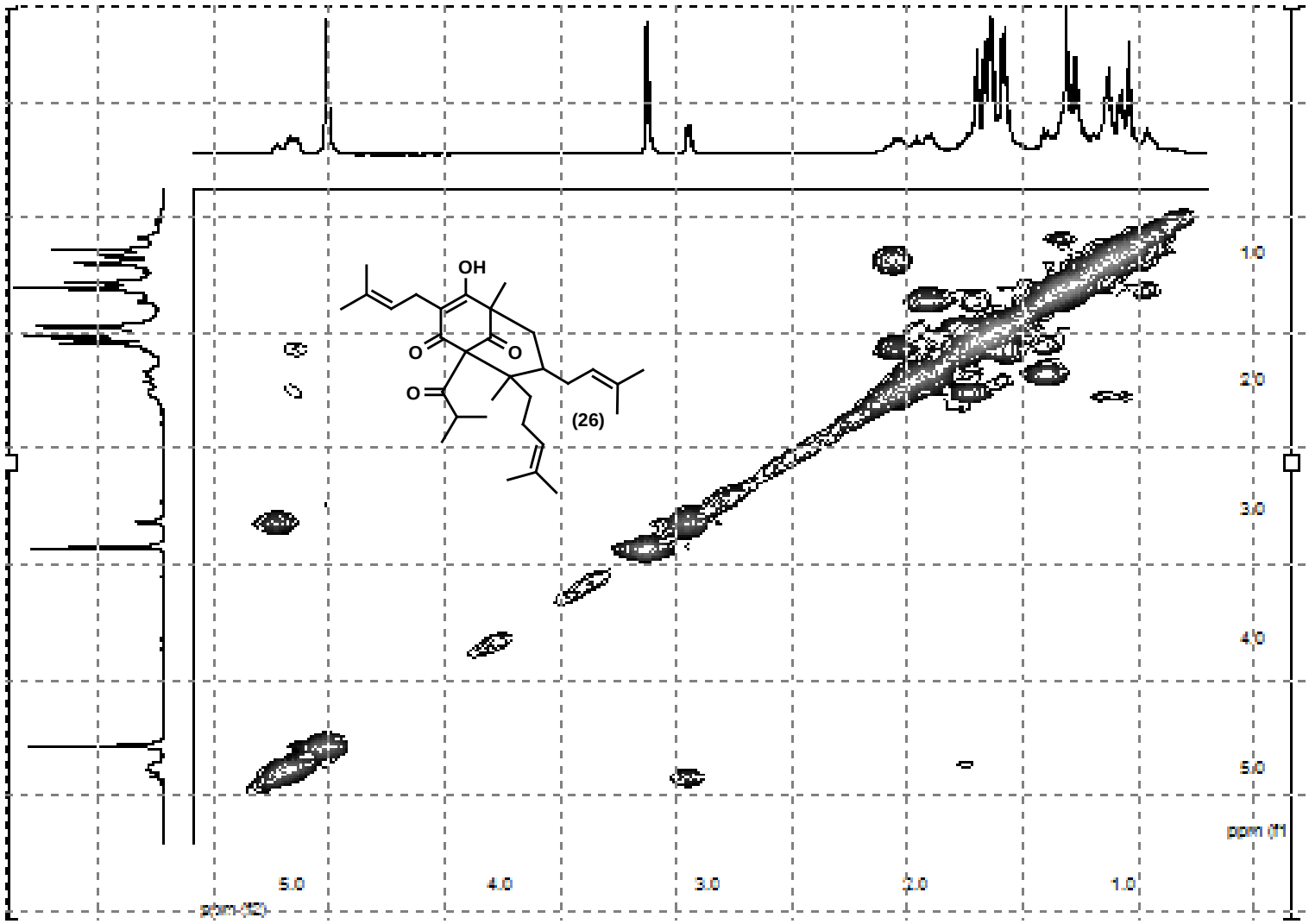
	1.11 (d, ^{3}J = 6.3 Hz, 3H; -COCH(CH_3)$_a$(CH$_3$)$_b$), 1.05 (d, ^{3}J = 6.3 Hz, 3H; -COCH(CH$_3$)$_a$(CH_3)$_b$)
^{13}C NMR	
HRMS (ESI)	MS (ESI): m/z calcd for $C_{27}H_{36}O_5$ [*M*+Na]$^+$ found: 463.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

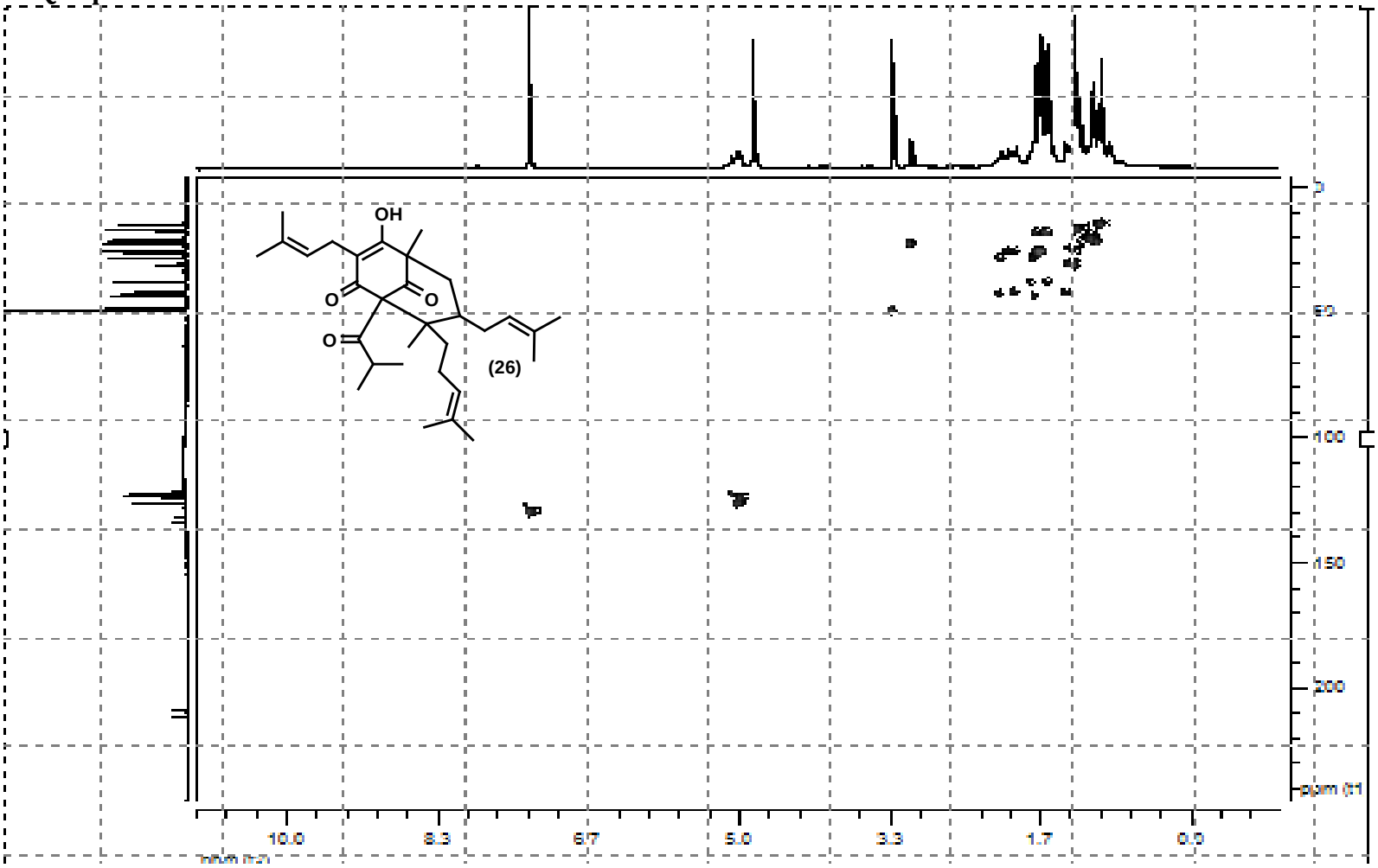
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι


OH
O
O
O
(26)
n-Hexane
n-Hexane
0.67
0.68
0.68
0.87
1.71
1.99
0.80
1.17
22.10
1.35
3.08
2.80
2.97
4.08
5.00
4.67
4.33
4.00
3.67
3.33
3.00
2.67
2.33
2.00
1.67
1.33
1.00
0.67
0.33
-0.00
ppm (t1)

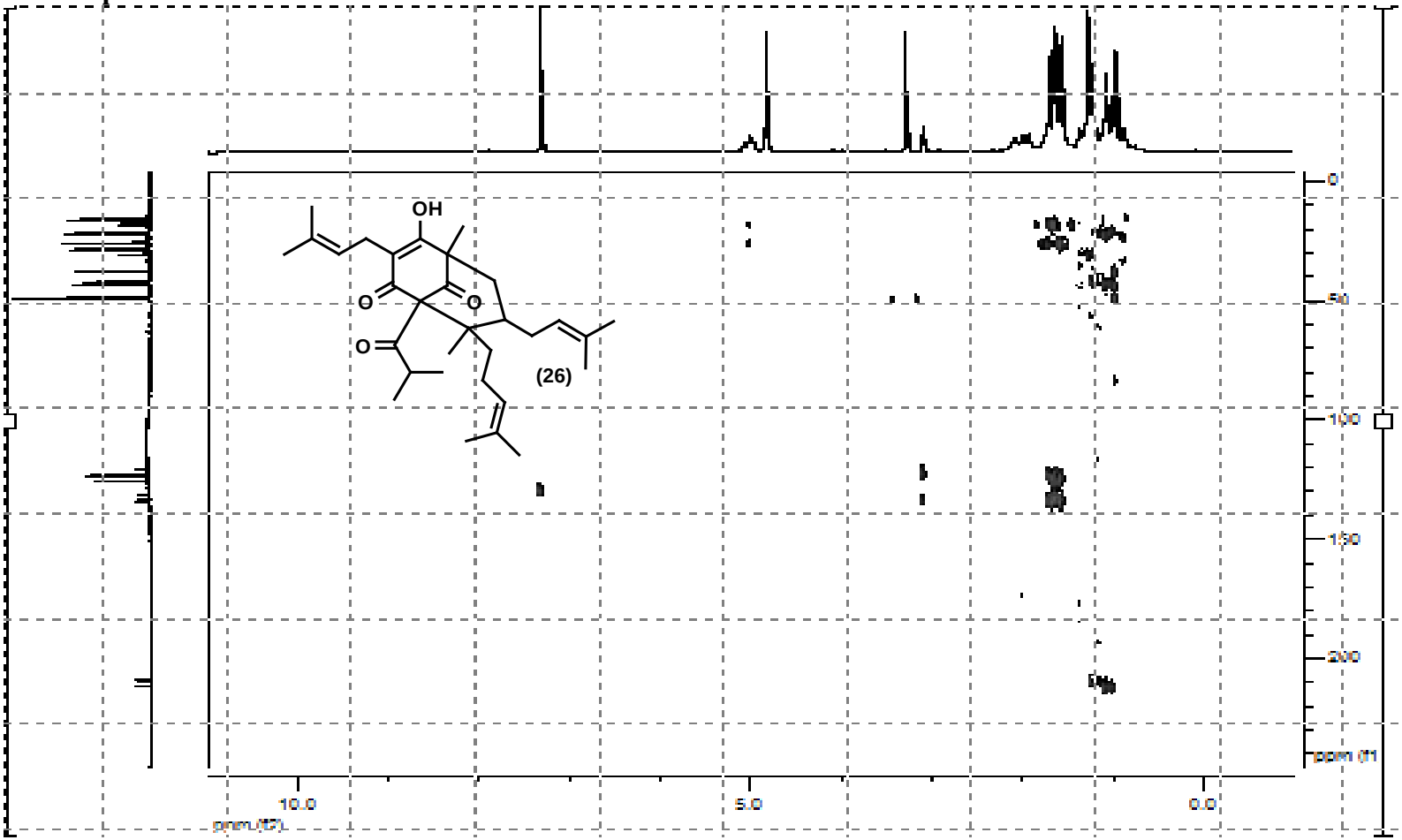

212.06
209.29
134.23
133.57
131.89
126.09
123.83
122.60
121.30
63.07
56.51
43.58
42.82
42.01
37.99
30.79
28.55
26.07
26.01
25.94
25.67
22.66
22.09
21.19
18.18
18.11
17.90
16.89
15.13
OH
O
O
O
(26)
n-hexane
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
ppm (t1)


OH
O
O
O
(26)
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
ppm (f1
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
p(pm-(f2)

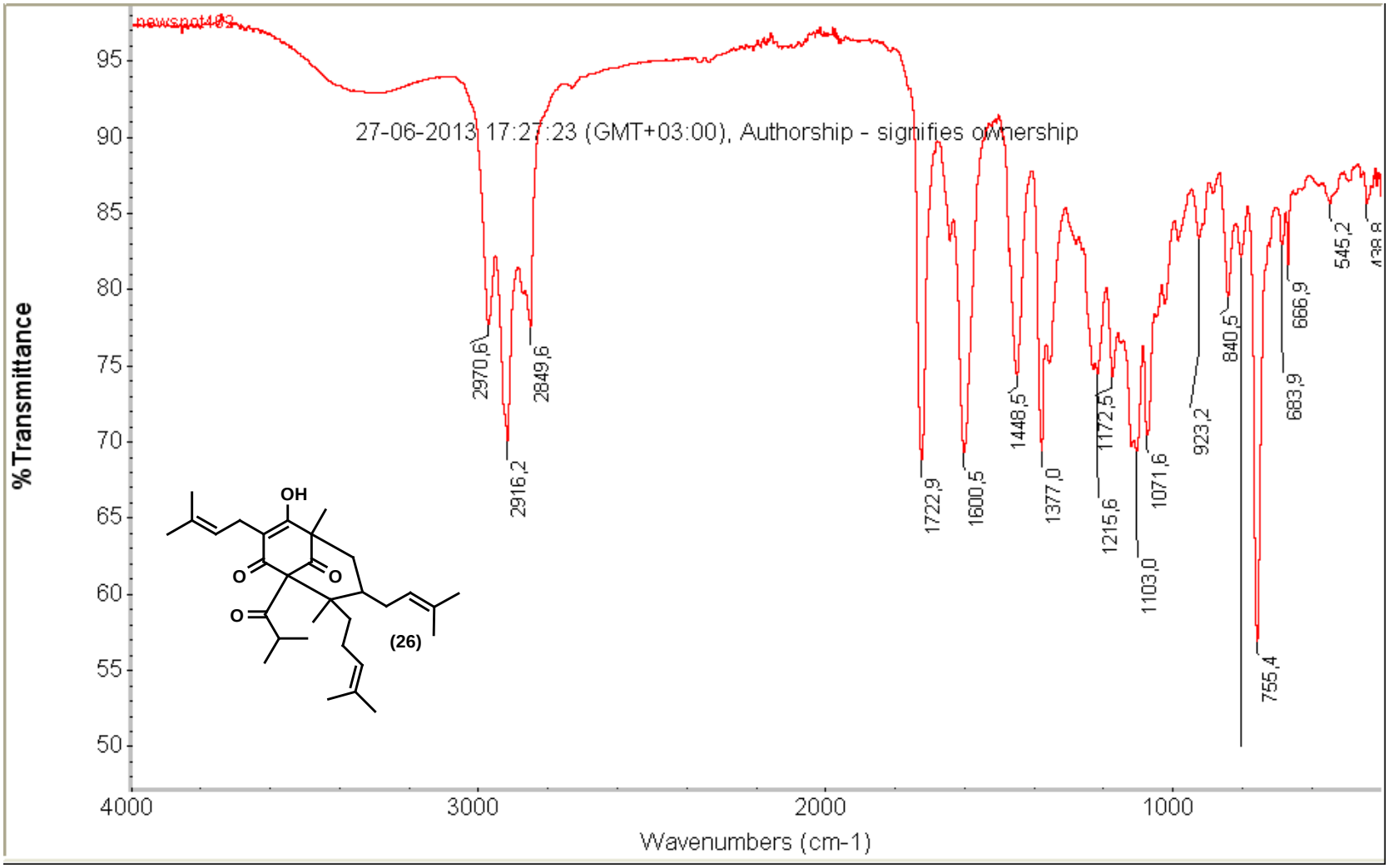
HSQC spectrum

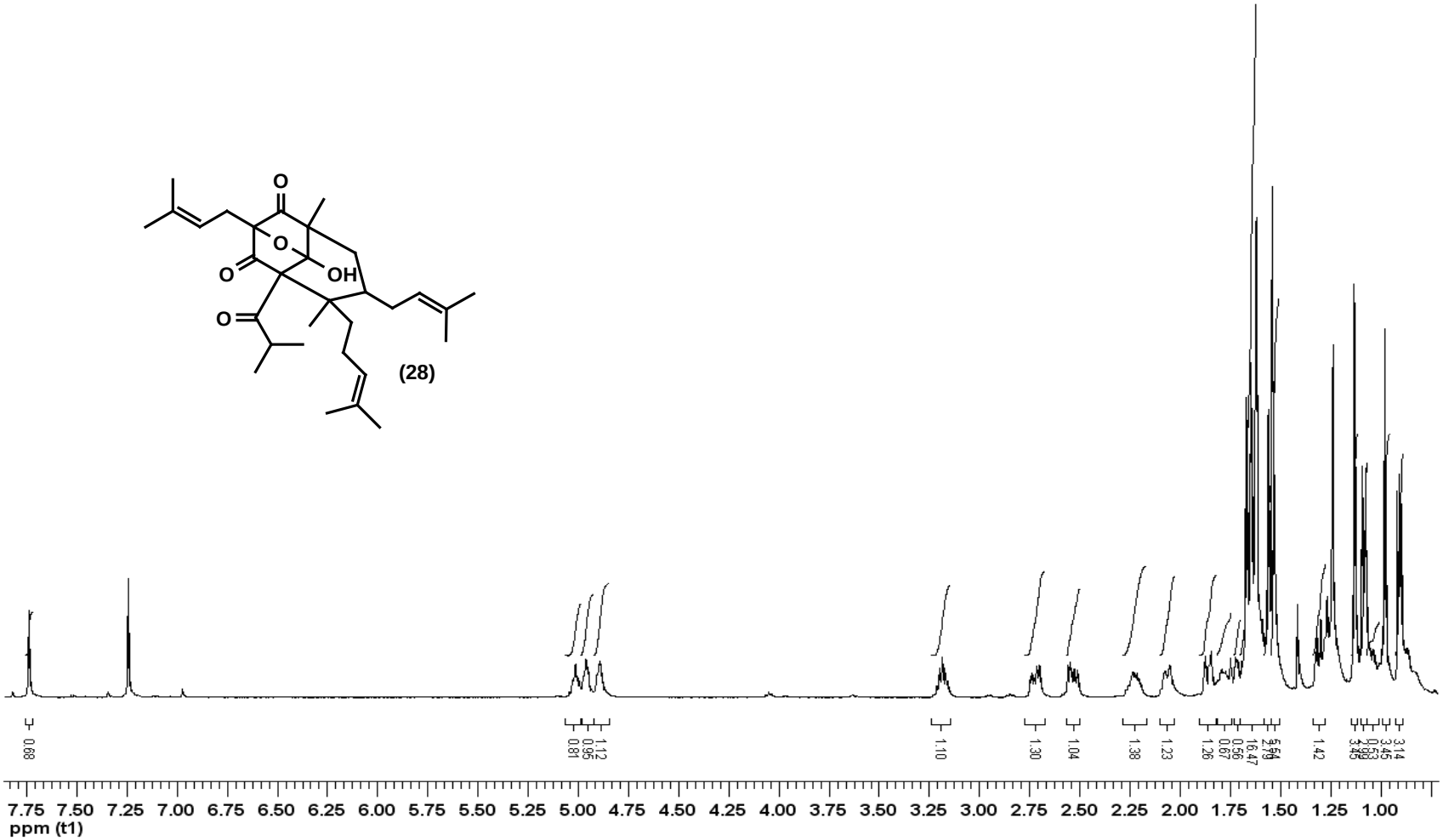


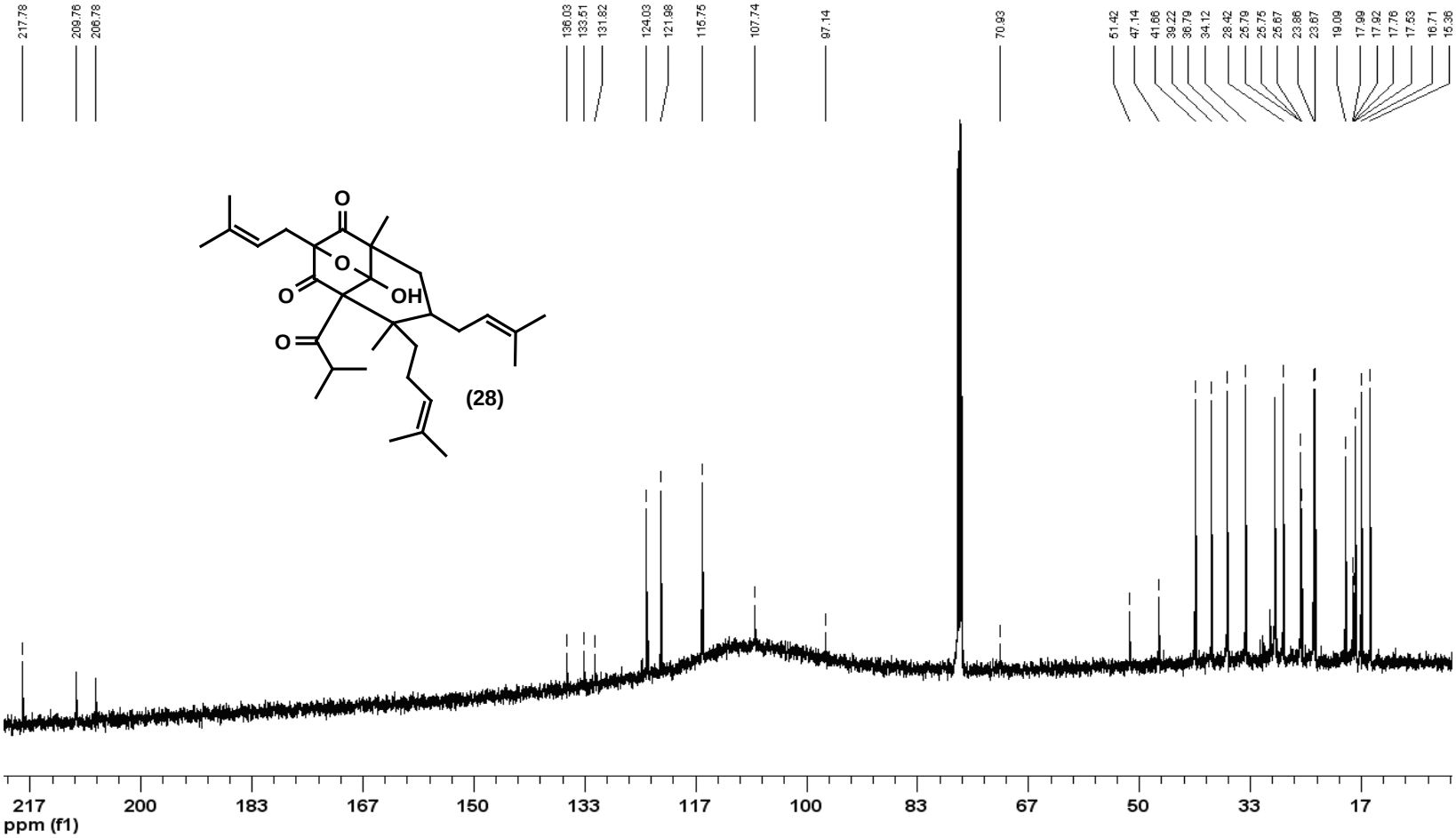
HMBC spectrum

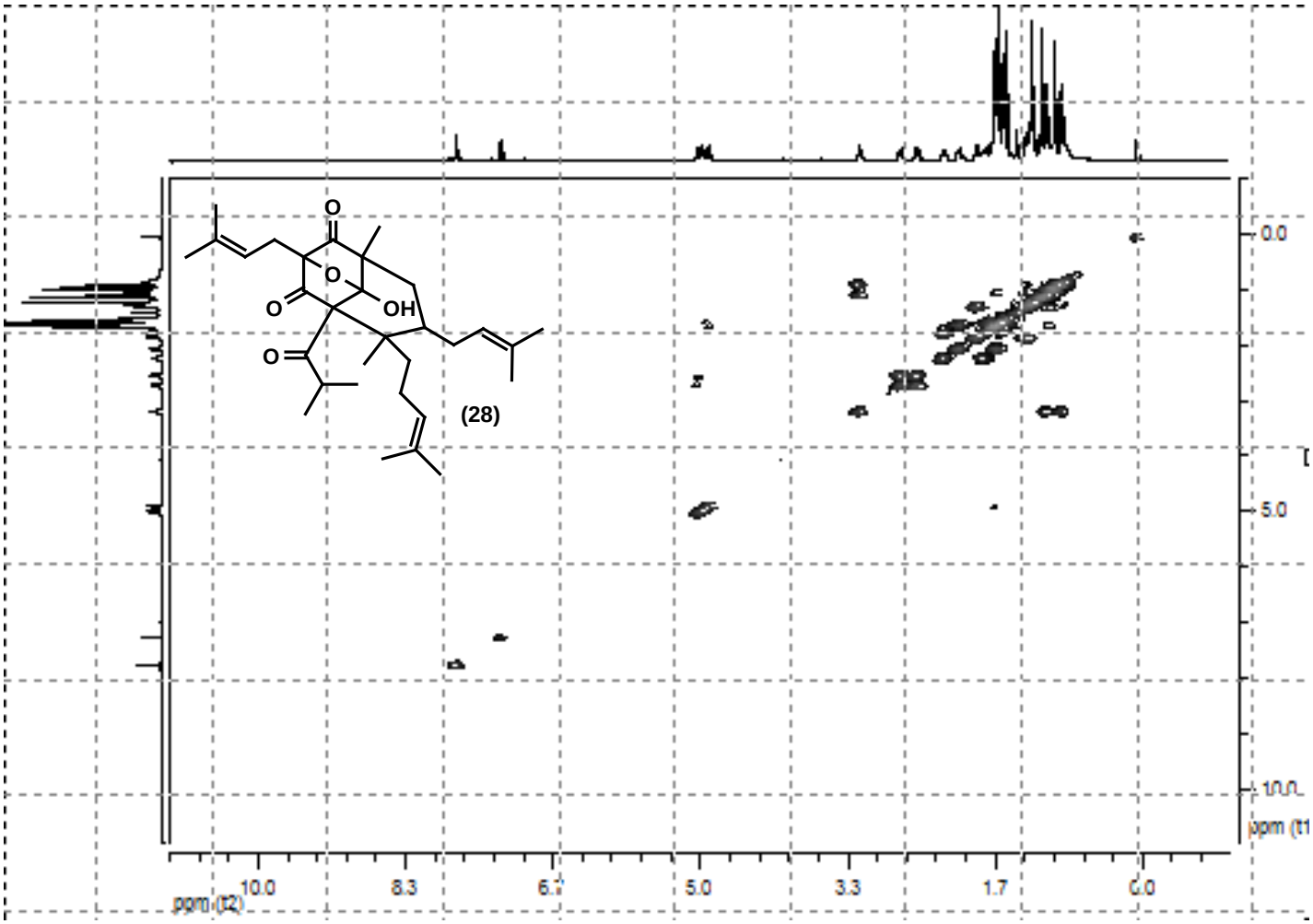


IR

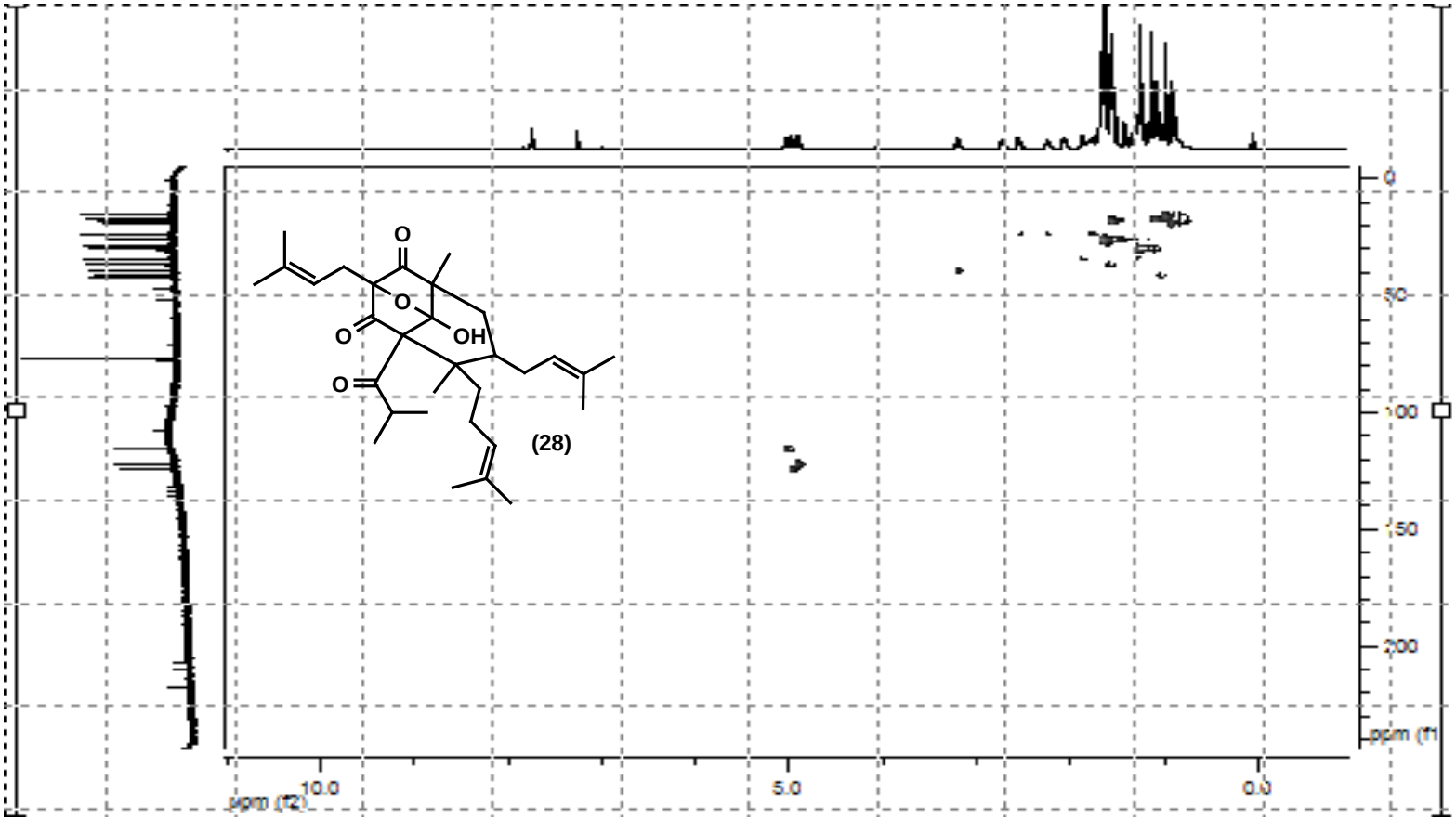

newspot402
27-06-2013 17:27:23 (GMT+03:00), Authorship - signifies ownership
%Transmittance
95
90
85
80
75
70
65
60
55
50
4000
3000
2000
1000
Wavenumbers (cm-1)
2970,6
2916,2
2849,6
1722,9
1600,5
1448,5
1377,0
1215,6
1172,5
1103,0
1071,6
923,2
840,5
755,4
683,9
666,9
545,2
OH
O
O
O
(26)


O
O
O
OH
O
(28)
0.68
0.81
0.95
1.12
1.10
1.30
1.04
1.38
1.23
1.26
0.67
0.56
16.47
1.42
3.45
3.14
7.75 7.50 7.25 7.00 6.75 6.50 6.25 6.00 5.75 5.50 5.25 5.00 4.75 4.50 4.25 4.00 3.75 3.50 3.25 3.00 2.75 2.50 2.25 2.00 1.75 1.50 1.25 1.00
ppm (t1)

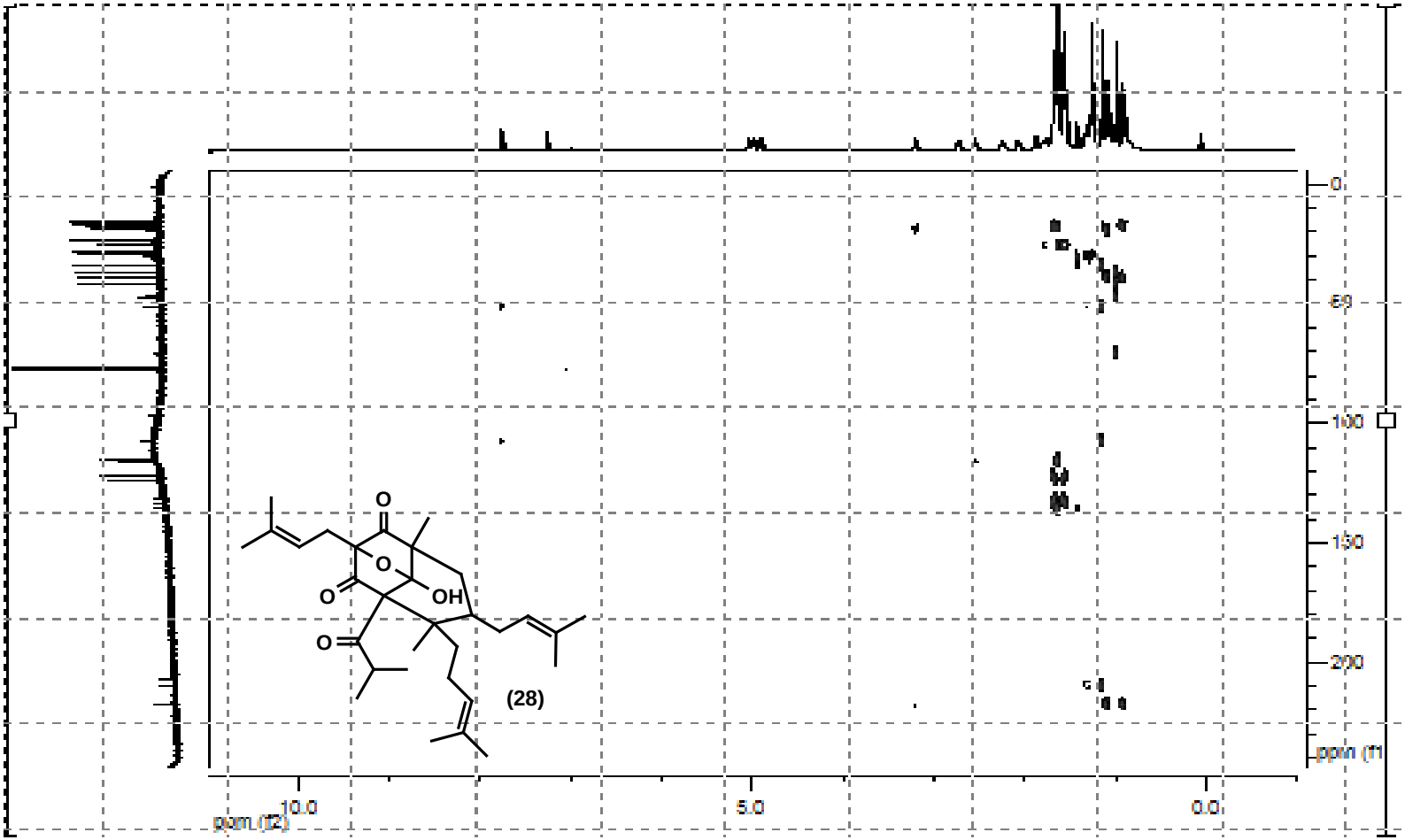

217.78
209.76
206.78
136.03
133.51
131.82
124.03
121.98
115.75
107.74
97.14
70.93
51.42
47.14
41.66
39.22
36.79
34.12
28.42
25.79
25.75
25.67
23.86
23.67
19.09
17.99
17.92
17.76
17.53
16.71
15.36
O
O
O
OH
O
(28)
217
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
ppm (f1)


O
O
O
O
OH
(28)
0.0
5.0
ppm (t1
ppm (t2)
10.0
8.3
6.7
5.0
3.3
1.7
0.0

HSQC spectrum

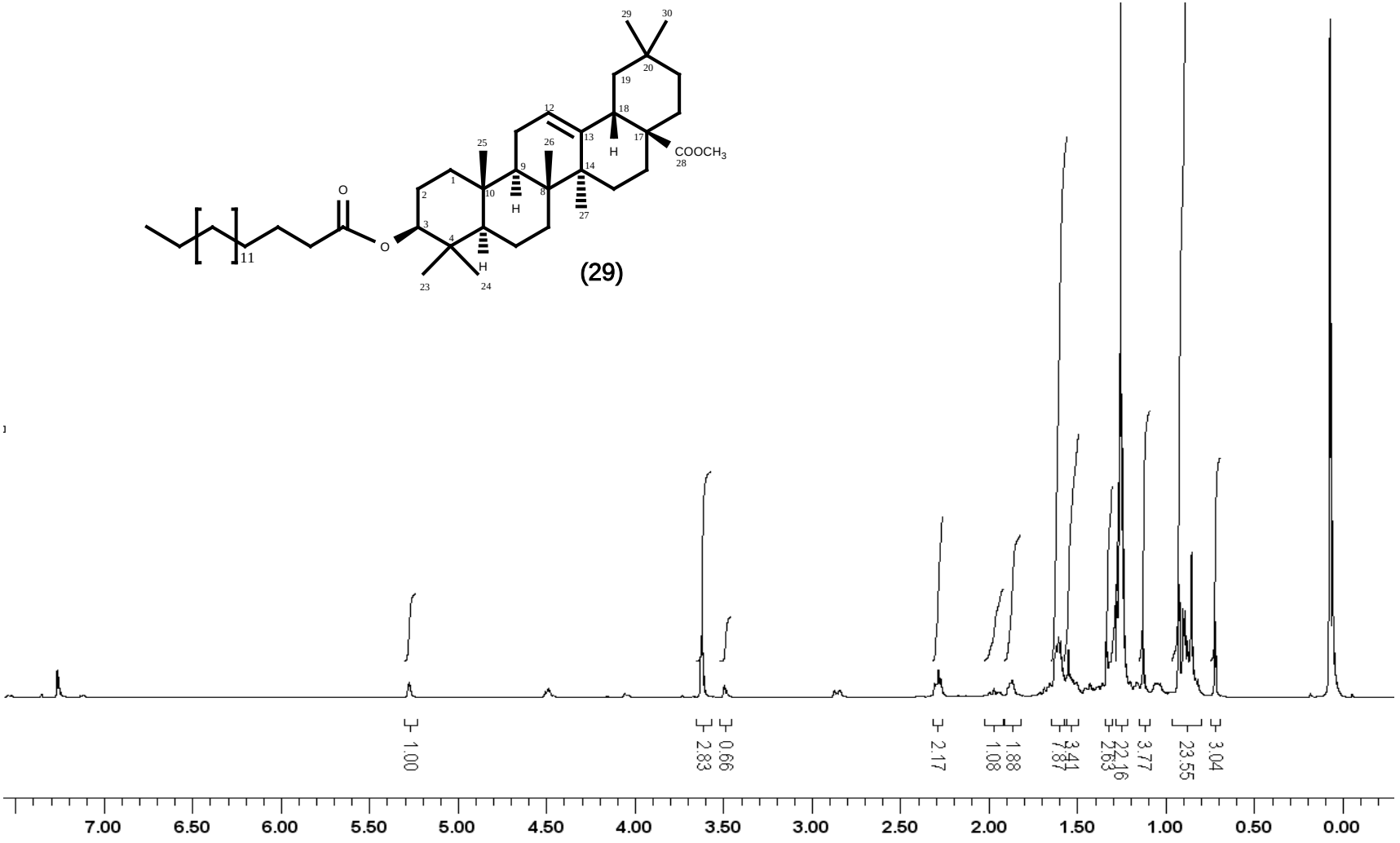


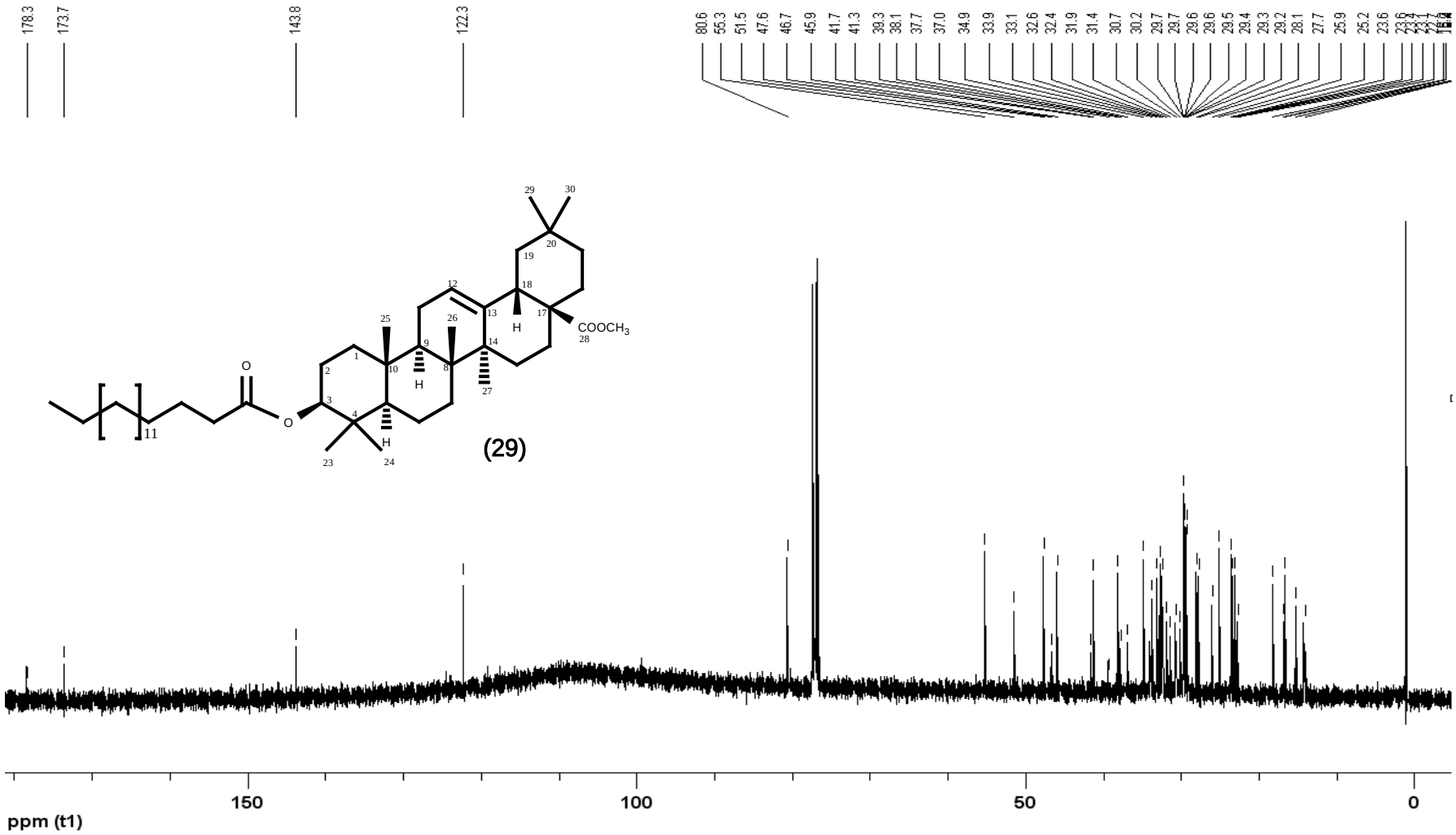
HMBC spectrum

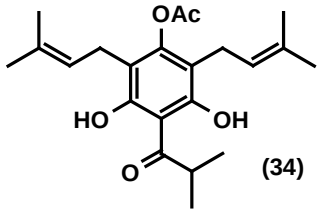


29
30
20
19
18
12
13
17
H
COOCH3
28
25
26
9
14
1
2
10
8
H
27
3
4
H
O
O
11
23
24

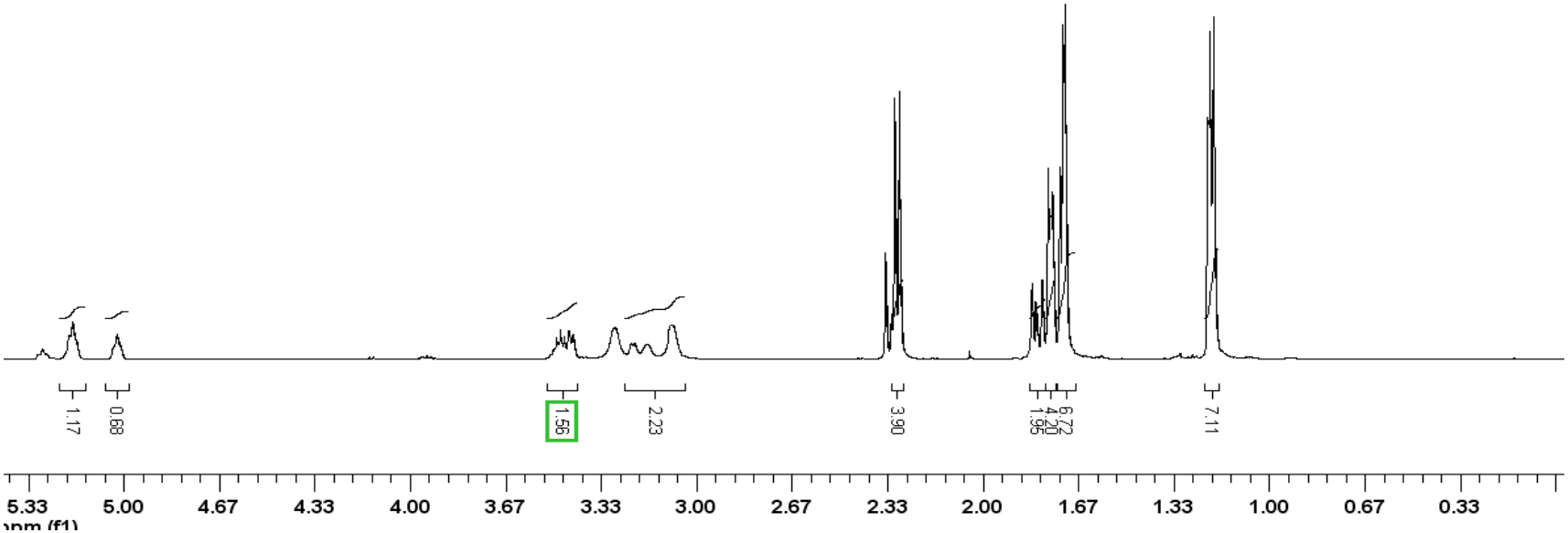
(29)

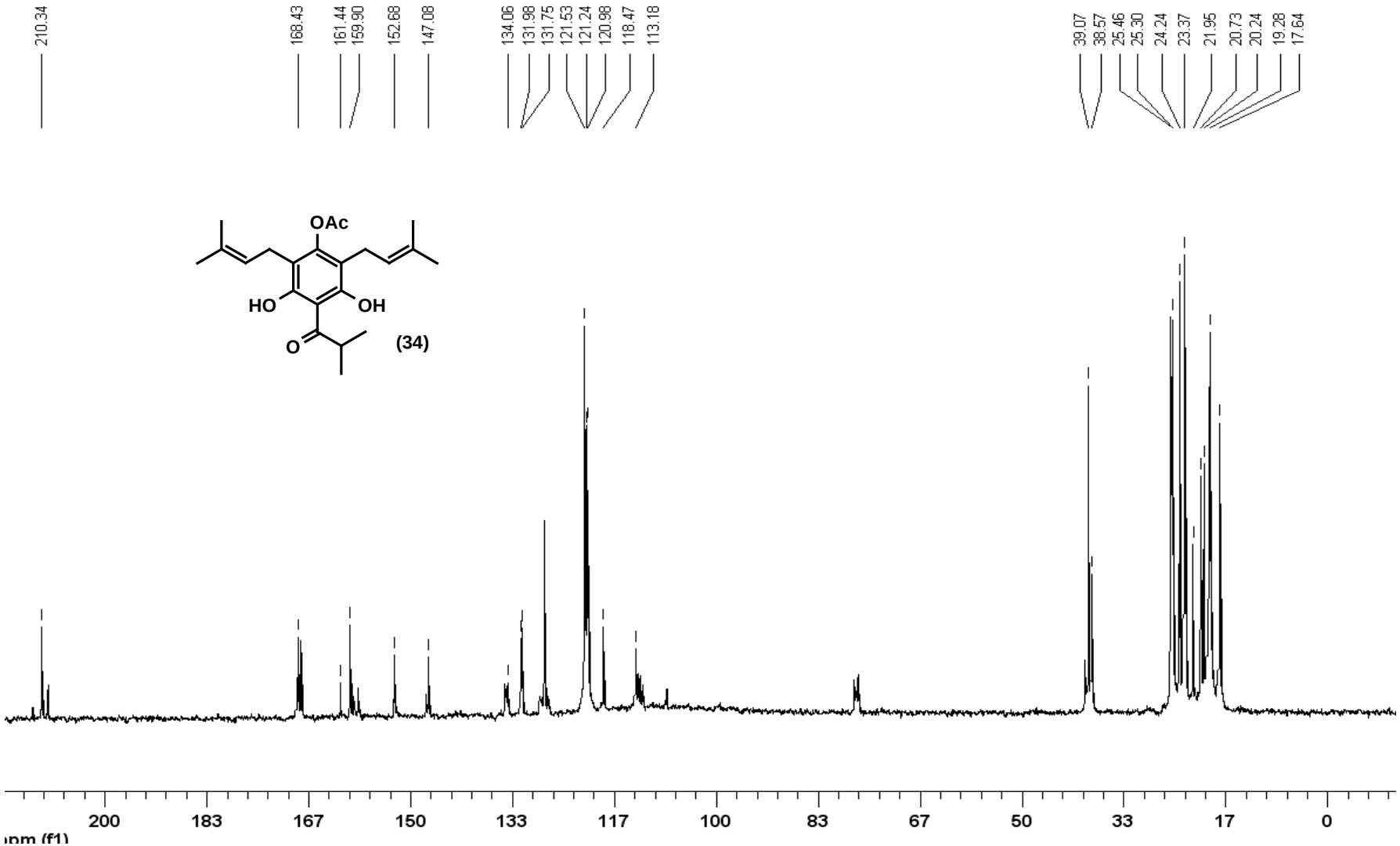

1.00
2.83
0.66
2.17
1.08
1.88
7.87
3.41
2.63
22.16
3.77
23.55
3.04
7.00
6.50
6.00
5.50
5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00

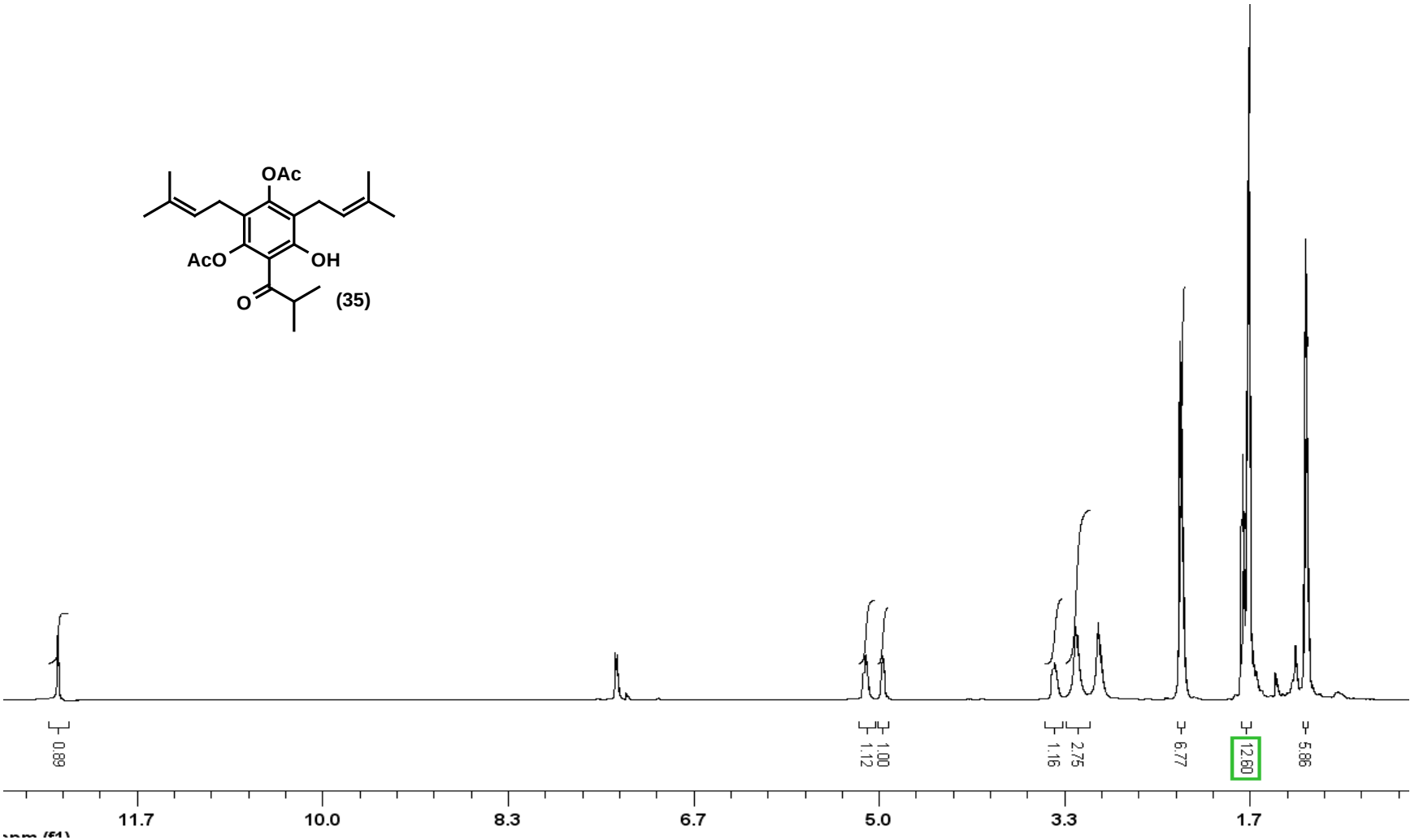

178.3
173.7
143.8
122.3
80.6
55.3
51.5
47.6
46.7
45.9
41.7
41.3
39.3
38.1
37.7
37.0
34.9
33.9
33.1
32.6
32.4
31.9
31.4
30.7
30.2
29.7
29.7
29.6
29.6
29.5
29.4
29.3
29.2
28.1
27.7
25.9
25.2
23.6
COOCH3
O
O
11
(29)
150
100
50
0
ppm (t1)

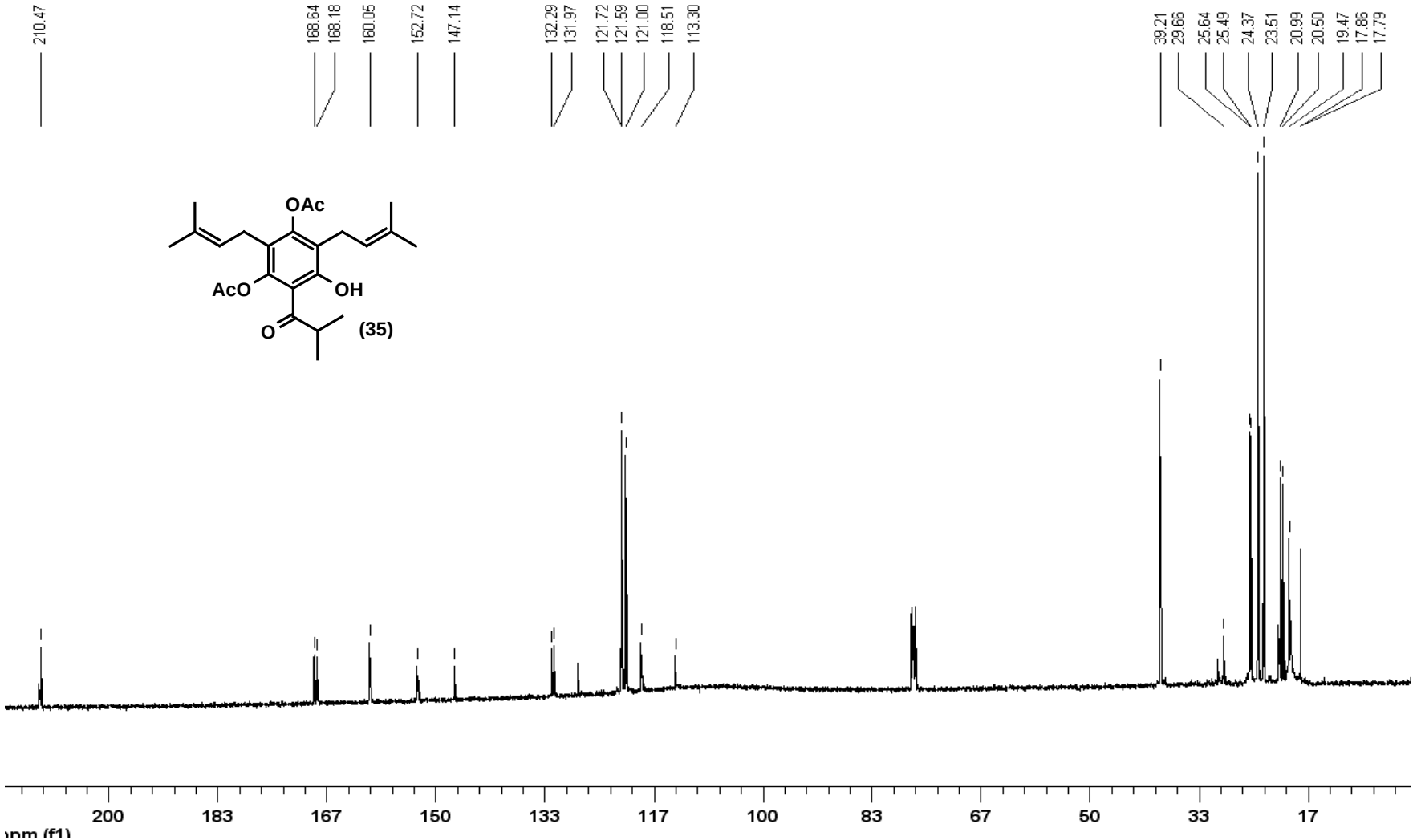

OAc
HO
OH
O

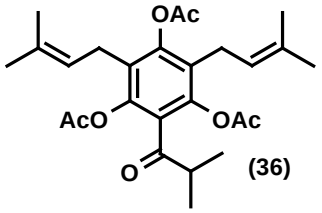
(34)


1.17
0.68
1.56
2.23
3.90
1.95
4.20
6.72
7.11
5.33
5.00
4.67
4.33
4.00
3.67
3.33
3.00
2.67
2.33
2.00
1.67
1.33
1.00
0.67
0.33

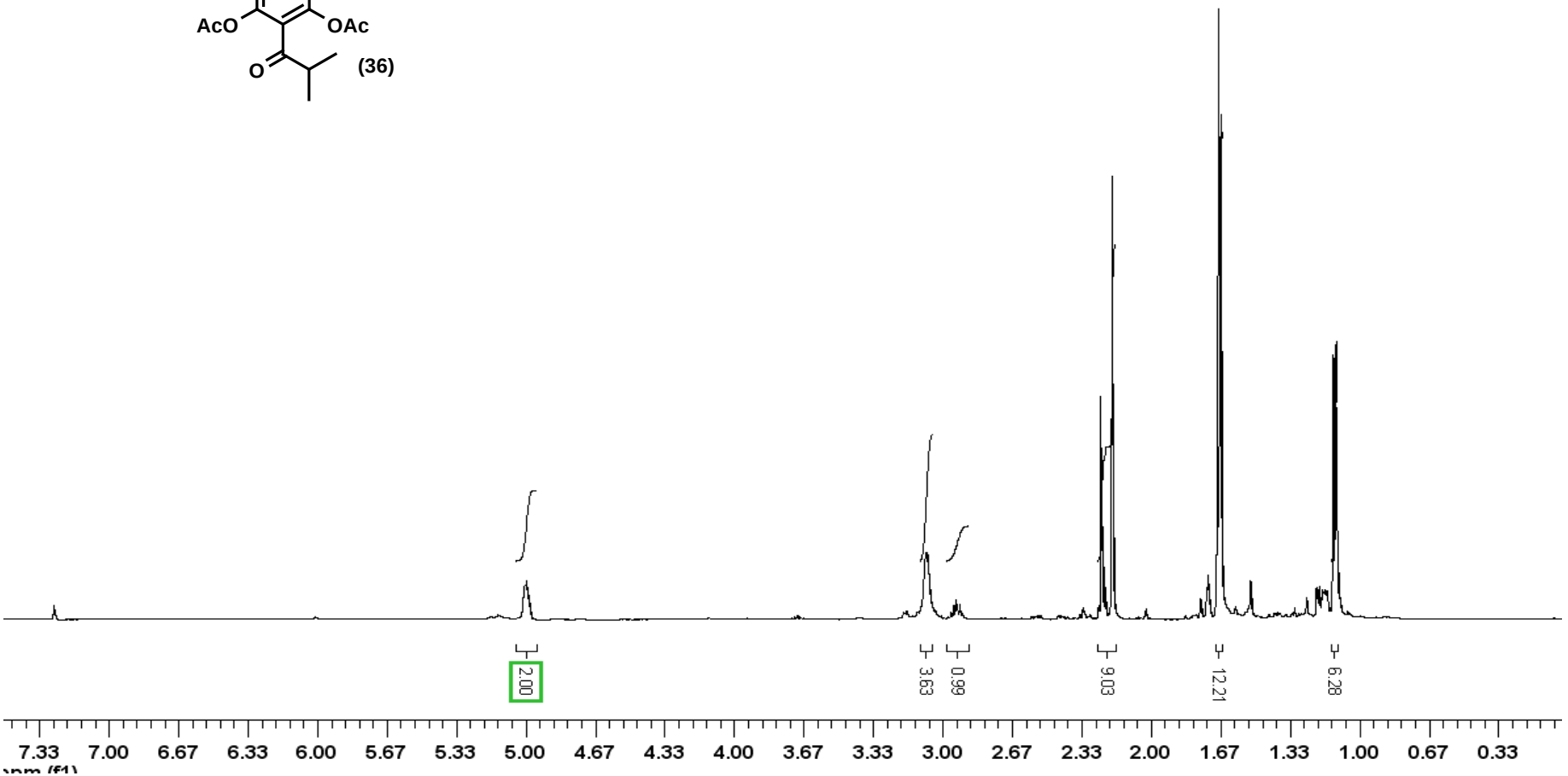

210.34
168.43
161.44
159.90
152.68
147.08
134.06
131.98
131.75
121.53
121.24
120.98
118.47
113.18
39.07
38.57
25.46
25.30
24.24
23.37
21.95
20.73
20.24
19.28
17.64
OAc
HO
OH
O
(34)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0
ppm (f1)

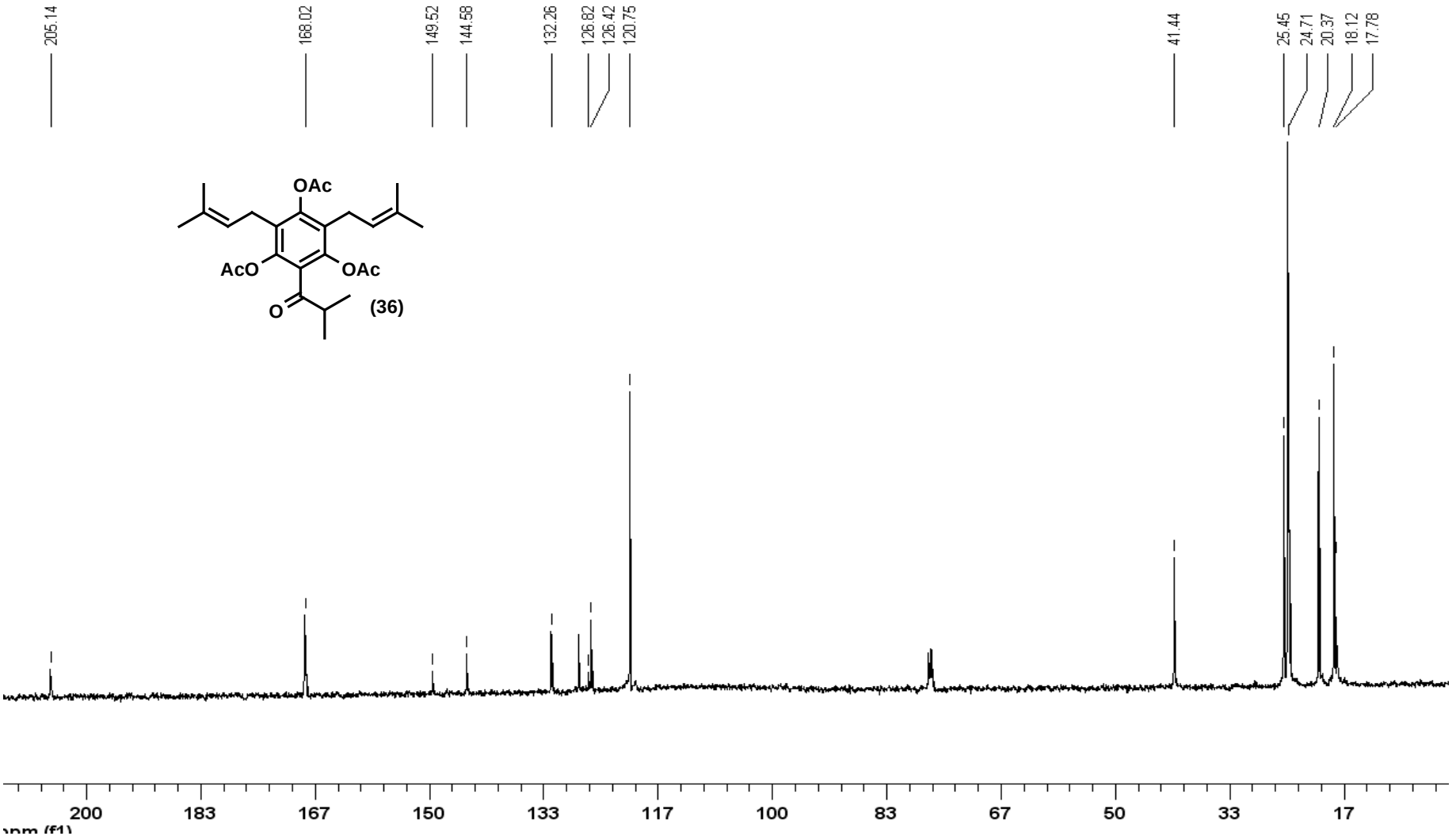

OAc
AcO
OH
O
(35)
0.89
1.12
1.00
1.16
2.75
6.77
12.60
5.86
11.7
10.0
8.3
6.7
5.0
3.3
1.7

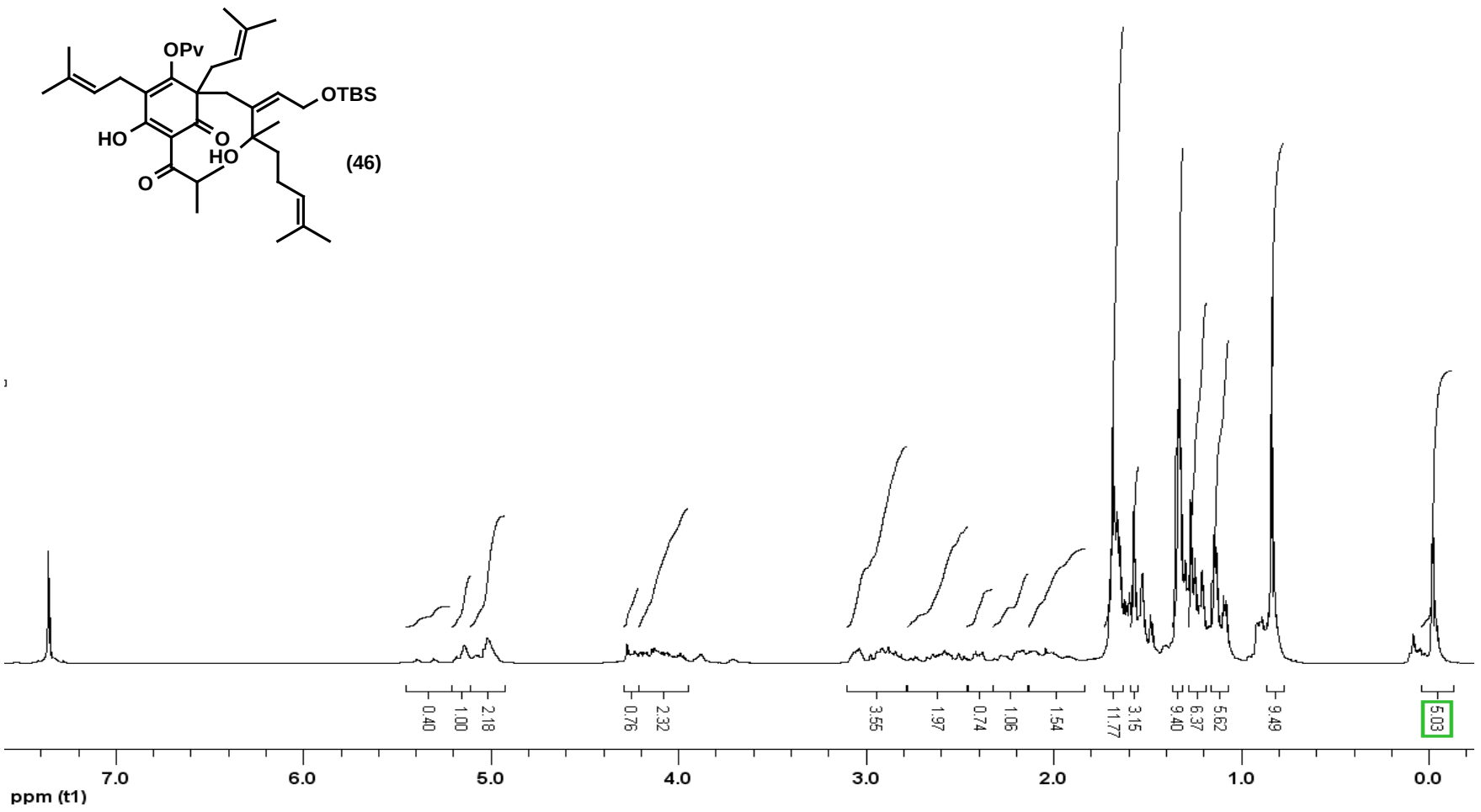

210.47
168.64
168.18
160.05
152.72
147.14
132.29
131.97
121.72
121.59
121.00
118.51
113.30
39.21
29.66
25.64
25.49
24.37
23.51
20.99
20.50
19.47
17.86
17.79
OAc
AcO
OH
O
(35)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
ppm (f1)

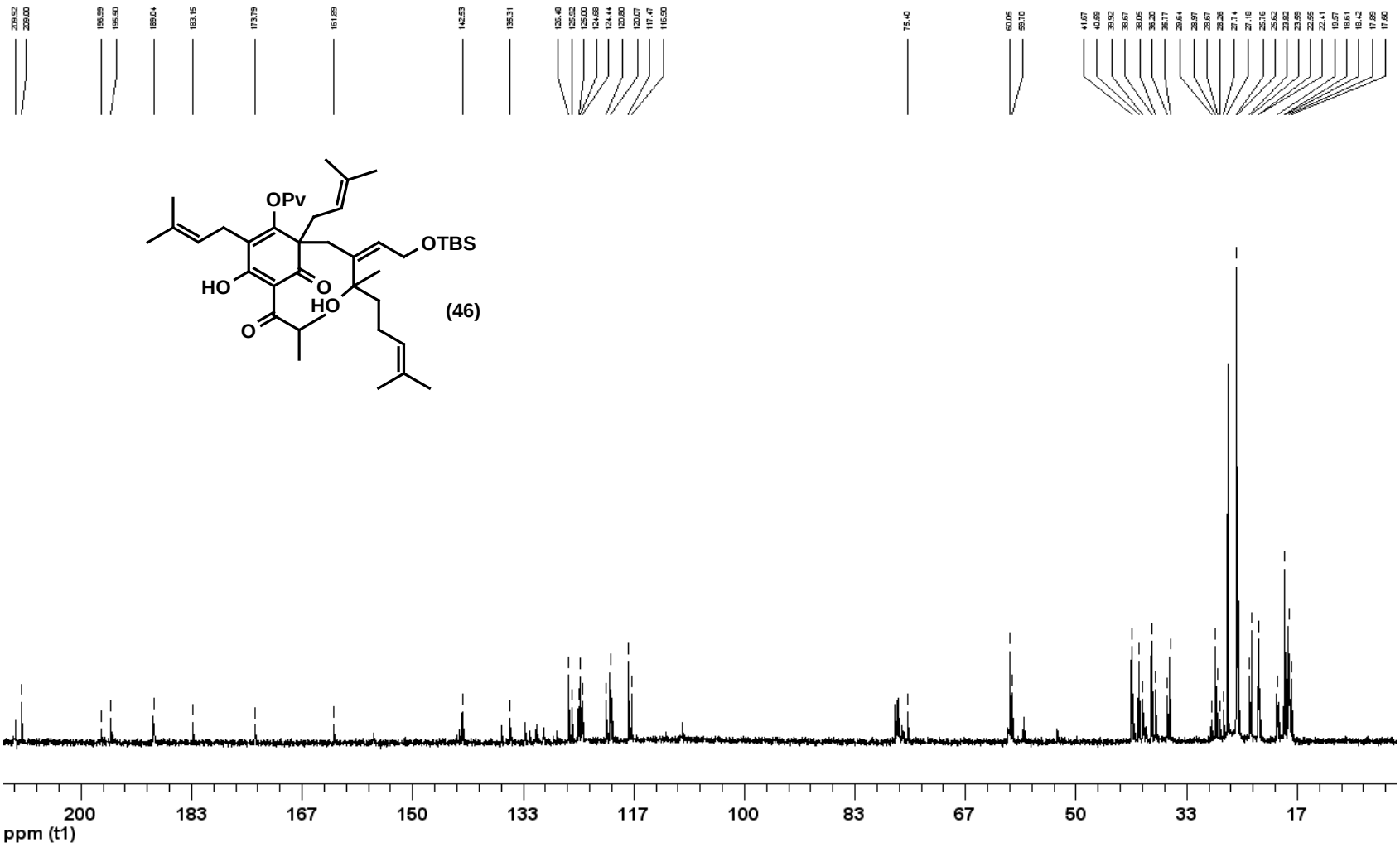

OAc
AcO
OAc
O

(36)


2.00
3.63
0.99
9.03
12.21
6.28
7.33
7.00
6.67
6.33
6.00
5.67
5.33
5.00
4.67
4.33
4.00
3.67
3.33
3.00
2.67
2.33
2.00
1.67
1.33
1.00
0.67
0.33

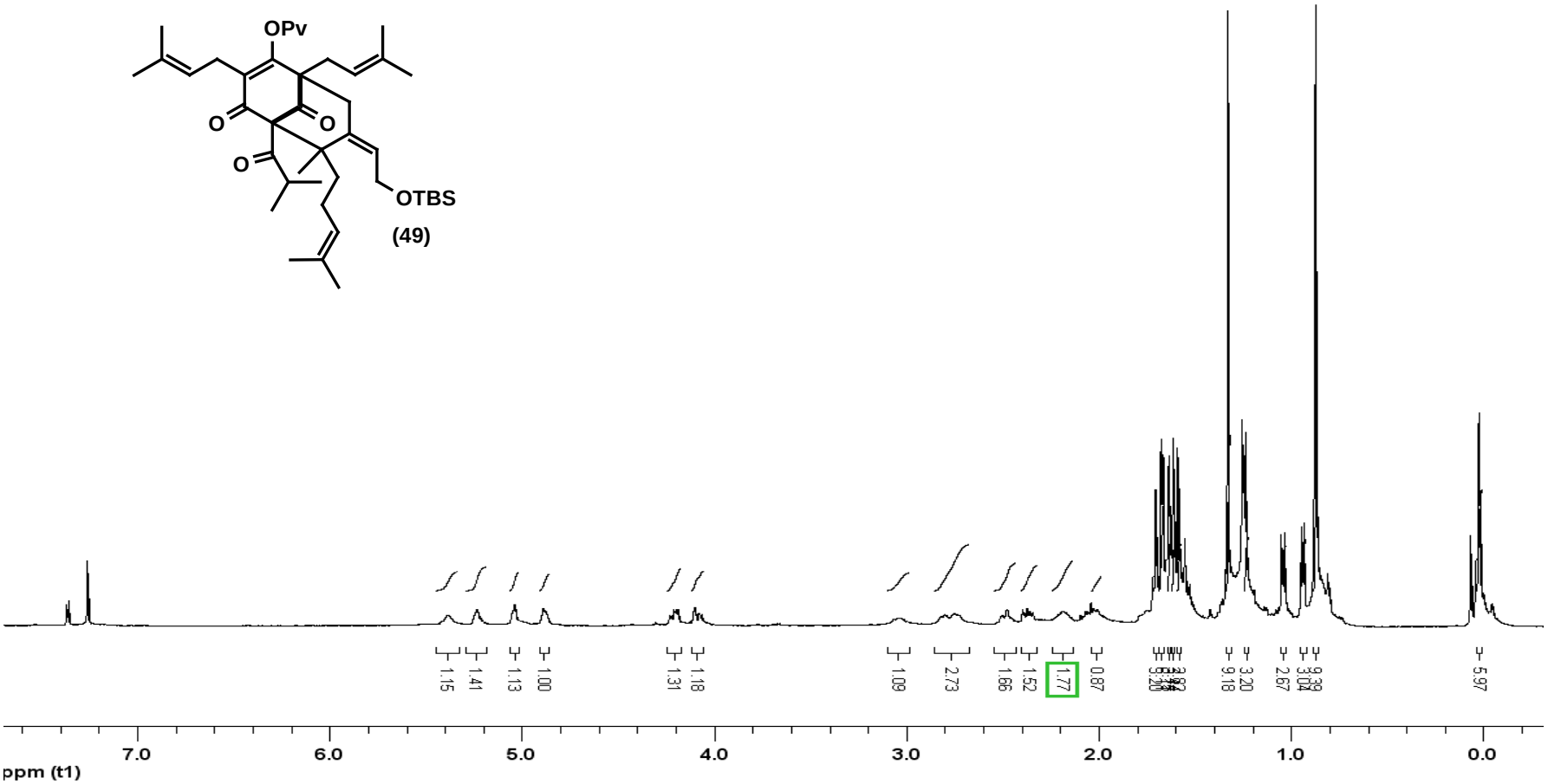

205.14
168.02
149.52
144.58
132.26
126.82
126.42
120.75
41.44
25.45
24.71
20.37
18.12
17.78
OAc
AcO
OAc
O
(36)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
ppm (f1)

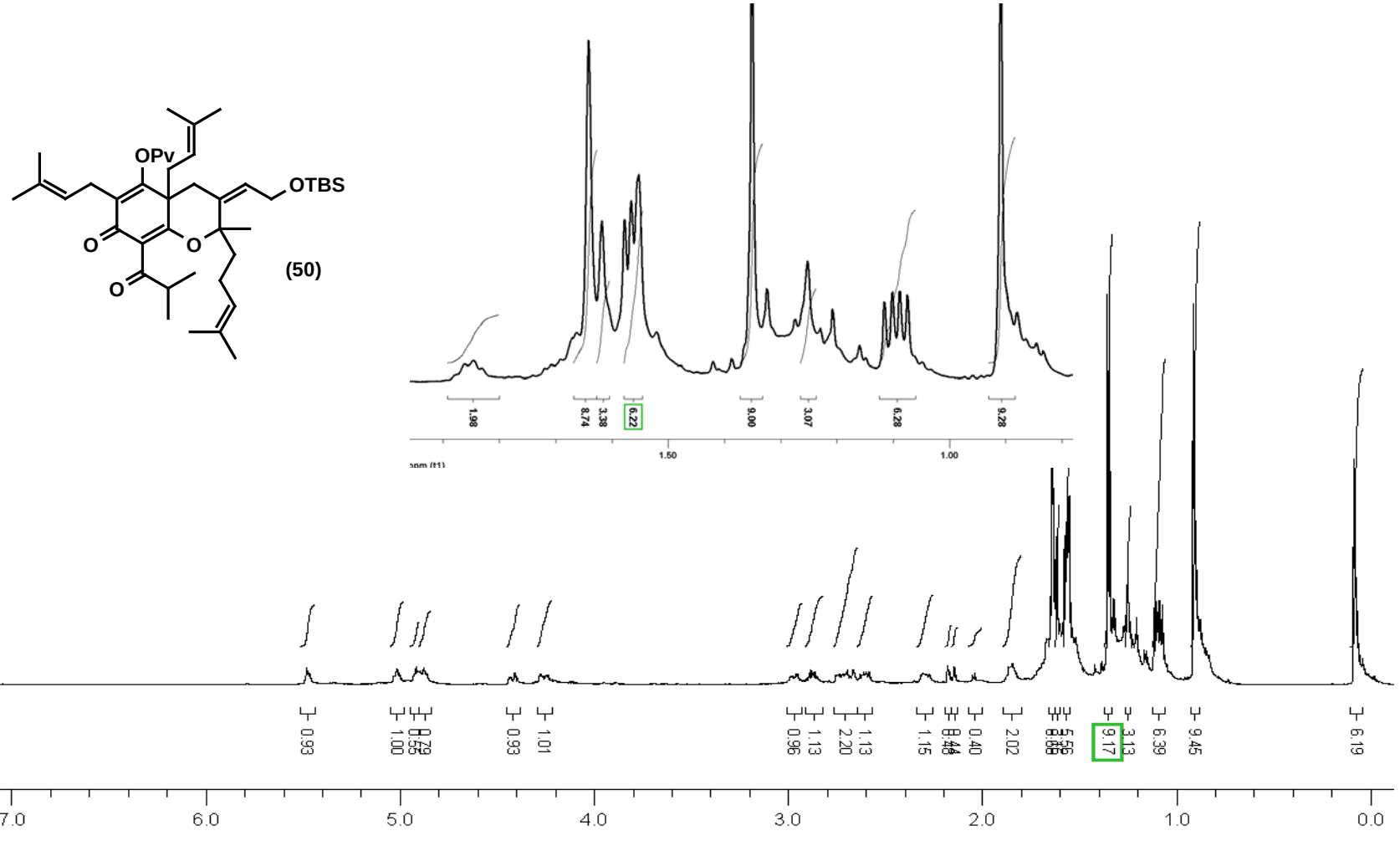

OPv
OTBS
HO
O
HO
O
(46)
0.40
1.00
2.18
0.76
2.32
3.55
1.97
0.74
1.06
1.54
11.77
3.15
9.40
6.37
5.62
9.49
5.03
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
ppm (t1)

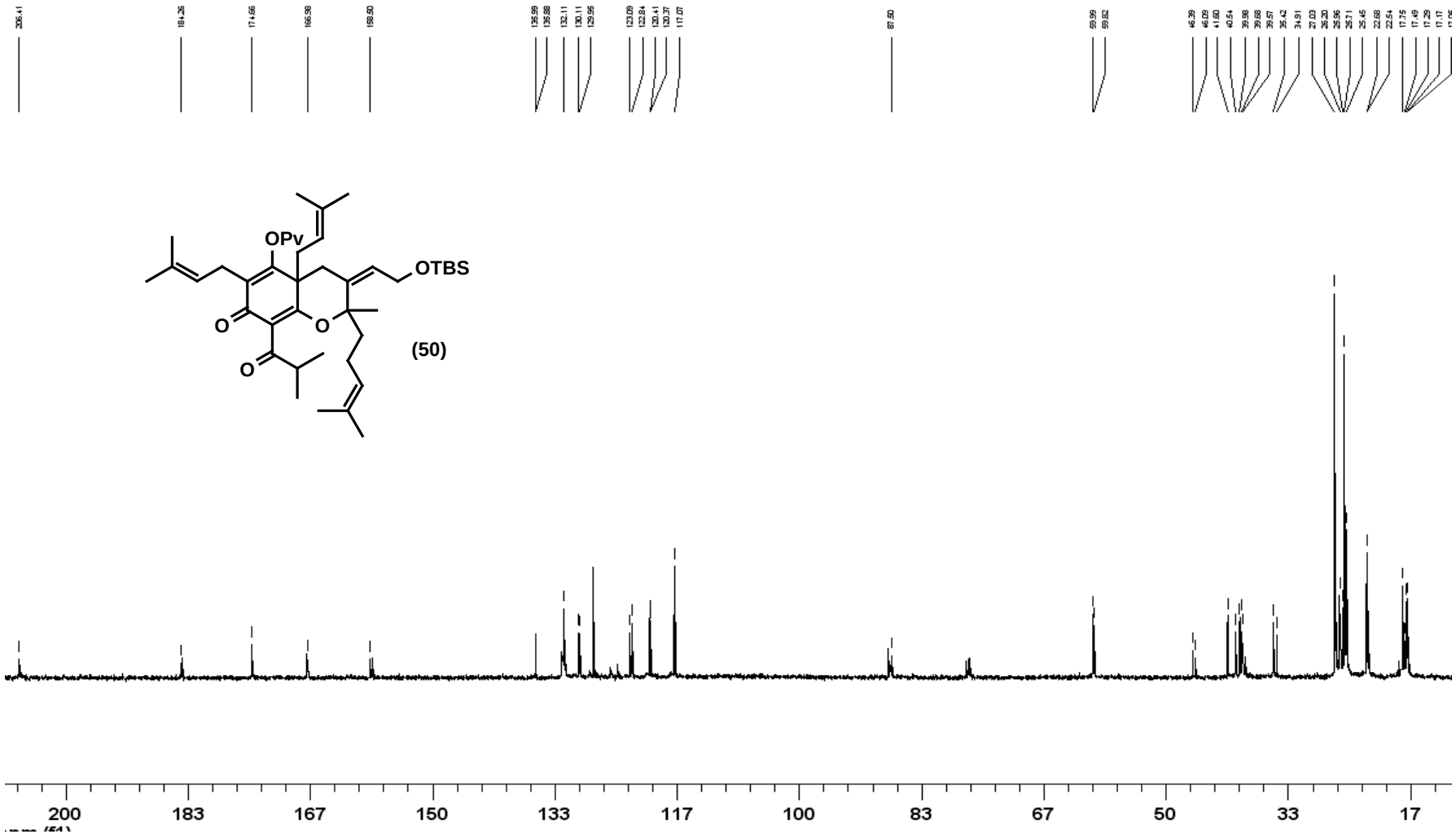

209.92
209.00
196.99
195.50
189.04
183.15
173.79
161.89
142.53
136.31
126.48
125.92
125.00
124.68
124.44
120.80
120.07
117.47
116.90
75.40
60.05
59.70
41.67
40.59
39.92
39.67
39.05
38.20
35.77
29.64
28.97
28.67
28.26
27.74
27.18
25.76
25.62
23.82
23.59
22.55
22.41
19.57
18.61
18.42
17.89
17.60
OPv
OTBS
HO
O
HO
O
(46)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
ppm (t1)

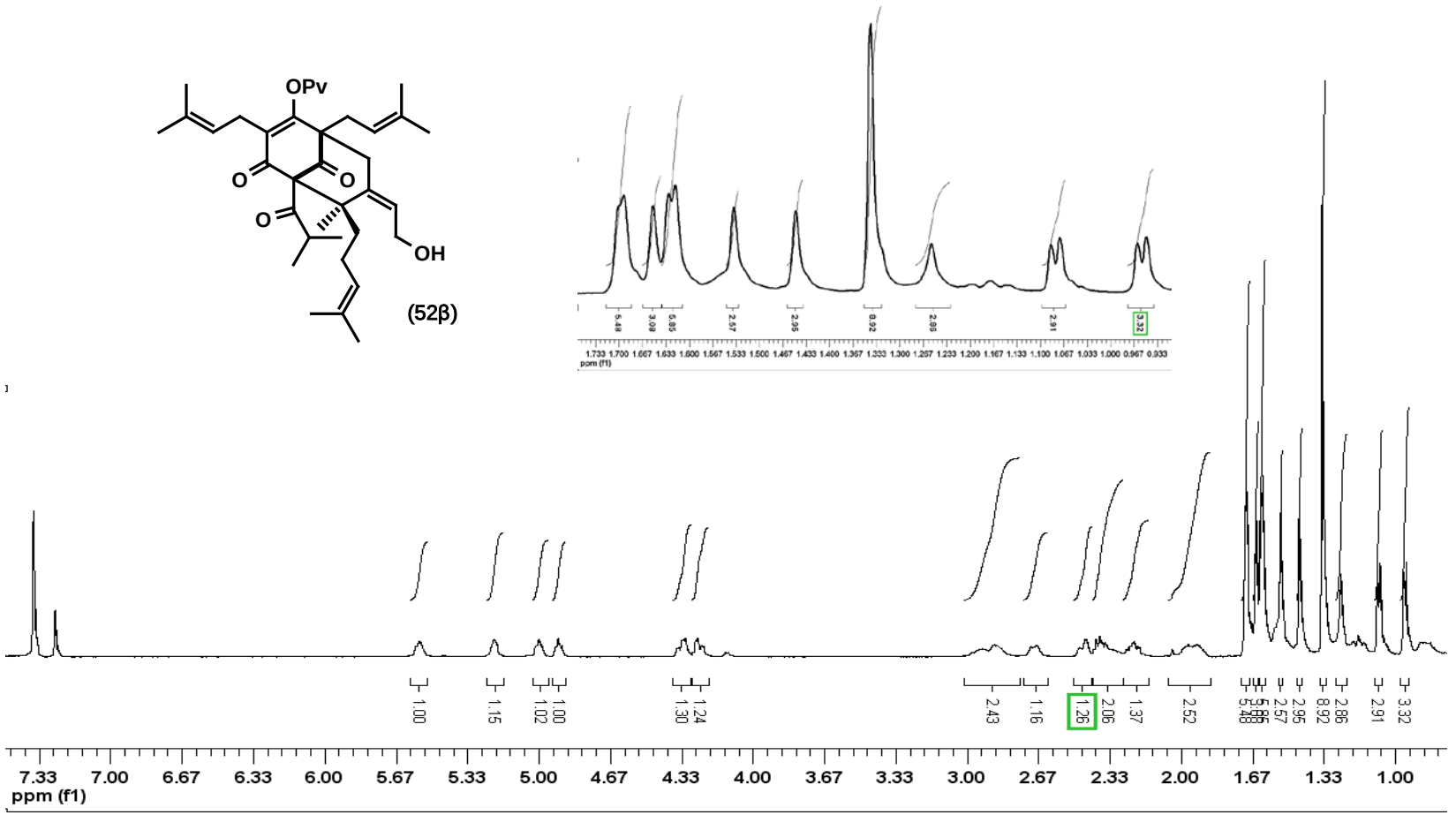
OPv
O
O
O
OTBS

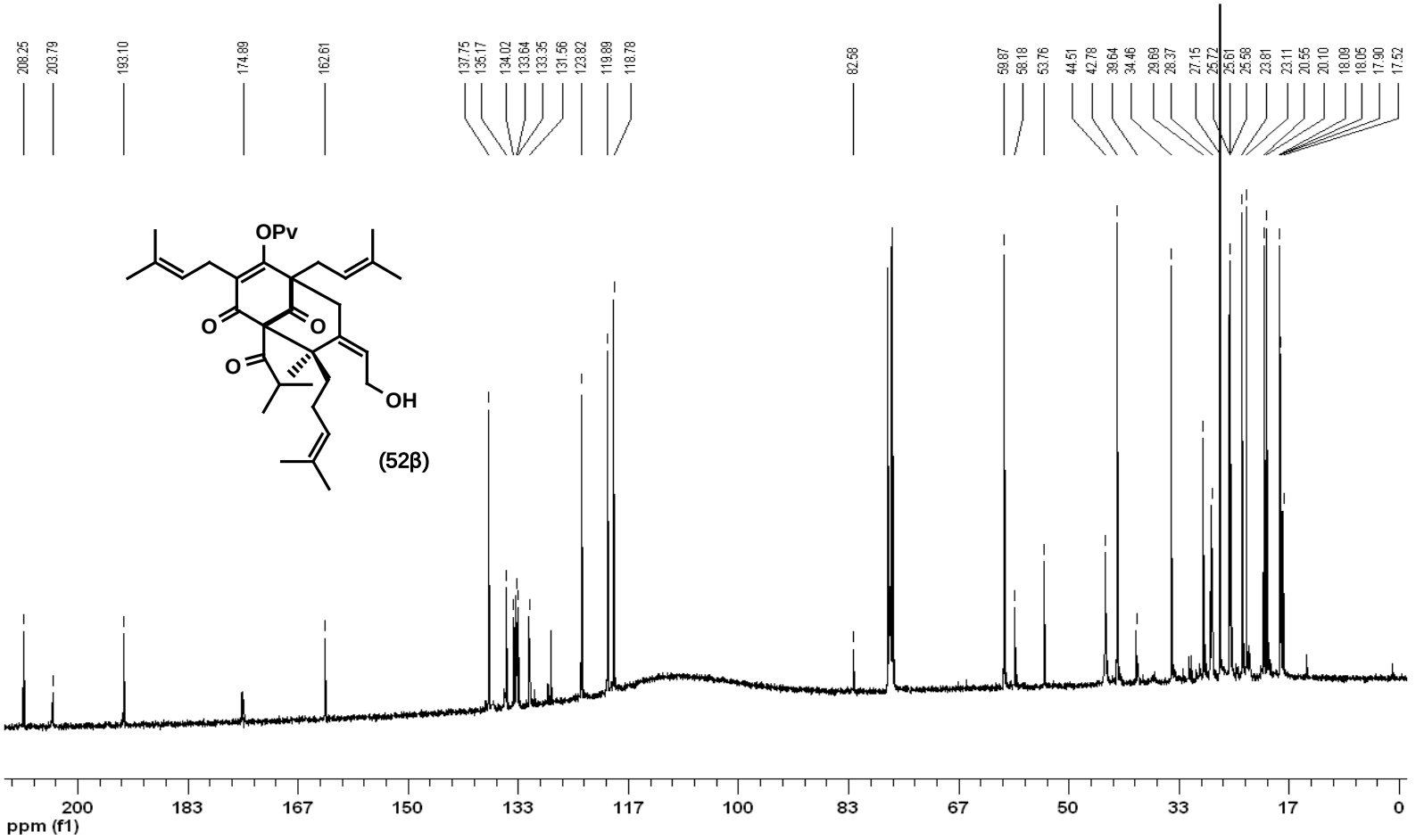
(49)

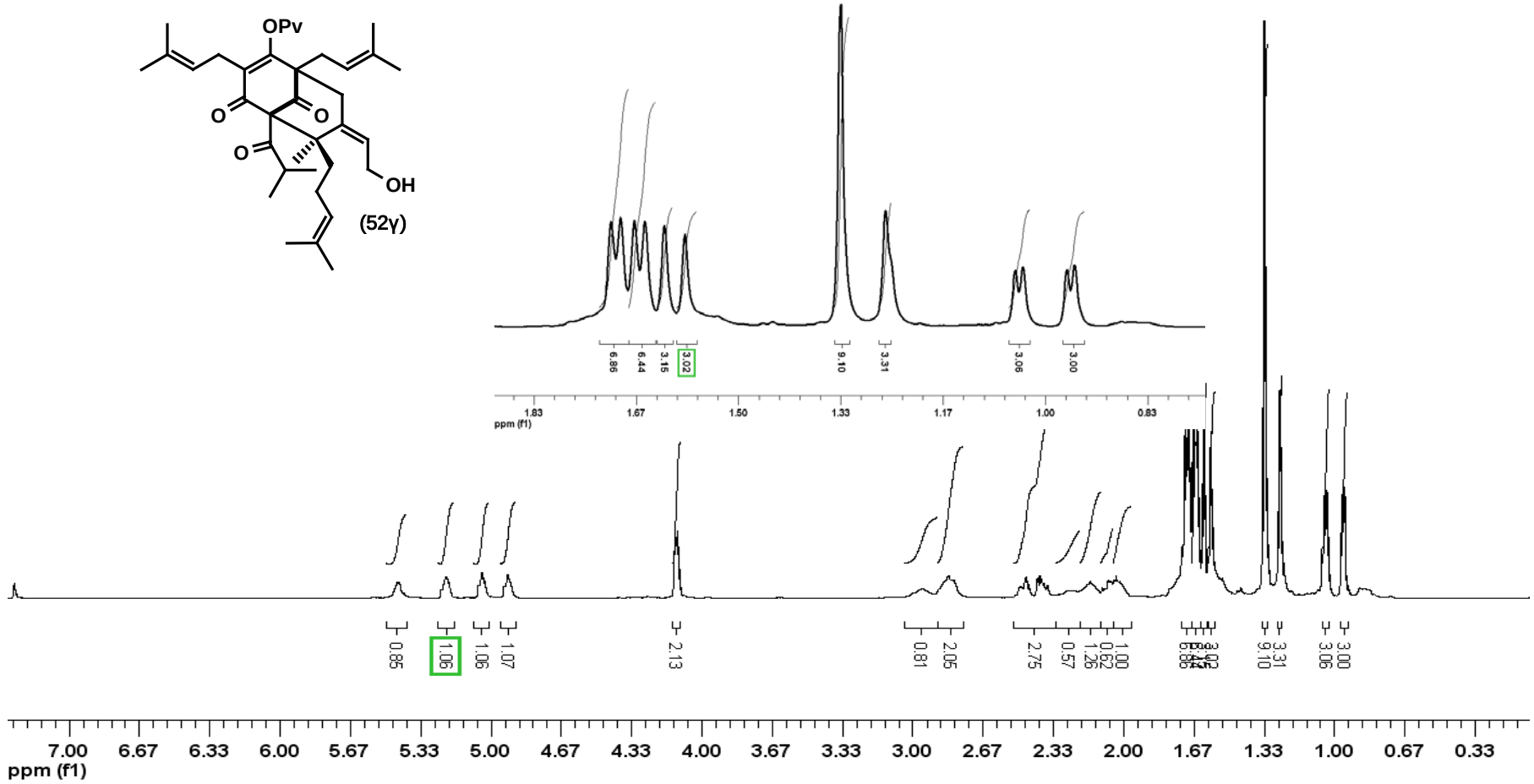

1.15
1.41
1.13
1.00
1.31
1.18
1.09
2.73
1.66
1.52
1.77
0.87
9.18
3.20
2.67
5.97
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
ppm (t1)

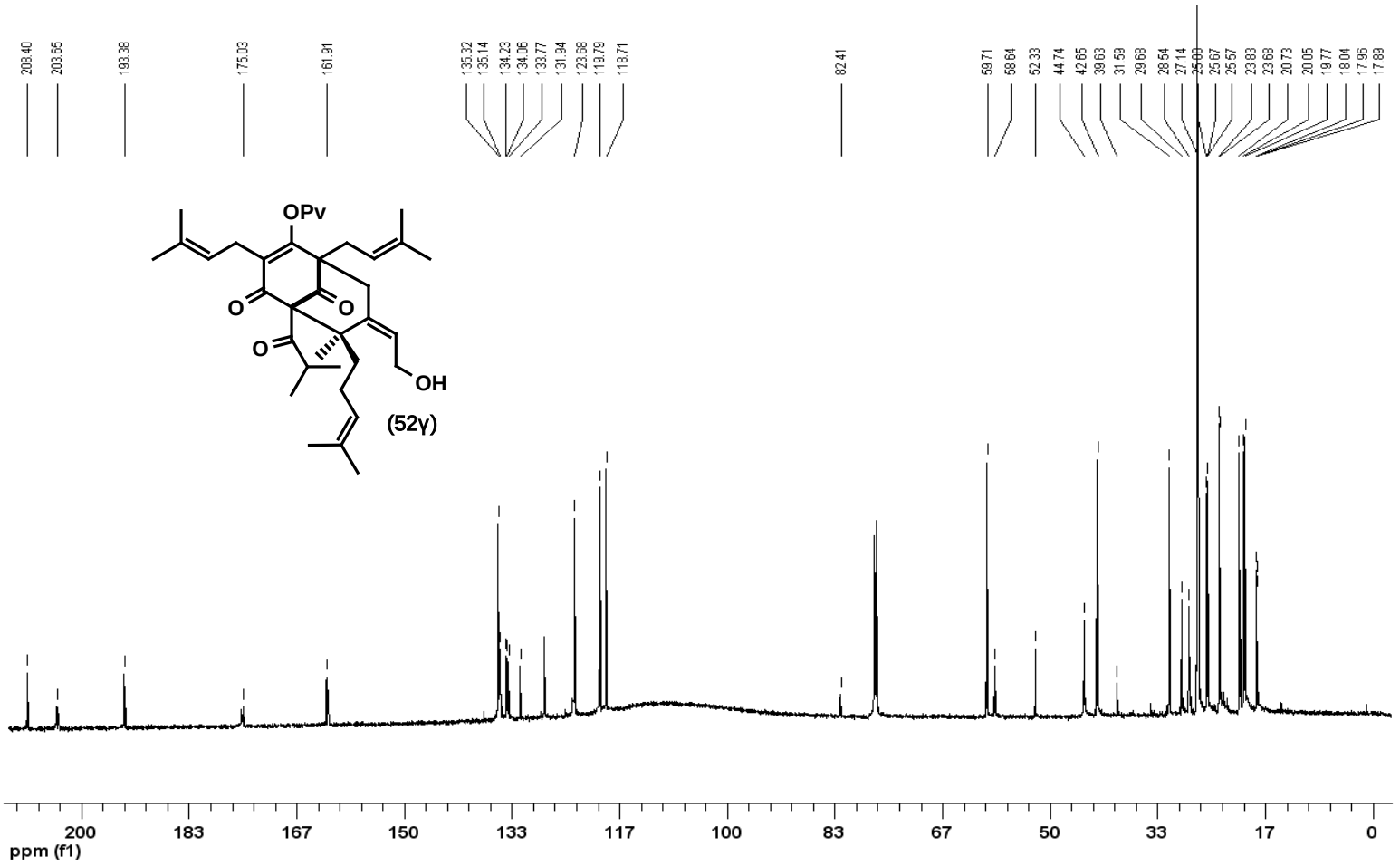

OPv
OTBS
O
O
O
(50)
1.98
8.74
3.38
6.22
9.00
3.07
6.28
9.28
1.50
1.00
0.93
1.00
0.93
1.01
0.96
1.13
2.20
1.13
1.15
0.40
2.02
9.17
3.13
6.39
9.45
6.19
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
ppm (t1)

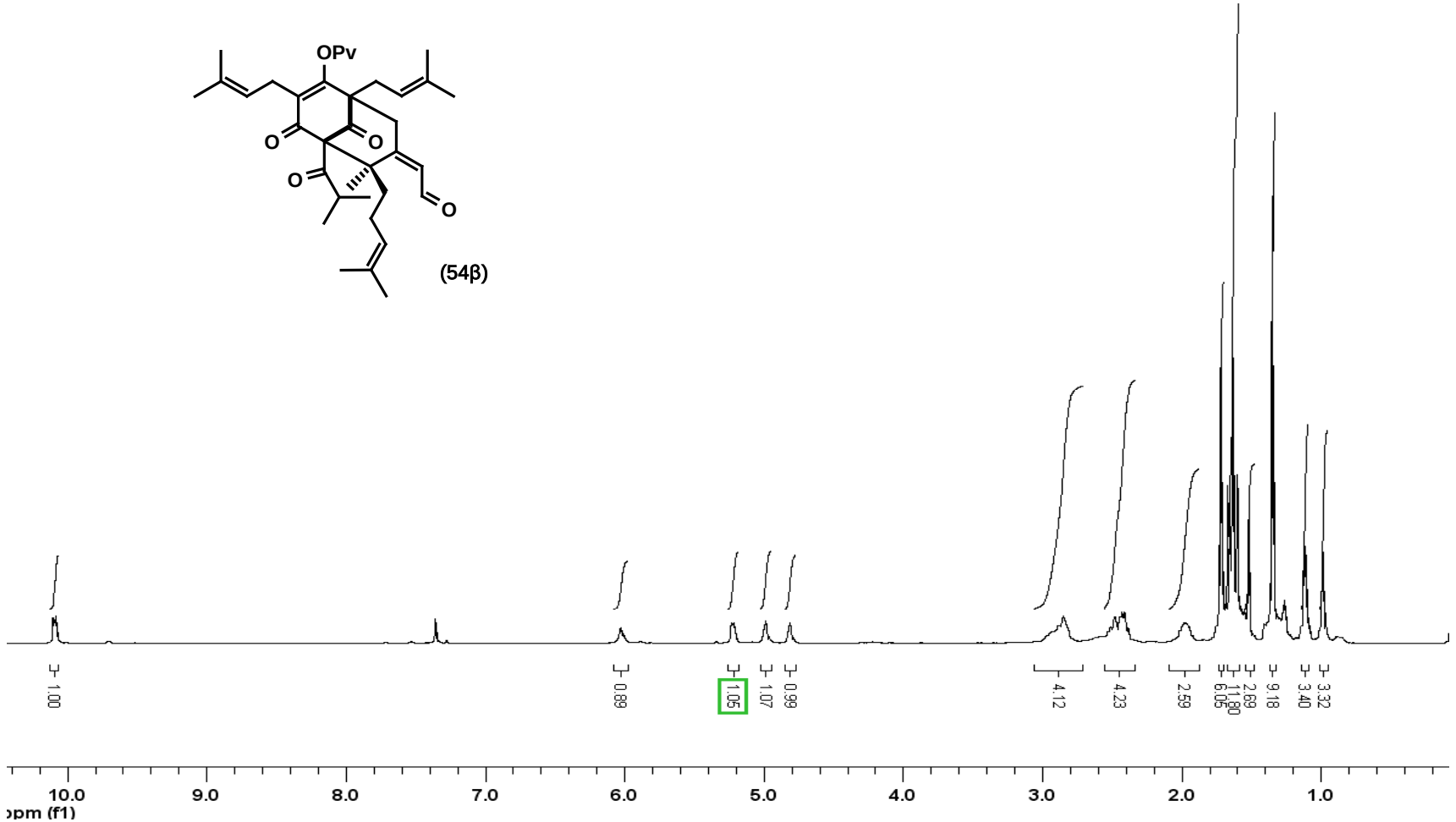

OPv
OTBS
O
O
O
(50)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17

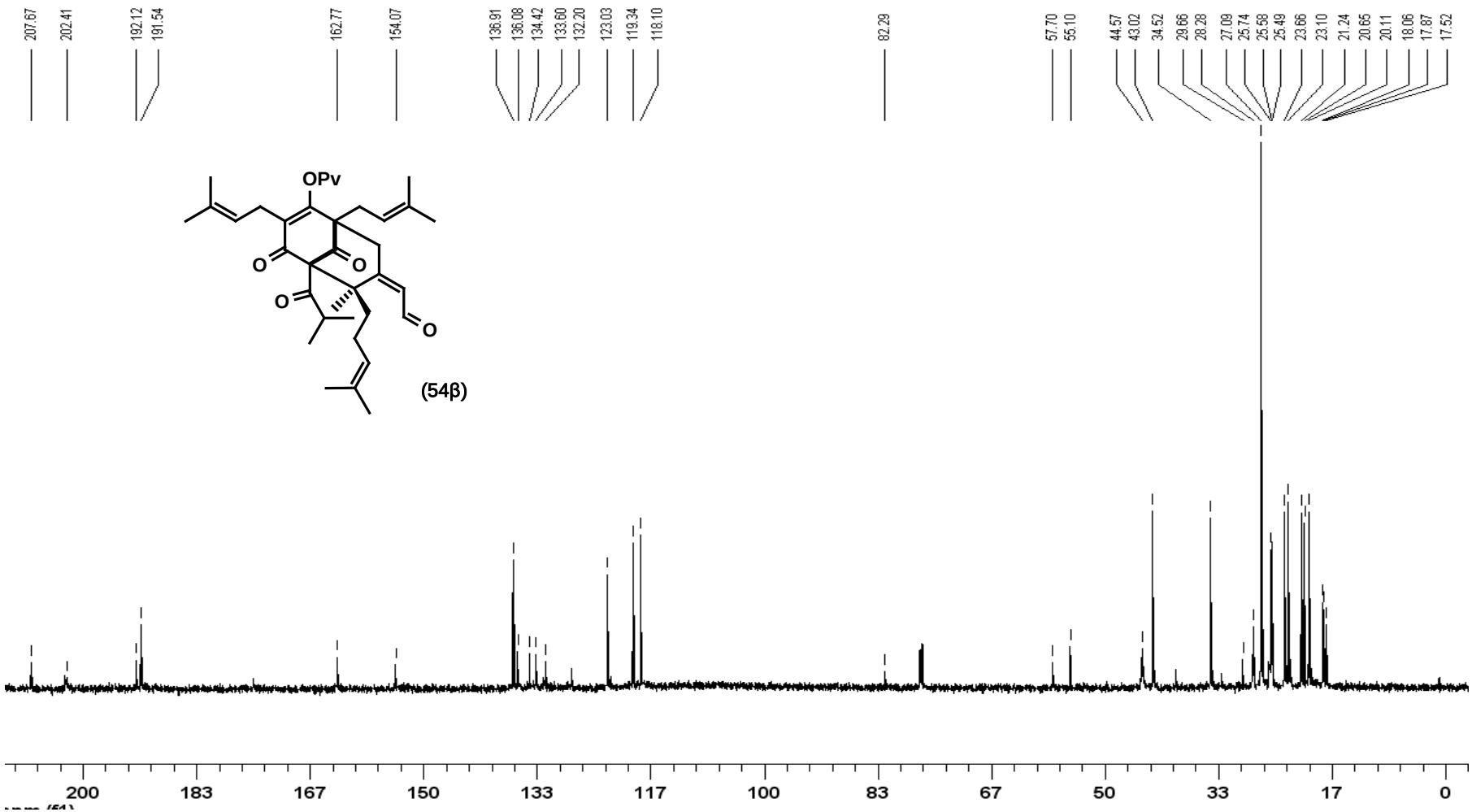

OPv
O
O
O
OH
(52β)
ppm (f1)

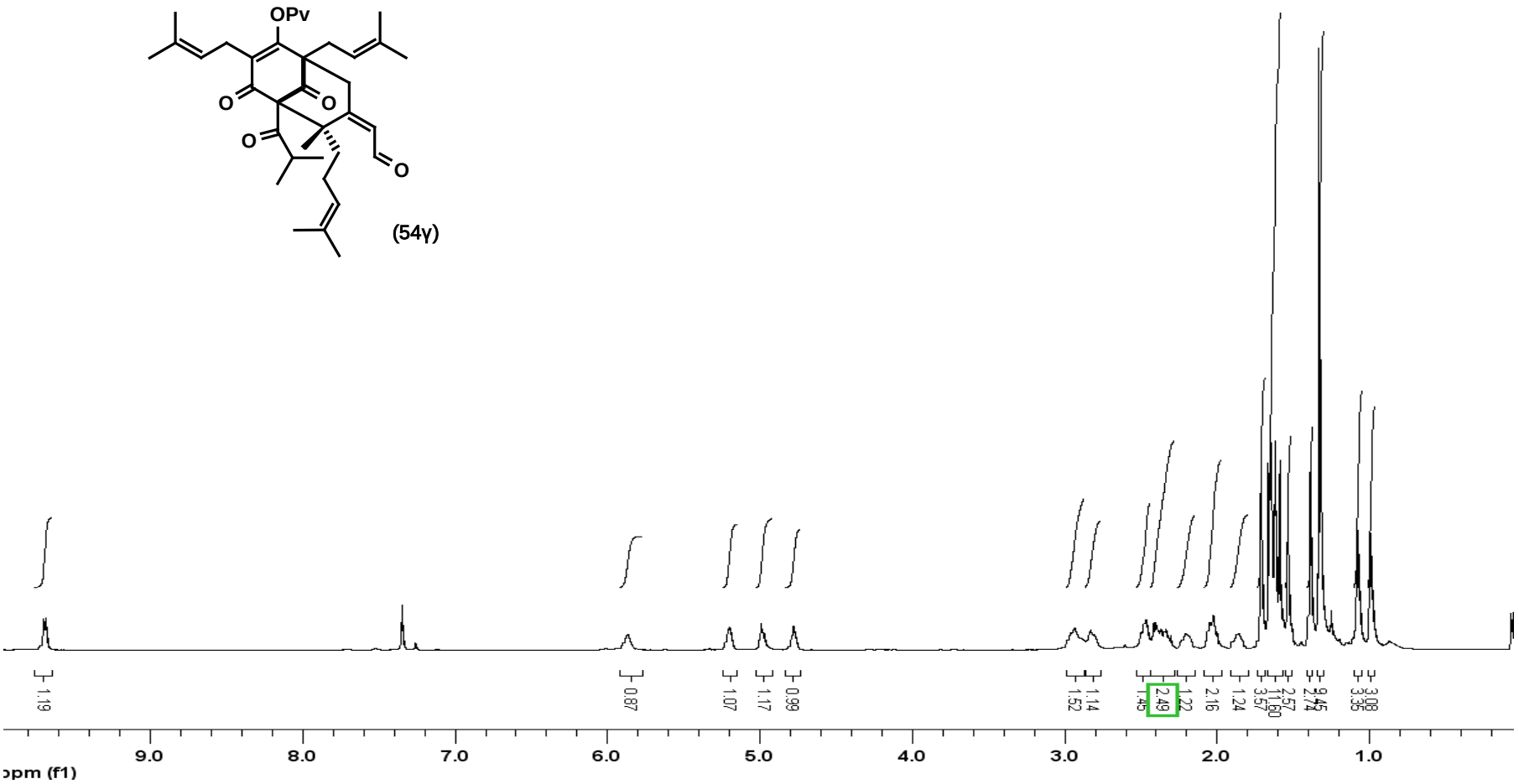

208.25
203.79
193.10
174.89
162.61
137.75
135.17
134.02
133.64
133.35
131.56
123.82
119.89
118.78
82.58
59.87
58.18
53.76
44.51
42.78
39.64
34.46
29.69
28.37
27.15
25.72
25.61
25.58
23.81
23.11
20.55
20.10
18.09
18.05
17.90
17.52
OPv
O
O
O
OH
(52β)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0
ppm (f1)

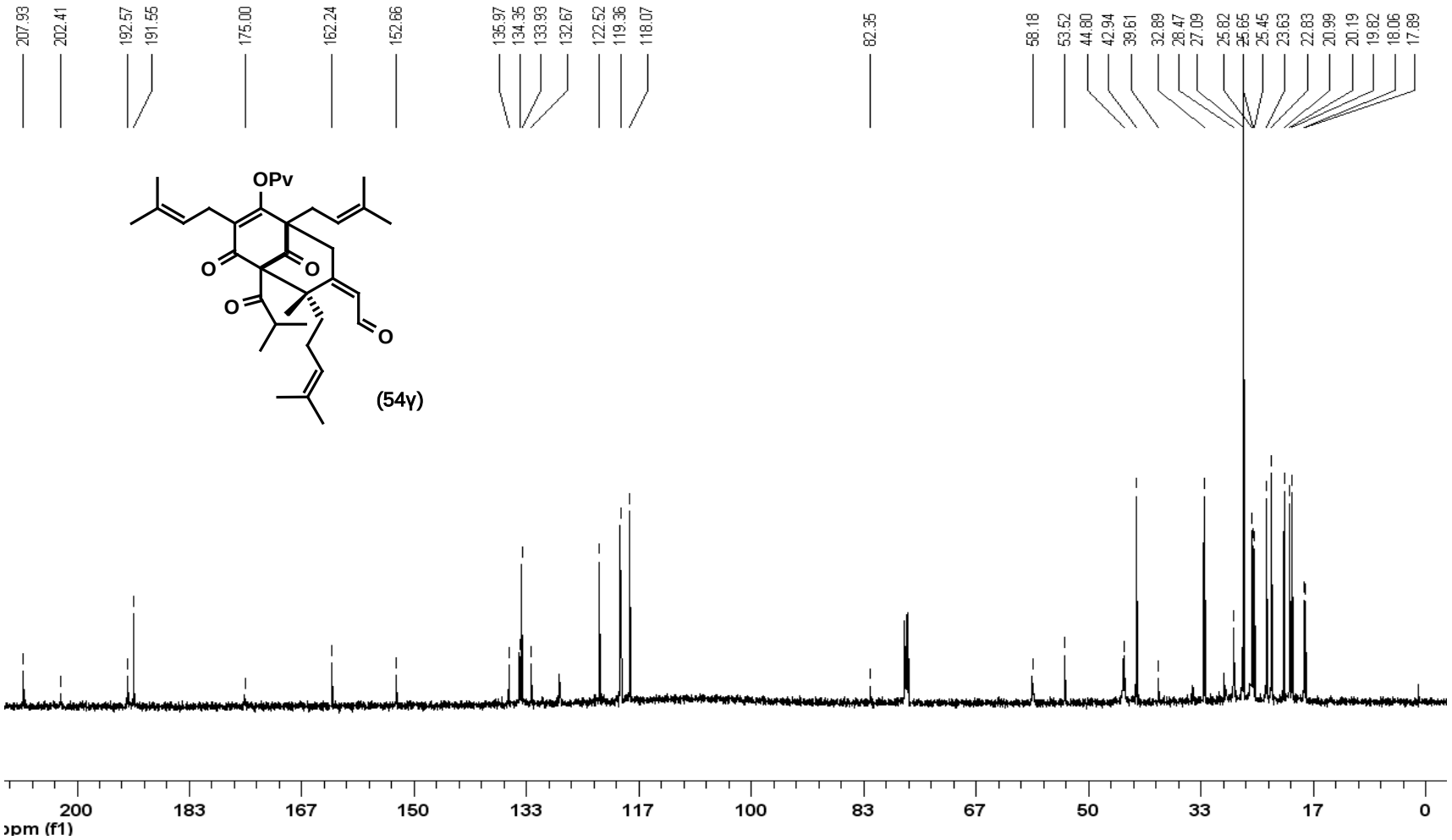

OPv
O
O
O
OH
(52γ)
6.86
6.44
3.15
3.02
9.10
3.31
3.06
3.00
1.83
1.67
1.50
1.33
1.17
1.00
0.83
ppm (f1)
0.85
1.06
1.06
1.07
2.13
0.81
2.05
2.75
0.57
1.26
0.62
1.00
6.86
9.10
3.31
3.06
3.00
7.00
6.67
6.33
6.00
5.67
5.33
5.00
4.67
4.33
4.00
3.67
3.33
3.00
2.67
2.33
2.00
1.67
1.33
1.00
0.67
0.33
ppm (f1)

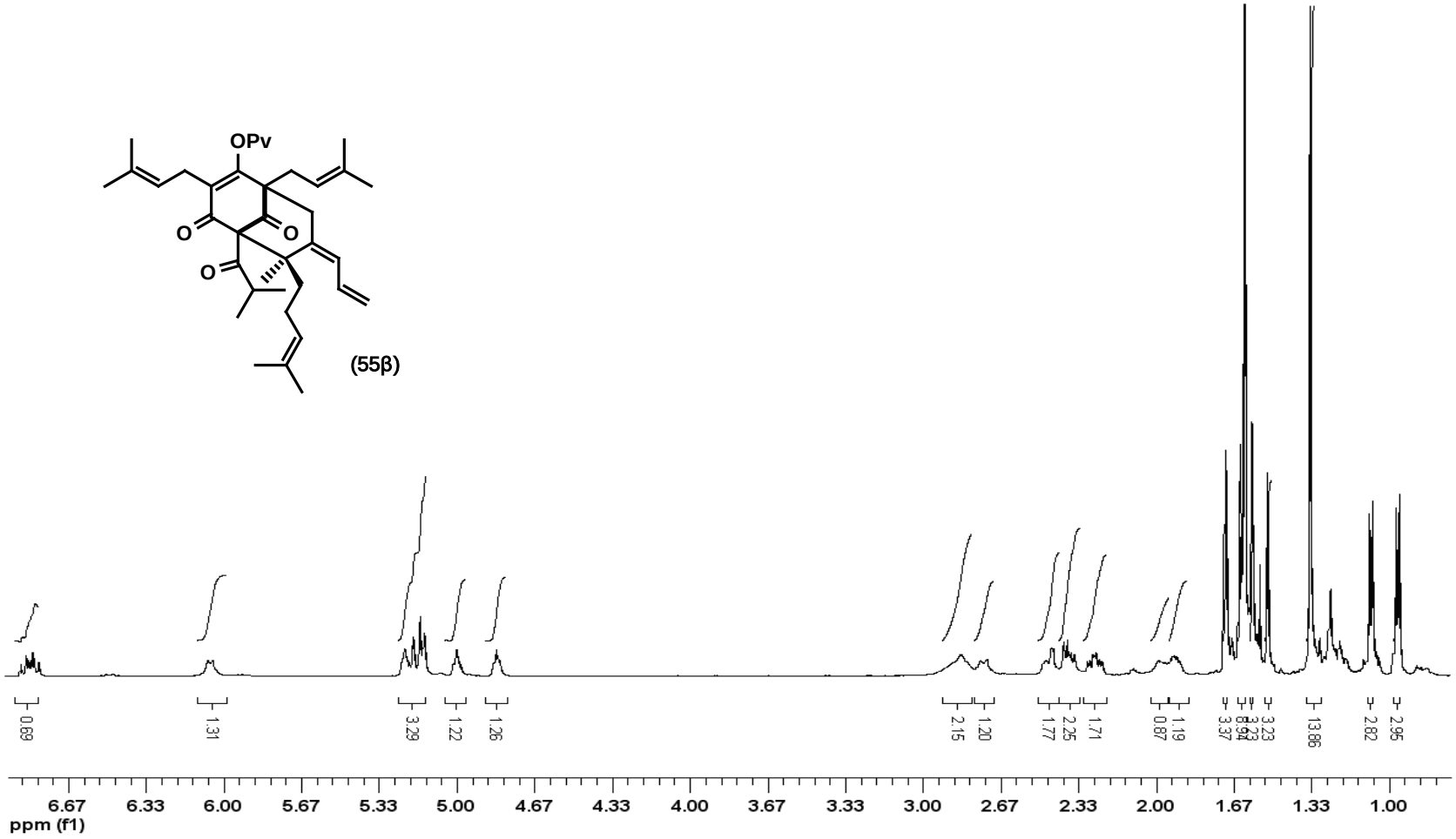

208.40
203.65
193.38
175.03
161.91
135.32
135.14
134.23
134.06
133.77
131.94
123.68
119.79
118.71
82.41
59.71
58.64
52.33
44.74
42.65
39.63
31.59
29.68
28.54
27.14
25.67
25.57
23.83
23.68
20.73
20.05
19.77
18.04
17.96
17.89
OPv
O
O
O
OH
(52γ)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0
ppm (f1)

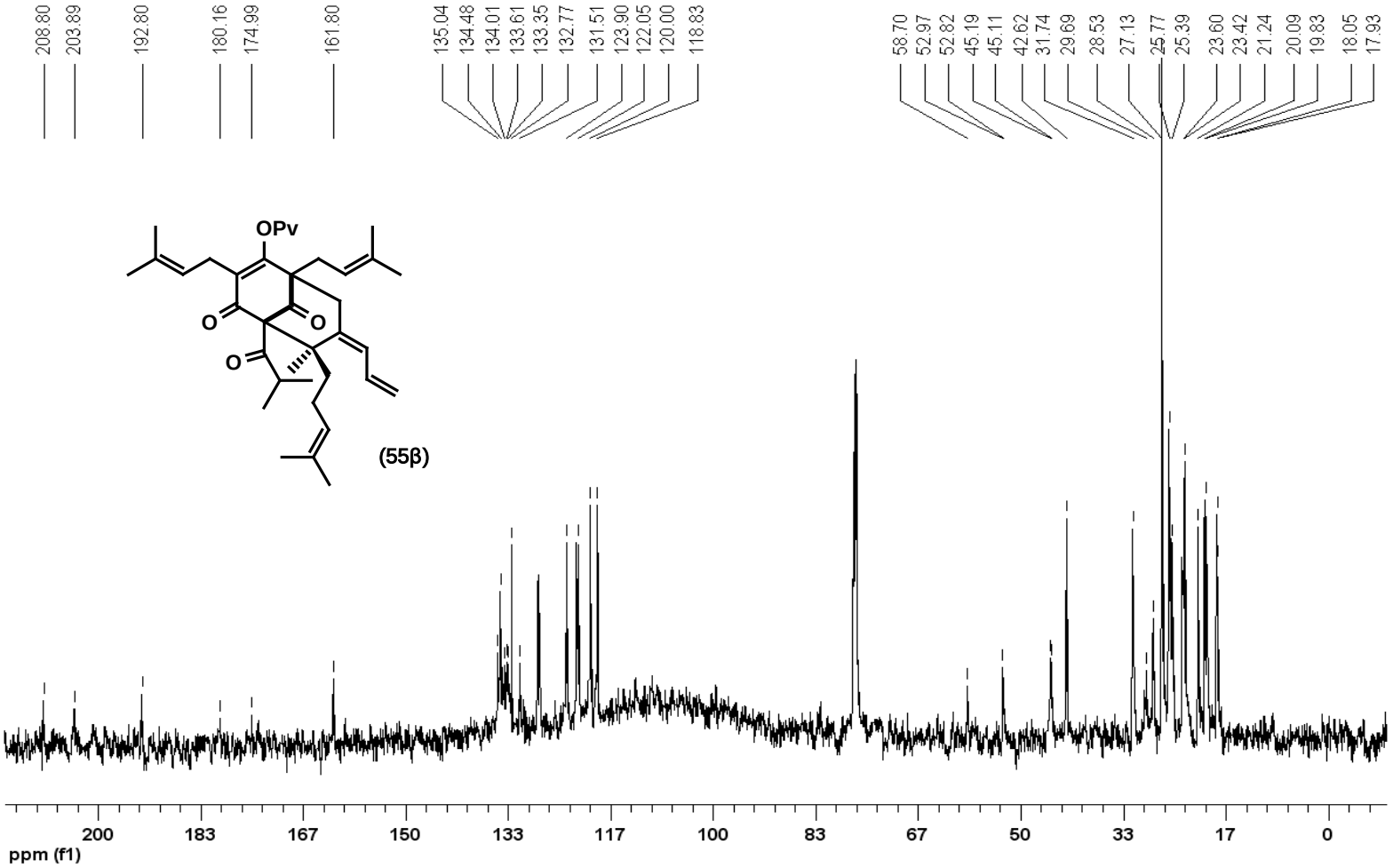

OPv
O
O
O
O
(54β)
1.00
0.89
1.05
1.07
0.99
4.12
4.23
2.59
11.80
6.05
2.69
9.18
3.40
3.32
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (f1)

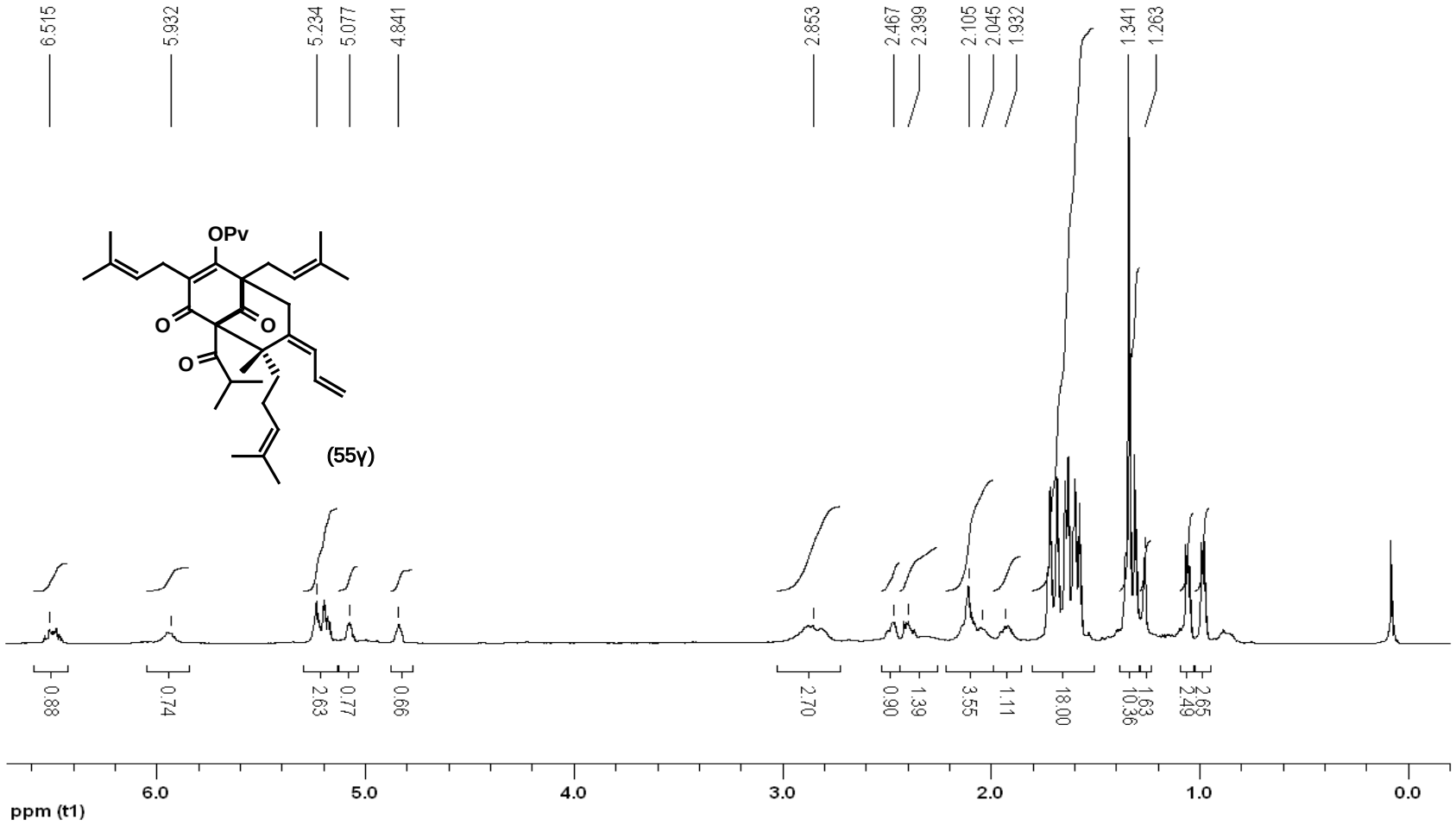

207.67
202.41
192.12
191.54
162.77
154.07
136.91
136.08
134.42
133.60
132.20
123.03
119.34
118.10
82.29
57.70
55.10
44.57
43.02
34.52
29.66
28.28
27.09
25.74
25.58
25.49
23.66
23.10
21.24
20.65
20.11
18.06
17.87
17.52
OPv
O
O
O
O
(54β)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0

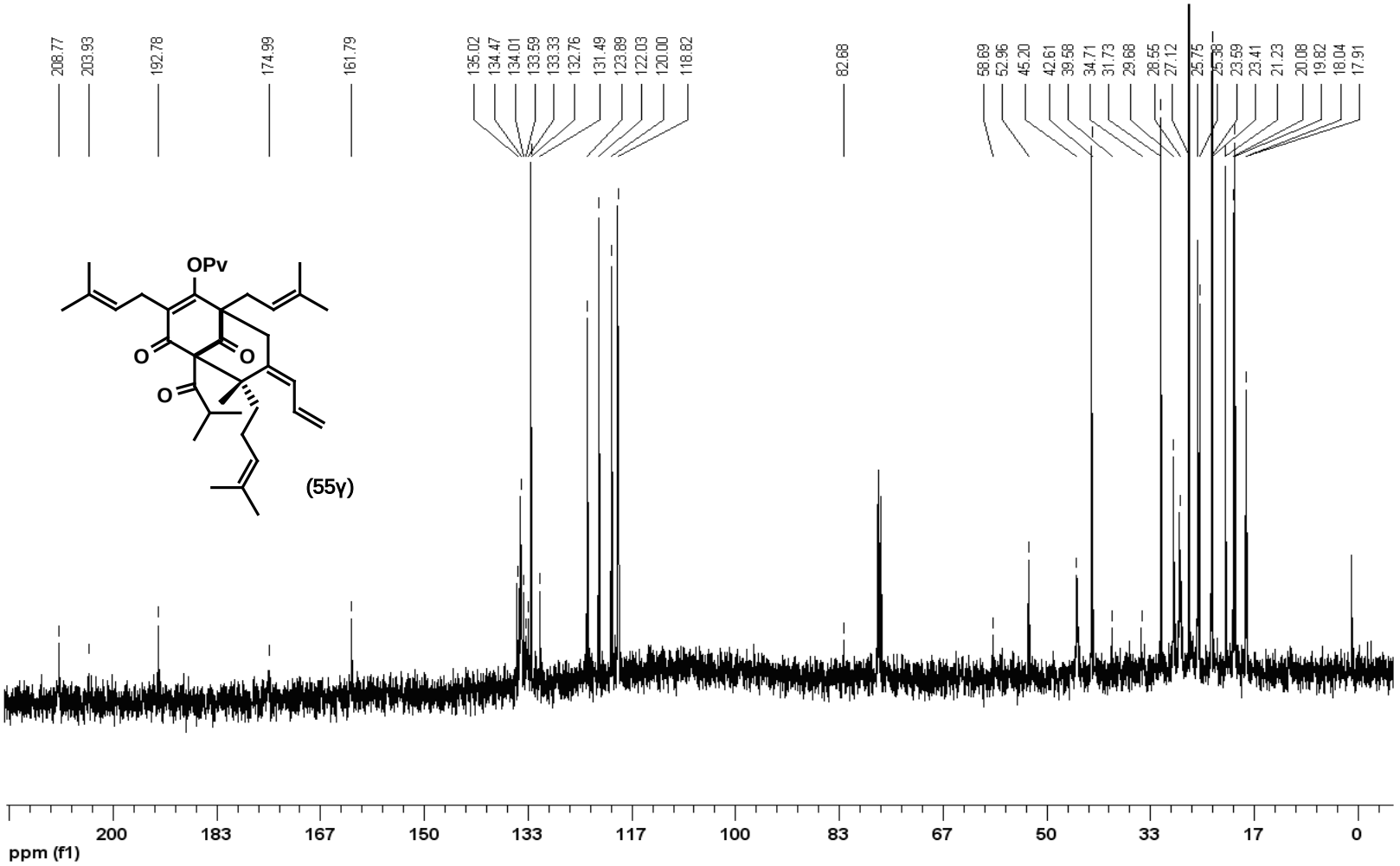

OPv
O
O
O
O
(54γ)
1.19
0.87
1.07
1.17
0.99
1.52
1.14
1.45
2.49
1.22
2.16
1.24
3.57
11.60
2.57
9.45
2.74
3.36
3.08
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (f1)

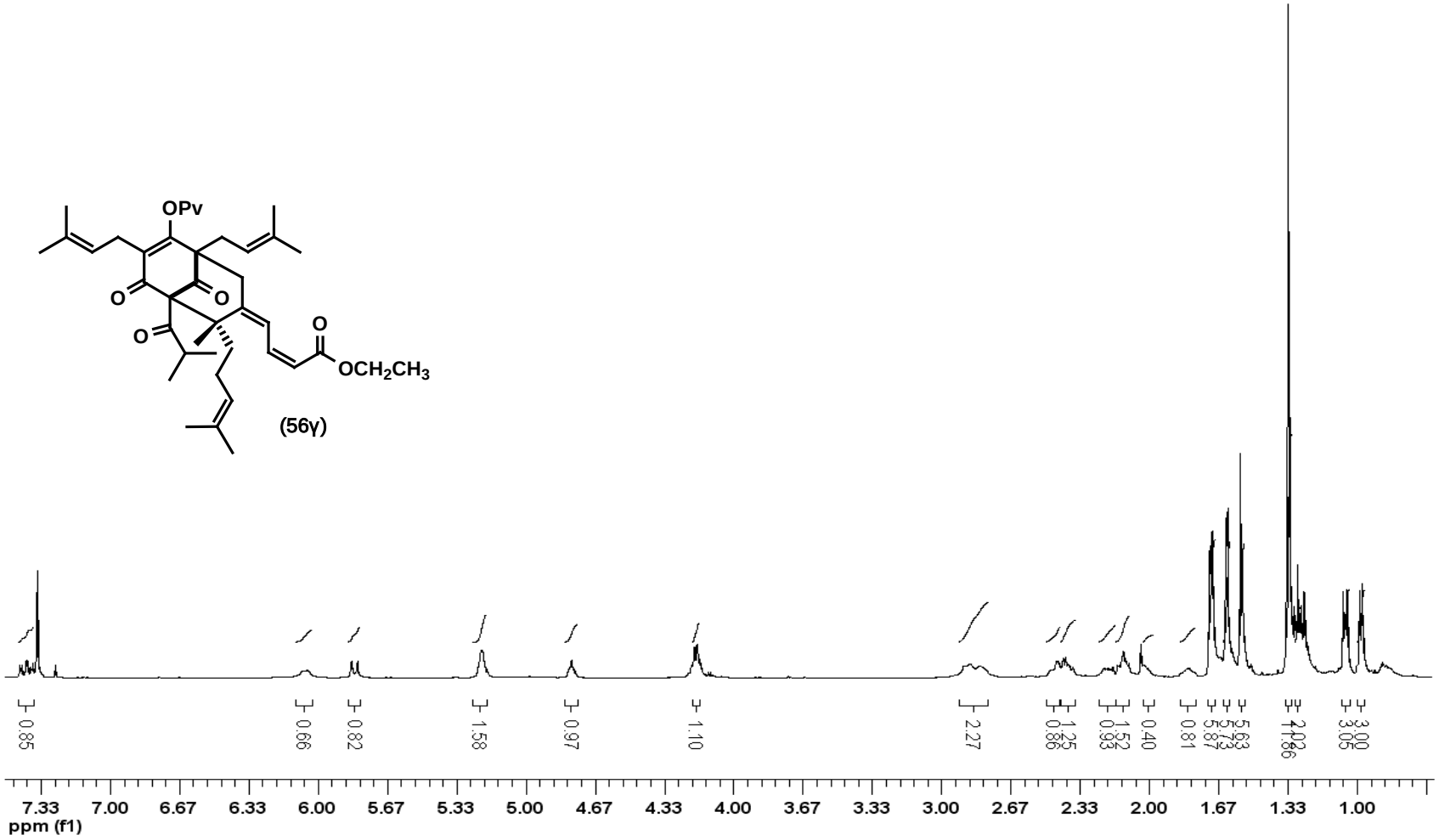

207.93
202.41
192.57
191.55
175.00
162.24
152.66
135.97
134.35
133.93
132.67
122.52
119.36
118.07
82.35
58.18
53.52
44.80
42.94
39.61
32.89
28.47
27.09
25.82
25.65
25.45
23.63
22.83
20.99
20.19
19.82
18.06
17.89
OPv
O
O
O
O
(54γ)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0
ppm (f1)

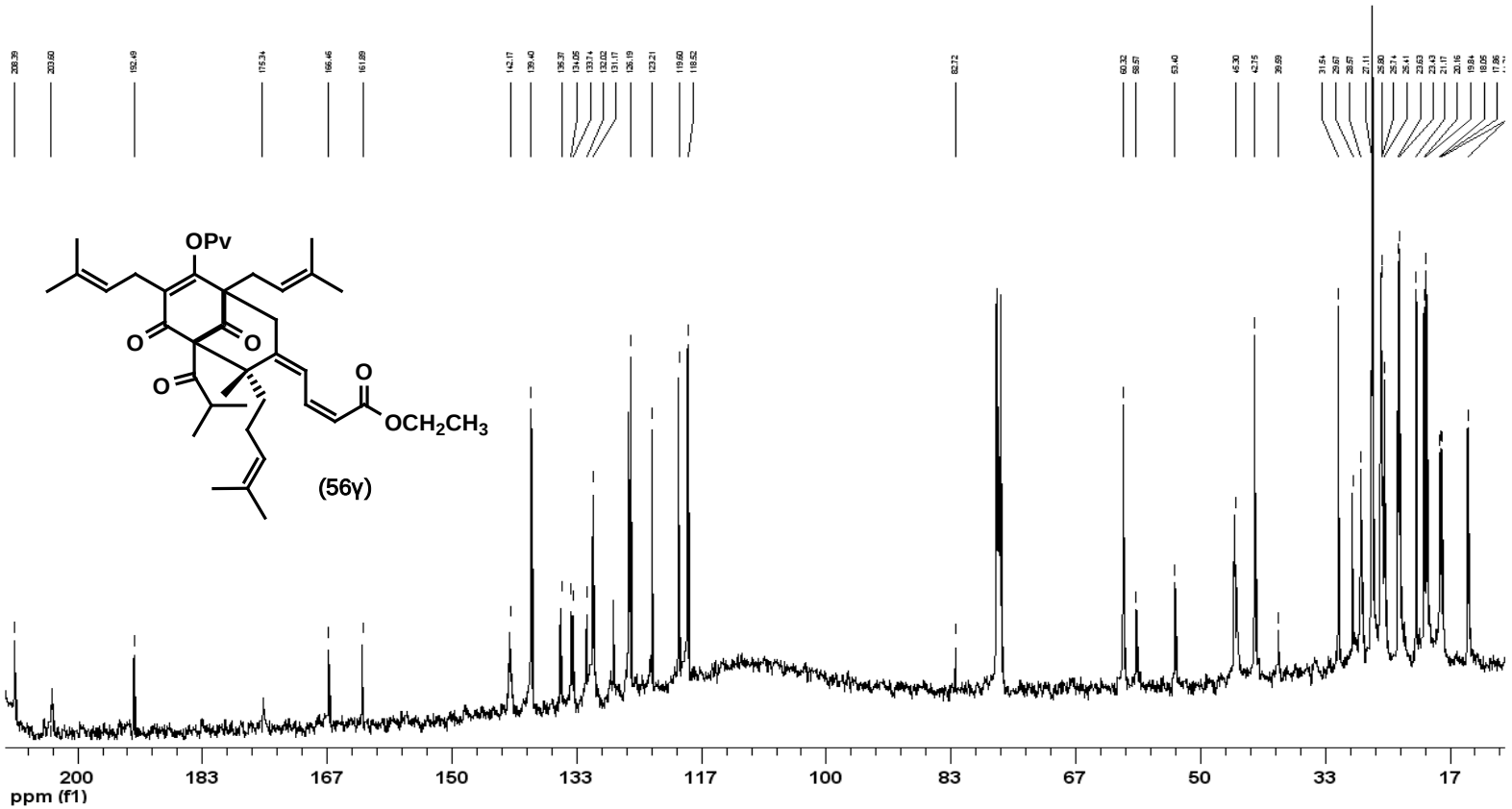

OPv
O
O
O
(55β)
0.69
1.31
3.29
1.22
1.26
2.15
1.20
1.77
2.25
1.71
0.87
1.19
3.37
3.23
13.86
2.82
2.96
6.67
6.33
6.00
5.67
5.33
5.00
4.67
4.33
4.00
3.67
3.33
3.00
2.67
2.33
2.00
1.67
1.33
1.00
ppm (f1)

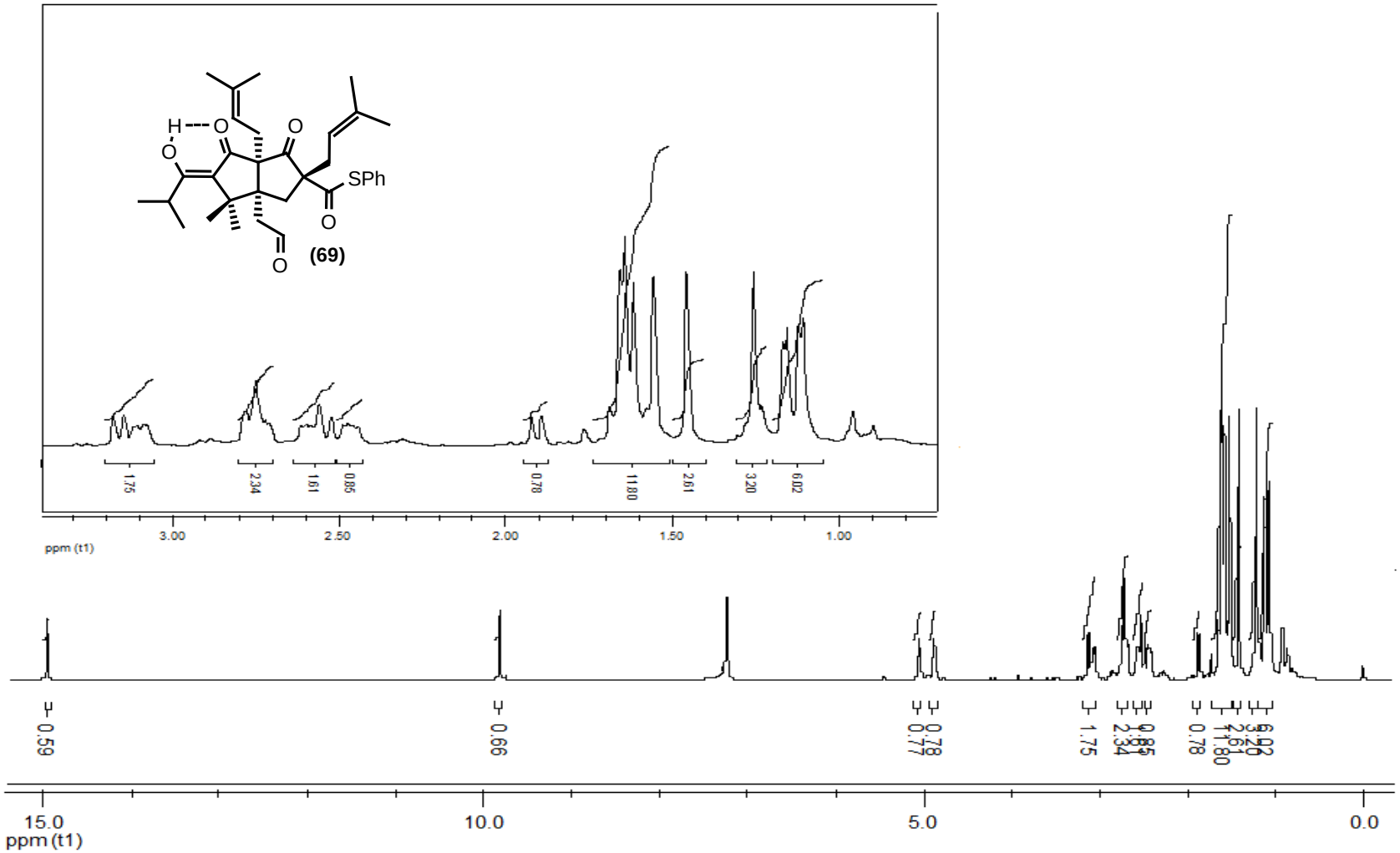

208.80
203.89
192.80
180.16
174.99
161.80
135.04
134.48
134.01
133.61
133.35
132.77
131.51
123.90
122.05
120.00
118.83
58.70
52.97
52.82
45.19
45.11
42.62
31.74
29.69
28.53
27.13
25.77
25.39
23.60
23.42
21.24
20.09
19.83
18.05
17.93
OPv
O
O
O
(55β)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0
ppm (f1)

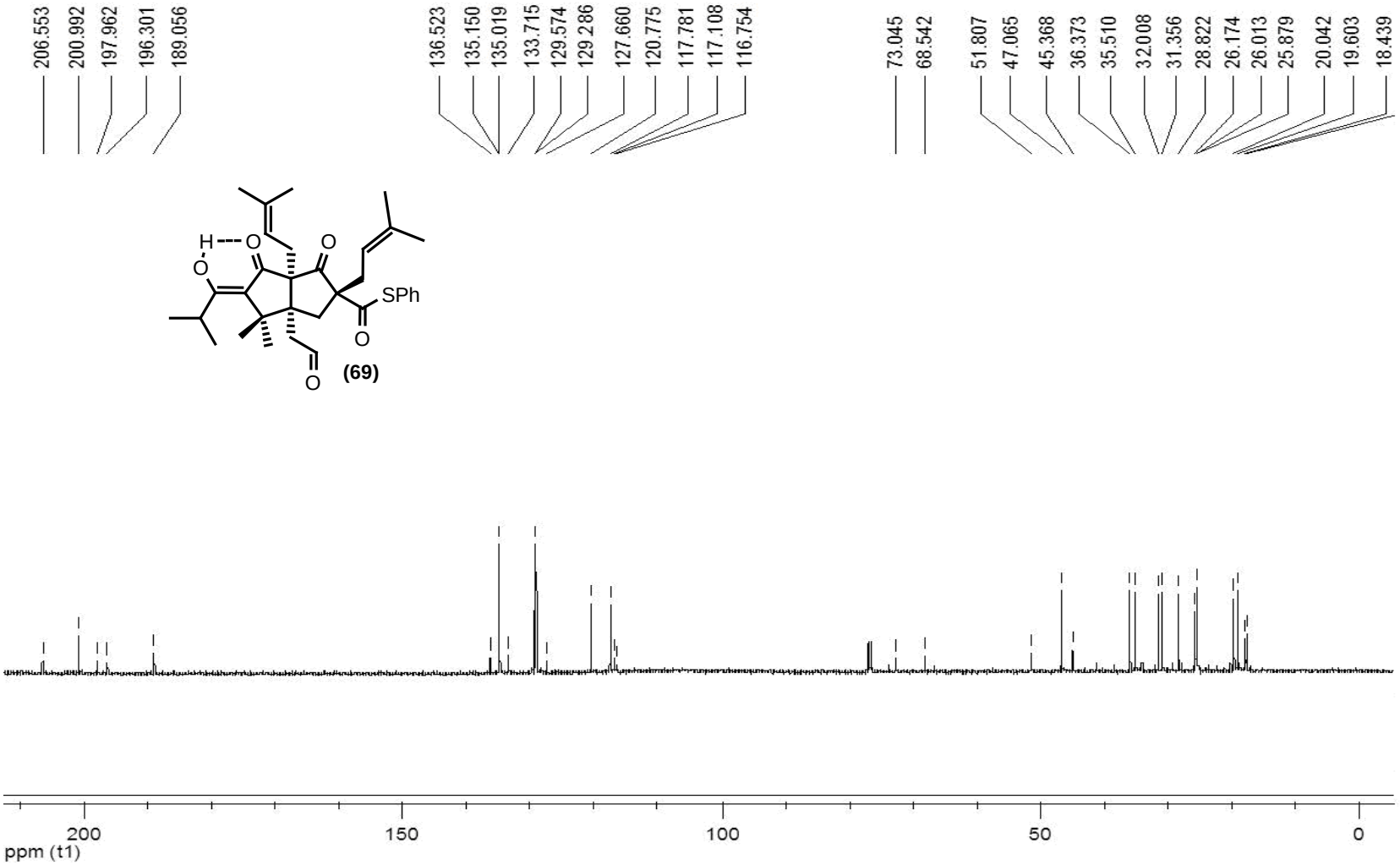

6.515
5.932
5.234
5.077
4.841
2.853
2.467
2.399
2.105
2.045
1.932
1.341
1.263
OPv
O
O
O
(55γ)
0.88
0.74
2.63
0.77
0.66
2.70
0.90
1.39
3.55
1.11
18.00
1.63
10.36
2.65
2.49
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
ppm (t1)

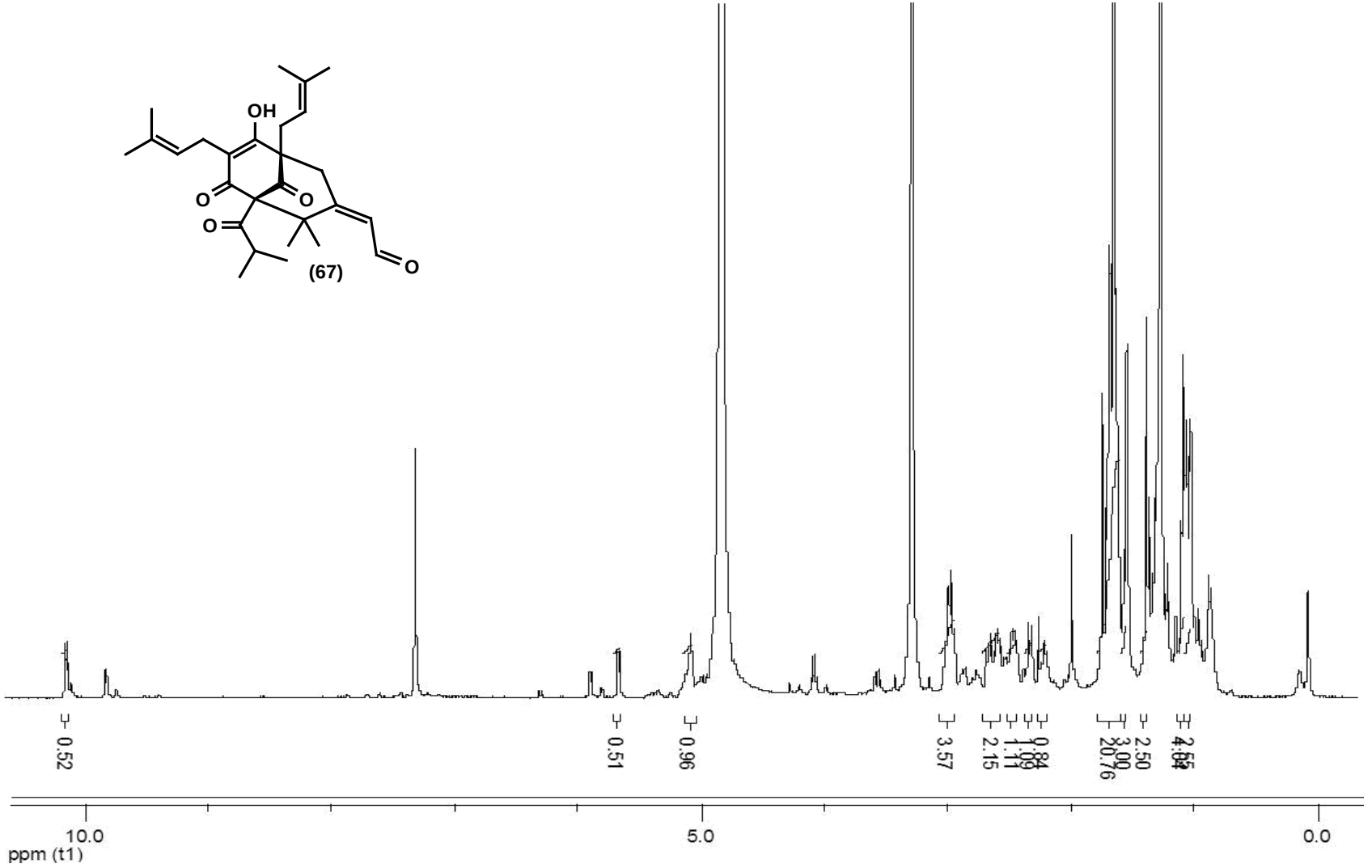

208.77
203.93
192.78
174.99
161.79
135.02
134.47
134.01
133.59
133.33
132.76
131.49
123.89
122.03
120.00
118.82
82.68
58.69
52.96
45.20
42.61
39.58
34.71
31.73
29.68
28.55
27.12
25.75
25.38
23.59
23.41
21.23
20.08
19.82
18.04
17.91
OPv
O
O
O
(55γ)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
0
ppm (f1)


OPv
O
O
O
O
OCH2CH3
(56γ)
0.85
0.66
0.82
1.58
0.97
1.10
2.27
0.86
1.25
0.93
1.52
0.40
0.81
5.87
5.73
5.63
1.86
2.02
3.05
3.00
7.33
7.00
6.67
6.33
6.00
5.67
5.33
5.00
4.67
4.33
4.00
3.67
3.33
3.00
2.67
2.33
2.00
1.67
1.33
1.00
ppm (f1)


OPv
O
O
O
O
OCH2CH3
(56γ)
200
183
167
150
133
117
100
83
67
50
33
17
ppm (f1)


H
O
O
O
SPh
O
O
(69)
1.75
2.34
1.61
0.85
0.78
11.80
2.61
3.20
6.02
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
ppm (t1)
0.59
0.66
0.78
0.77
1.75
2.34
0.85
0.78
11.80
2.61
3.20
6.02
15.0
10.0
5.0
0.0
ppm (t1)


206.553
200.992
197.962
196.301
189.056
136.523
135.150
135.019
133.715
129.574
129.286
127.660
120.775
117.781
117.108
116.754
73.045
68.542
51.807
47.065
45.368
36.373
35.510
32.008
31.356
28.822
26.174
26.013
25.879
20.042
19.603
18.439
H
O
O
O
O
SPh
O
O
(69)
200
150
100
50
0
ppm (t1)


OH
O
O
O
O
(67)
0.52
0.51
0.96
3.57
2.15
1.11
20.76
3.00
2.50
10.0
5.0
0.0
ppm (t1)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

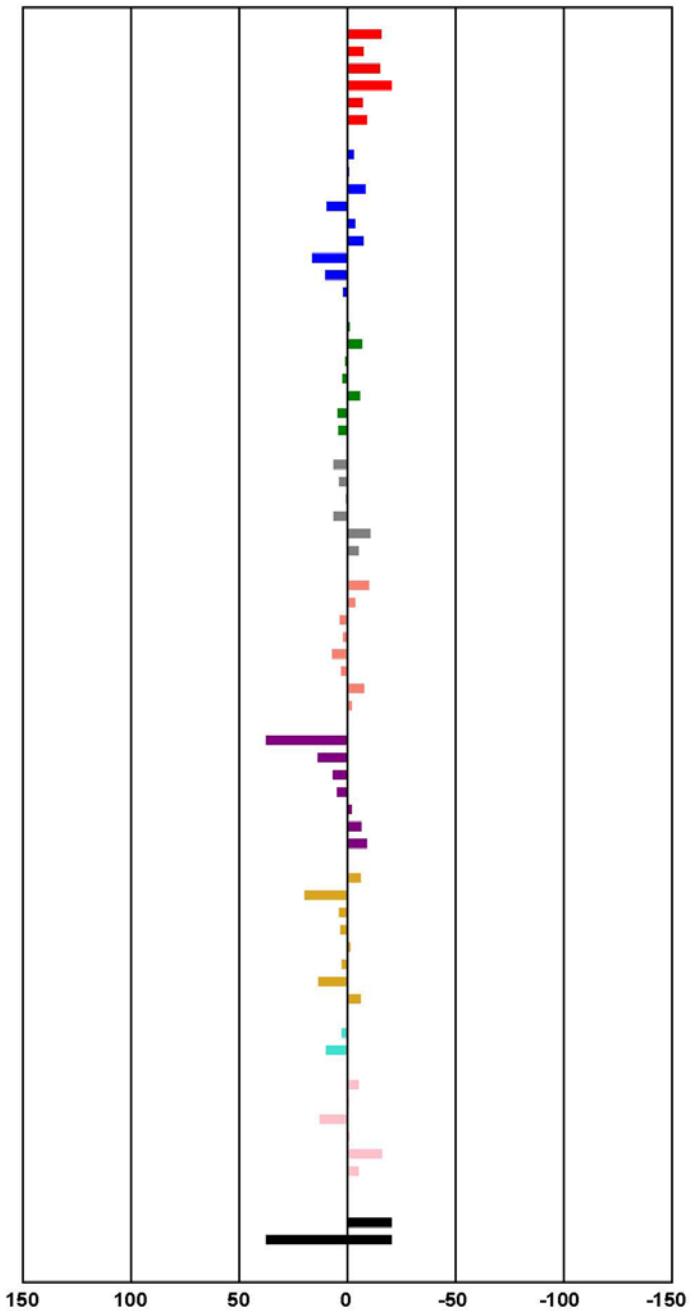
Πίνακας ΙΙ1. Αποτελέσματα του Ι Σταδίου της ένωσης (**75**)

Developmental Therapeutics Program

One Dose Mean Graph

NSC: D-754065 / 1	Conc: 1.00E-5 Molar	Test Date: Aug 16, 2010
Experiment ID: 1008OS10		Report Date: Sep 20, 2010

Panel/Cell Line	Growth Percent
Leukemia	
CCRF-CEM	91.59
HL-60(TB)	99.89
K-562	92.33
MOLT-4	86.93
RPMI-8226	100.21
SR	98.26
Non-Small Cell Lung Cancer	
A549/ATCC	104.38
EKVX	106.59
HOP-62	98.76
HOP-92	116.17
NCI-H226	103.63
NCI-H23	100.03
NCI-H322M	122.90
NCI-H460	116.63
NCI-H522	108.44
Colon Cancer	
COLO 205	106.32
HCC-2998	100.62
HCT-116	107.47
HCT-15	108.84
HT29	101.54
KM12	110.99
SW-620	110.77
CNS Cancer	
SF-268	112.87
SF-295	110.43
SF-539	107.27
SNB-19	112.86
SNB-75	96.54
U251	102.22
Melanoma	
LOX IMVI	97.34
M14	103.60
MDA-MB-435	109.90
SK-MEL-2	108.54
SK-MEL-28	113.44
SK-MEL-5	109.38
UACC-257	99.48
UACC-62	105.27
Ovarian Cancer	
IGROV1	144.15
OVCAR-3	120.21
OVCAR-4	113.36
OVCAR-5	111.16
OVCAR-8	105.26
NCI/ADR-RES	100.88
SK-OV-3	98.40
Renal Cancer	
786-0	100.99
A498	126.25
ACHN	110.38
CAKI-1	109.83
RXF 393	106.06
SN12C	109.09
TK-10	119.94
UO-31	101.00
Prostate Cancer	
PC-3	109.07
DU-145	116.25
Breast Cancer	
MCF7	102.26
MDA-MB-231/ATCC	106.69
HS 578T	119.29
BT-549	106.32
T-47D	91.15
MDA-MB-468	102.15
Mean	106.99
Delta	20.06
Range	57.22



Πίνακας ΙΙ2. Αποτελέσματα του Ι Σταδίου της ένωσης (**77**)

Developmental Therapeutics Program

One Dose Mean Graph

NSC: D-754067 / 1	Conc: 1.00E-5 Molar	Test Date: Aug 16, 2010
Experiment ID: 1008OS10		Report Date: Sep 20, 2010

Panel/Cell Line	Growth Percent
Leukemia	
CCRF-CEM	88.24
HL-60(TB)	108.26
K-562	79.08
MOLT-4	92.88
RPMI-8226	73.71
SR	105.17
Non-Small Cell Lung Cancer	
A549/ATCC	84.05
EKVX	88.14
HOP-92	84.69
NCI-H226	91.84
NCI-H23	91.19
NCI-H322M	110.67
NCI-H460	110.80
NCI-H522	86.06
Colon Cancer	
COLO 205	107.91
HCC-2998	86.72
HCT-116	89.69
HCT-15	97.07
HT29	98.30
KM12	105.07
SW-620	107.94
CNS Cancer	
SF-268	103.45
SF-295	94.70
SF-539	107.89
SNB-19	97.94
SNB-75	98.42
U251	90.07
Melanoma	
LOX IMVI	98.53
M14	103.48
MDA-MB-435	100.65
SK-MEL-2	90.43
SK-MEL-28	109.25
SK-MEL-5	92.43
UACC-257	91.94
UACC-62	72.97
Ovarian Cancer	
IGROV1	123.15
OVCAR-3	99.11
OVCAR-4	94.24
OVCAR-5	105.21
OVCAR-8	93.72
NCI/ADR-RES	88.44
SK-OV-3	92.21
Renal Cancer	
786-0	94.03
A498	115.02
ACHN	92.98
CAKI-1	94.88
RXF 393	105.58
SN12C	99.39
TK-10	106.32
UO-31	84.80
Prostate Cancer	
PC-3	81.57
DU-145	119.78
Breast Cancer	
MCF7	88.79
MDA-MB-231/ATCC	104.06
HS 578T	107.00
BT-549	105.60
T-47D	77.96
MDA-MB-468	106.86
Mean	96.90
Delta	23.93
Range	50.18