

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ,  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΝΑΝΟΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΚΕΦΕ  
«ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ &  
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ, ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:

«Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου»

Κατεύθυνση VI: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΤΟΥ  
ΕΙΔΟΥΣ *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)

ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ Π. ΜΑΚΡΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΗΛΙΑΣ Α. ΚΟΥΛΑΔΟΥΡΟΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΤΟΥ  
ΕΙΔΟΥΣ *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)**

**SYNTHESIS OF ACYLPHLOROGLUCINOL DERIVATIVES AND  
ASSESSMENT OF THEIR TOXICITY AGAINST LARVAE OF THE  
SPECIES *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)**

**Αποστολία Π. Μακρή**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Ηλίας Α. Κουλαδούρος**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<b>Ηλίας Κουλαδούρος</b>	<b>Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών</b>
<b>Βερονίκη Βιδάλη</b>	<b>Ερευνήτρια Γ', ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος</b>
<b>Δημήτριος Παπαχρήστος</b>	<b>Ερευνητής Α', Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο</b>

Στην Αννούλα

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ερευνητική αυτή εργασία αποτελεί την ολοκλήρωση του κύκλου των Μεταπτυχιακών μου Σπουδών στην Κατεύθυνση: «Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων» του Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εργασία αυτή δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς την Δρ. Βερονίκη Βιδάλη, Ερευνήτρια Γ' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Η εκπαίδευση σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο, η επιλογή του θέματος, ο σχεδιασμός των ενώσεων και η συνθετική προσέγγισή τους πραγματοποιήθηκε από την κ. Βιδάλη και η ευγνωμοσύνη μου για την υπομονή, για τις επιστημονικές συζητήσεις, για τις γνώσεις, το πάθος για τη σύνθεση, την αγάπη της και την πίστη της είναι τεράστια. Η διαχείριση συνθετικών προβλημάτων, της αποτυχίας και η χαρά της δημιουργίας είναι μαθήματα που τα κρατώ δυνατά. Παράλληλα, μου έδωσε τη δυνατότητα να συμμετέχω σε ένα διεπιστημονικό αντικείμενο έρευνας σε σχέση με την προνομφοκτόνο δράση των ενώσεων που συντέθηκαν. Για τη δυνατότητα αυτή, ευχαριστώ επίσης θερμά τον Δρ. Αντώνη Μιχαηλάκη, Ερευνητή Α' του Μ.Φ.Ι. και τον Δρ. Δημήτρη Παπαχρήστο, Ερευνητή Α' του Μ.Φ.Ι. Τους ευχαριστώ για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του Μ.Φ.Ι., για την ευκαιρία να γνωρίσω τον θαυμαστό κόσμο των εντόμων και για την καθοδήγησή τους. Τον κύριο Παπαχρήστο τον ευχαριστώ επίσης για τις κατευθύνσεις του σχετικά με τη διεξαγωγή των βιοδοκιμών, για την επίλυση αποριών και για την πολύτιμη βοήθειά του στην επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των βιοδοκιμών. Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Ηλία Κουλαδούρο. Η ματιά του στην Οργανική Χημεία και η ιδιαίτερη προσέγγισή του σε επιστημονικά ζητήματα κέντρισε το ενδιαφέρον μου και άλλαξε σημαντικά τον τρόπο με τον οποίο αντιλαμβανόμουν και αντιμετώπιζα την Επιστήμη αυτή. Τον ευχαριστώ που με εμπιστεύτηκε και που μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με τη Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων και να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές μου και ιδιαίτερα τον κύριο Χρήστο Παππά και κύριο Πέτρο Ταραντίλη για τις συζητήσεις και για το ανθρωποκεντρικό ενδιαφέρον τους πάνω στην Επιστήμη, πράγμα το οποίο αποτέλεσε για εμένα κίνητρο σημαντικό. Ευχαριστώ πολύ τον Δρ. Εμμανουήλ Πιτσινό, Ερευνητή Α' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για τη φιλοξενία που μου προσέφερε στο εργαστήριό του, τον Δρ. Γιάννη Μαυρίδη για τη βοήθειά του στα φάσματα NMR, την κυρία Μαρίνα Σαγνού, Ερευνήτρια Γ' και την Δρ. Μαρία-Δήμητρα Ουζούνη. Επίσης, ευχαριστώ πολύ

τον Βασίλη Καρρά, Τεχνολόγο Γεωπόνου και τον MSc Γεώργιο Μπαλατσό, Τεχνολόγο Υγειονολόγο, για τη βοήθειά τους στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας κατά την διεξαγωγή των βιοδοκιμών. Ευχαριστώ με την καρδιά μου την Αλεξάνδρα Παπαϊωάννου που πορευτήκαμε παρέα στο ταξίδι αυτό, τον MSc Αλέξανδρο Canko για τη βοήθειά του στη λήψη των φασμάτων NMR και τον Βαγγέλη Γεωργά. Ευχαριστώ και τους τρεις για την όμορφη συνεργασία μας και για τις ώρες που περάσαμε παρέα. Ευχαριστώ επίσης, τον Βασίλη Μουχτούρη για την πολύτιμη βοήθειά του στο ξεκίνημα της εργασίας και τον Δημήτρη Μάμαλη. Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου και ιδιαίτερα τη συγγαμική μου Μαρία που με άντεξε στις «δύσκολες» μέρες της συγγραφής της εργασίας αυτής καθώς και την Κωνσταντίνα! Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Πάνο και Έφη, τη γιαγιά Άννα που με στήριξαν με περίσσεια αγάπη και υπομονή και την Αννούλα μου, που η αγάπη της ήταν, είναι και θα είναι για πάντα μαζί μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αποστολία Μακρή

### **ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)**

Ιανουάριος, 2020

Τα κουνούπια (Diptera: Culicidae) αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα αιμομυζητικών εντόμων. Περιλαμβάνουν είδη με παγκόσμια εξάπλωση, που πέρα από την όχληση που προκαλούν στον άνθρωπο και τα ζώα, αποτελούν και διαβιβάστες σημαντικών παθογόνων μικροοργανισμών. Μεταξύ αυτών των ειδών συγκαταλέγεται και το είδος *Culex pipiens*, που αποτελεί τον κύριο διαβιβαστή του ιού του Δυτικού Νείλου. Άλλοι σημαντικοί ιοί που μπορεί να μεταδώσει είναι οι ιοί Sindbis, Usutu, Rift Valley και Tahyna που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα κατοικίδια ζώα, καθώς και το παράσιτο *Dirofilaria immitis* που προκαλεί τη φιλαρίαση του σκύλου και τυχαία μπορεί να προσβάλλει και τον άνθρωπο. Η καταπολέμηση των κουνουπιών πρέπει να στηρίζεται κατά κύριο λόγο στην προνυμφοκτονία, η οποία υλοποιείται πιο εύκολα μιας και τα ενδιαιτήματα είναι πιο προσβάσιμα. Έχει ως στόχο τη διατήρηση του κινδύνου μετάδοσης των ασθενειών χαμηλό, καταπολεμώντας ένα σημαντικό τμήμα του πληθυσμού των κουνουπιών-φορέων πριν την ενηλικίωση και τη διασπορά τους. Η χρήση των συμβατικών συνθετικών, οργανικών εντομοκτόνων, αν και αποτέλεσε αποτελεσματικό μέσο καταπολέμησης των προνυμφών, συνοδεύτηκε από μειονεκτήματα, όπως μη αναστρέψιμες επιπτώσεις στο περιβάλλον, ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων σε αυτά και τοξικότητα στους ανθρώπους και σε ωφέλιμους οργανισμούς. Σήμερα μόνο μία συνθετική δραστική ουσία, το diflubenzuron που είναι ένας ρυθμιστής της ανάπτυξης των εντόμων έχει έγκριση για την καταπολέμηση προνυμφών των κουνουπιών. Η ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων και νέων εντομοκτόνων, φιλικότερων στο περιβάλλον και στη ζωή, στρέφει την επιστημονική κοινότητα προς αυτή την κατεύθυνση. Τα εντομοκτόνα βοτανικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκαν παραδοσιακά για χρόνια και η ανάπτυξη νέων βιοεντομοκτόνων που προέρχονται από φυτά αποτελεί και πάλι βασικό μέλημα της έρευνας. Τα φυσικά προϊόντα είναι ενώσεις που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς, κυρίως για την προστασία τους από παθογόνα, αρπακτικά ή ανταγωνιστές. Σε αντίθεση με τα συμβατικά συνθετικά χημικά, τα φυσικά προϊόντα έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής στο περιβάλλον, βιοαποικοδομούνται και είναι συνήθως πιο ασφαλή, με μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η σύνθεση οργανικών μορίων με βελτιωμένη βιοδραστικότητα σε σχέση με το φυσικό προϊόν δεοξυκοχομουλόνη, μια μονοκυκλική διπρενυλιωμένη ισοβουτυρο-φλωρογλυκινόλη, η οποία συντέθηκε και διερευνήθηκε η τοξικότητά της έναντι προνυμφών του είδους *Culex ripiens* το 2014 ( $LC_{50}$  51.03 mg/L) (Mitsopoulou et al., 2014). Τα μόρια που σχεδιάστηκαν σχετίζονταν με την παραγοντοποίηση της δεοξυκοχομουλόνης με πρενυλικές, γερανυλικές ή άλλες αλυσίδες, τη σύνθεση άλλων ακυλοφλωρογλυκινολών μέσω της αντίδρασης Friedel Crafts καθώς και την C-αλκυλίωσή τους με πρενυλ-/γερανυλομάδες για τον έλεγχο της προνυμφοκτόνου δράσης τους έναντι των προνυμφών του είδους *Culex ripiens*. Πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η σύνθεση τριών διγερανυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών, των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα. Κατά την C-αλκυλίωση της 2-ισοβουτυρο-φλωρογλυκινόλης, ανάλογα με τις συνθήκες pH, τα αλκυλιωτικά μέσα και τα ισοδύναμά τους, ο βαθμός της υποκατάστασης αλλάζει. Όσον αφορά τις βιοδοκιμές, μελετήθηκε η μεταβολή της θνησιμότητας σε συνάρτηση με τη μεταβολή της δόσης κάθε ένωσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φλωρογλυκινόλη και οι ακυλιωμένες φλωρογλυκινόλες δεν έχουν τοξική δράση έναντι των προνυμφών ( $LC_{50} > 150$  mg/L). Αντιθέτως, τα διγερανυλιωμένα παράγωγά τους και η κολουπουλόνη, φυσικό προϊόν, συστατικό του λυκίσκου (*Humulus lupulus*) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά μέσα αντιμετώπισης των προνυμφών με βελτιωμένη δράση σε σχέση με την δεοξυκοχομουλόνη, με  $LC_{50}$  που κυμαίνεται από 17.1 έως 28.4 mg/L.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων • Τοξικότητα σε προνύμφες κουνουπιών

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** φυσικά προϊόντα • *Humulus lupulus* • *Culex ripiens* • προνύμφες • προνυμφοκτόνος δράση • φλωρογλυκινόλη • ακυλοφλωρογλυκινόλη • Friedel Crafts • C-αλκυλίωση • δεοξυκοχομουλόνη • κολουπουλόνη

## ABSTRACT

Apostolia Makri

### **SYNTHESIS OF ACYLPHLOROGLUCINOL DERIVATIVES AND ASSESSMENT OF THEIR TOXICITY AGAINST LARVAE OF THE SPECIES *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae)**

January, 2020

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are characterized as the largest group of blood-sucking insects. Mosquito species are distributed widely throughout the world. Apart from being annoying, they are important vectors of pathogenic microorganisms. *Culex pipiens* mosquitoes have been identified as the major vector species for West Nile virus. Other *Culex pipiens*-transmitted pathogens are the viruses Sindbis, Usutu, Rift Valley and Tahyna that affect both human and animal health and the parasite *Dirofilaria immitis* which causes filariasis in dogs but it can also infect humans. Mosquito control needs to be focused on the larval stage. Larviciding is easier, as the accessibility of larvae's habitat is more feasible. This aims at the reduction of the transmission of diseases at low levels, by managing a significant part of the vectors' population before adulthood and dispersal. The conventional, synthetic, organic insecticides provide immediate results for the control of mosquitoes; however they are accompanied by numerous drawbacks, such as irreversible environmental damage, development of resistance and toxicity against humans and beneficial organisms. Nowadays, the only synthetic active compound, which has been approved for larvicidal control is diflubenzuron, an Insect Growth Regulator. Due to the great need for new, greener and safer approaches and insecticides, research is moving towards this direction. Insecticides of botanical origin have been traditionally used for a long period of time. Thus, the development of new bioinsecticides, which are naturally occurring substances, are again a crucial issue of research community. Some organisms produce compounds in order to defend themselves from other organisms, such as pathogens, predators or antagonists. These compounds are called natural products. Contrary to conventional synthetic insecticides, natural products have a shorter environmental half life, they are biodegradable and they usually have a lower environmental impact.

The purpose of this study was the synthesis of organic molecules with improved bioactivity, compared to the natural product deoxycomomulone, a monocyclic diprenylated isobutyryl phloroglucinol, which was synthesized and evaluated for its



larvicidal activity against *Culex pipiens* in 2014 (LC<sub>50</sub> 51.03 mg/L) (Mitsopoulou et al., 2014). The designed molecules were related to the derivatization of isobutyryl phloroglucinol with prenyl, geranyl, or other chains, the synthesis of other acylphloroglucinols *via* a Friedel Crafts reaction and their further prenylation and geranylation in order to assess the toxicity against larvae of *Culex pipiens*. Three digeranylated acylphloroglucinols were synthesized and tested for their larvicidal activity for the first time. The degree of substitution changes during C-alkylation of isobutyrylphloroglucinol, depending on pH conditions, alkylating agents and their equivalents. Concerning the bioassays, the variation in mortality, with respect to the variation in dose of each compound, was studied. Study results indicate that phloroglucinol and acylphloroglucinols have no larvicidal activity (LC<sub>50</sub>>150 mg/L). However, the digeranylated derivatives and colupulone, a natural product from *Humulus lupulus*, could be used as alternative ways of larviciding, with an improved bioactivity compared to deoxycohumulone, with LC<sub>50</sub> values ranging from 17.1 to 28.4 mg/L.

**SUBJECT AREA:** Synthesis of bioactive compounds • Larval Toxicity

**KEYWORDS:** natural products • *Humulus lupulus* • *Culex pipiens* • larvae • larvicidal activity • phloroglucinol • acylphloroglucinol • Friedel Crafts • C-alkylation • deoxycohumulone • colupulone

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ.....	xii
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	1
A.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Culicidae .....	2
A.1.1. Ταξινόμηση .....	2
A.1.2. Βιολογικός Κύκλος.....	3
A.1.2.1. Ωά .....	3
A.1.2.2. Προνύμφες.....	4
A.1.2.3. Νύμφες.....	4
A.1.2.4. Ακμαία .....	5
A.1.3. Κουνούπια και Οικοσύστημα.....	6
A.1.4. Υγειονομική Σημασία.....	7
A.1.4.1. Νοσήματα Μεταδιδόμενα με Διαβιβαστές (VBD).....	7
A.1.4.2. Εγκατάσταση μη ιθαγενών ειδών. Αύξηση πληθυσμών και VBD .....	8
A.2. ΤΟ ΕΙΔΟΣ <i>Culex pipiens</i> .....	9
A.2.1. Σύμπλεγμα <i>Culex pipiens</i> .....	10
A.2.2. Μορφολογία και Βιολογία <i>Culex pipiens</i> .....	11
A.2.3. Μετάδοση παθογόνων μέσω του είδους <i>Culex pipiens</i> .....	12
A.2.3.1. Ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) .....	12
A.3. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ .....	14
A.3.1. Εντομοκτόνα .....	15
A.3.1.1. Συνθετικά Εντομοκτόνα .....	17
A.3.1.1.1. Οργανοχλωριωμένα (OCs).....	18
A.3.1.1.2. Οργανοφωσφορικά (OPs) .....	18
A.3.1.1.3. Καρβαμιδικά.....	18
A.3.1.1.4. Πυρεθροειδή .....	19
A.3.1.1.5. Νεονικοτινοειδή.....	19

A.3.1.2. Ρυθμιστές Ανάπτυξης Εντόμων (IGRs).....	21
A.3.1.3. Εντομοκτόνα και Επιπτώσεις .....	22
A.3.1.3.1. Επιπτώσεις στην Ανθρώπινη Υγεία.....	22
A.3.1.3.2. Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις.....	23
A.3.1.3.3. Ανθεκτικότητα .....	23
A.3.2. Προνυμφοκτονία.....	24
A.3.2.1. Περιορισμός-Εξάλειψη Εστιών Ανάπτυξης .....	25
A.3.2.2. Βιολογική Αντιμετώπιση.....	25
A.3.2.2.1. Φυσικοί Εχθροί.....	26
A.3.2.2.2. Βιολογικά Παρασκευάσματα.....	27
A.3.2.3. Μονομοριακά φιλμ με βάση την σιλικόνη .....	28
A.3.2.4. Εγκεκριμένα Βιοκτόνα.....	29
A.3.3. Ακμαιοκτονία.....	29
A.3.3.1. Βιολογική Αντιμετώπιση.....	29
A.3.3.2. Τεχνική Εξαπόλυσης Στείρων Εντόμων (SIT) .....	30
A.3.3.3. Παγίδες και Ελκυστικά .....	31
A.3.3.4. Χημική Αντιμετώπιση .....	32
A.3.3.4.1. Υπολειμματικοί Ψεκασμοί.....	32
A.3.3.4.2. Ψεκασμοί ανοιχτού χώρου με σκευάσματα υπέρμικρου όγκου (UVL) από εδάφους ή αέρος.....	32
A.3.3.5. Ατομική Προστασία .....	33
A.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ ΔΡΑΣΗ.....	35
A.4.1. Το φυσικό προϊόν δεοξυκοχουμουλόνη (1).....	37
A.4.2. Δευτερογενείς Μεταβολίτες Λυκίσκου.....	37
B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	41
B.1. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ .....	42
B.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥΣ .....	43
B.3. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΟΝΥΜΦΟΚΤΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ .....	47
B.3.1. Εκτροφή .....	48
B.3.2. Υλικά Πειράματος Προνυμφοκτονίας.....	49
B.3.3. Μέθοδος Βιοδοκιμής .....	50
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
Γ.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΚΥΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΗΣ (4) .....	54

Γ.1.1. Αντιδράσεις ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4).....	54
Γ.1.2. Σύνθεση ακυλοχλωριδίου.....	57
Γ.1.3. Σύνθεση ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών .....	58
Γ.1.4. Σταθερότητα ακυλοφλωρογλυκινολών.....	61
Γ.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ .....	62
Γ.2.1. Ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης .....	62
Γ.2.2. Σχηματισμός ενολικού ανιόντος.....	64
Δημιουργία δεσμού C-C μέσω αλκυλίωσης πυρηνόφιλου άνθρακα.....	64
Γ.2.3. Σύνθεση των φυσικών προϊόντων δεοξυκοχουμουλόνη (1), κολουπουλόνη (3) και κολουπόνη (14) .....	67
Γ.2.4. Προσπάθεια σύνθεσης δι-αλκυλιωμένων παραγώγων ακυλοφλωρογλυκινολών .....	68
Γ.2.5. C-γερανυλίωση ακυλοφλωρογλυκινολών.....	70
Γ.2.6. Παραγοντοποίηση της δεοξυκοχουμουλόνης (1).....	76
Γ.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ <i>Culex pipiens</i> .....	78
Γ.3.1. Στατική Ανάλυση.....	78
Γ.3.2. Τοξική Δράση .....	78
Γ.3.3. Συμπεράσματα Βιοδοκιμών .....	80
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	83
Ε. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	85
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86
Ζ. ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ.....	101
Ζ.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ .....	101
Ζ.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ .....	102
Η. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	117

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Κρούσματα λοίμωξης από τον WNV για τα έτη 2010-2018 στην Ελλάδα.	13
Πίνακας 1.2. Χημικές δομές και κατηγορίες συνθετικών εντομοκτόνων.	20
Πίνακας 1.3. Εντομοαπωθητικά και χημικές δομές.	34
Πίνακας 3.1. Σταθερότητα ενώσεων (5) ως (8) ανάλογα με τη θερμοκρασία και το pH σε ½ ώρα.	62
Πίνακας 3.2. Περιπτώσεις στις οποίες ευνοείται η ενολική μορφή.	63
Πίνακας 3.3. Συσχέτιση των πρενυλιωμένων παραγώγων της (5) με το pH της αντίδρασης.	68
Πίνακας 3.4. Δοκιμές πρενυλίωσης της (6).	69
Πίνακας 3.5. Συσχέτιση των γερανυλιωμένων παραγώγων της (5) με το pH της αντίδρασης.	74
Πίνακας 3.6. Τιμές των δεικτών LC <sub>50</sub> και LC <sub>90</sub> για τις ενώσεις των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα σε προνύμφες 3 <sup>ης</sup> -4 <sup>ης</sup> ηλικίας του είδους <i>Culex ripiens</i> .	79

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Ισομερείωση των α-πικρών οξέων.	39
Σχήμα 1.2. Βιοσύνθεση ακυλοφλωρογλυκινολών.	39
Σχήμα 1.3. Βιοσύνθεση της δεοξυκοχουμουλόνης (1).	40
Σχήμα 2.1. Γενικό σχήμα αντιδράσεων σύνθεσης C-αλκυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών.	44
Σχήμα 3.1. Γενικό σχήμα ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4).	54
Σχήμα 3.2. C-ακυλίωση της φλωρογλυκινόλης (4).	55
Σχήμα 3.3. Προτεινόμενος μηχανισμός C-ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4) μέσω της αντίδρασης Friedel Crafts.	56
Σχήμα 3.4. Αναδιάταξη Fries.	56
Σχήμα 3.5. Σύνθεση του c-προπανοϋλο-χλωριδίου (22).	57
Σχήμα 3.6. Μηχανισμός σύνθεσης c-προπανοϋλο-χλωριδίου (22).	57
Σχήμα 3.7. Σύνθεση της 2-ισοβουτυρο-φλωρογλυκινόλης (5).	58
Σχήμα 3.8. Σύνθεση της 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (6).	58
Σχήμα 3.9. Σύνθεση της 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλης (7).	59
Σχήμα 3.10. Σύνθεση της 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλης (8).	60
Σχήμα 3.11. Αδυναμία σύνθεσης της 2-πιβαλοϋλο-φλωρογλυκινόλης (9).	60
Σχήμα 3.12. Έλεγχος σταθερότητας ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών σε διαφορετικές τιμές pH.	62
Σχήμα 3.13. Ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης.	63
Σχήμα 3.14. Δομές συντονισμού του ενολικού ανιόντος.	64
Σχήμα 3.15. C- και O-αλκυλίωση.	64
Σχήμα 3.16. C-ακυλίωση φαινολικού ανιόντος.	66
Σχήμα 3.17. Σύνθεση της δεοξυκοχουμουλόνης (45).	67

Σχήμα 3.18. Σύνθεση της κολουπουλόνης (3) και κολουπόνης (14).....	68
Σχήμα 3.19. Ταυτομερείς μορφές κολουπουλόνης (3). .....	68
Σχήμα 3.20. Αδυναμία σύνθεσης της 4,6-δι-πρενυλο-2-σ-προπανοϋλο- φλωρογλυκινόλης (12).....	69
Σχήμα 3.21. Σύνθεση του τετραπρενυλιωμένου παραγώγου (23). .....	69
Σχήμα 3.22. Αδυναμία σύνθεσης της 4,6-διαλλυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (11). .....	70
Σχήμα 3.23. Σύνθεση του γερανυλοβρωμιδίου (25). .....	70
Σχήμα 3.24. Μηχανισμός Μετεστεροποίησης.....	71
Σχήμα 3.25. Μηχανισμός βρωμίωσης της αλκοόλης (24). .....	71
Σχήμα 3.26. Σύνθεση του αναλόγου της κολουπόνης (15). .....	72
Σχήμα 3.27. Σύνθεση του τριγερανυλιωμένου (20) και τετραγερανυλιωμένου παραγώγου (21).....	73
Σχήμα 3.28. Σύνθεση του τετραγερανυλιωμένου παραγώγου (21).....	73
Σχήμα 3.29. Σύνθεση της 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (19).....	74
Σχήμα 3.30. Σύνθεση διγερανυλιωμένων παραγώγων ακυλοφλωρογλυκινολών.....	75
Σχήμα 3.31. Σύνθεση της τριμεθυλο-δεοξυκοχουμουλόνης (10). .....	76
Σχήμα 3.32. Αδυναμία σύνθεσης της κοχουμουλόνης (2).....	76
Σχήμα 3.33. Αδυναμία σύνθεσης του C-καρβοξυμεθυλιωμένου παραγώγου της δεοξυκοχουμουλόνης (13).....	77

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Ac, ακετυλο-

AcOEt, οξικός αιθυλεστέρας

Ae., *Aedes*

br, ευρεία

B.s., *Bacillus sphaericus*

B.t.i., *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*

c-, κυκλο-

CL, όρια εμπιστοσύνης

<sup>13</sup>C NMR, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός του <sup>13</sup>C

CPCA, κυκλοπροπανοϊκό οξύ

CSIs, αναστολείς σύνθεσης χιτίνης

Cx., *Culex*

d, διπλή

DCM, διχλωρομεθάνιο

DDT, π, π'-διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιο

DMF, N, N-διμεθυλοφορμαμίδιο

DMSO, διμεθυλοσουλφοξείδιο

Et<sub>3</sub>N, τριαιθυλαμίνη

Et<sub>2</sub>O, διαιθυλαιθέρας

EtOH, αιθανόλη

GABA, γ-αμινο-βουτυρικό οξύ

<sup>1</sup>H NMR, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός του <sup>1</sup>H

IGRs, ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων

IRS, υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών χώρων

JE, ίος της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας

JHAs, συνθετικά ανάλογα ορμονών νεότητας

JHs, ορμόνες νεότητας

LC<sub>50</sub>, συγκέντρωση ένωσης η οποία θανατώνει το 50% του πληθυσμού

LC<sub>90</sub>, συγκέντρωση ένωσης η οποία θανατώνει το 90% του πληθυσμού

LTA, οξικός μόλυβδος (IV)

m, πολλαπλή

MeOH, μεθανόλη

MMF, μονομοριακά φιλμ που βασίζονται στη σιλικόνη

MsCl, χλωρίδιο του μεθυλοσουλφονικού οξέος  
OCs, οργανοχλωριωμένα  
OPs, οργανοφωσφορικά  
p-, παρα-  
PAHs, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες  
PBO, πιπερονυλοβουτοξειδίο  
PDMSs, πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο  
PTTH, προθωρακικοτρόπος ορμόνη  
SIT, τεχνική εξαπόλυσης στειρών εντόμων  
tBuOOH, tert-Butyl hydroperoxide  
THF, τετραϋδροφουράνιο  
TLC, χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας  
UVL, σκευάσματα υπέρμικρου όγκου  
VBD, νοσήματα μεταδιδόμενα με διαβιβαστές  
VOCs, πτητικές οργανικές ενώσεις  
WNV, ιός του Δυτικού Νείλου  
B.E., βαθμοί ελευθερίας  
ΚΝΣ, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα  
ΜΠΑ, Μονοκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες



## **A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ**

## A.1. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ Culicidae

### A.1.1. Ταξινόμηση

Με την ονομασία «κουνούπια» ονομάζουμε τα έντομα της Οικογένειας Culicidae, η οποία περιλαμβάνει 3556 είδη (Tandina et al., 2018) και έχουν χαρακτηριστεί ως «τα έντομα με τη σπουδαιότερη υγειονομική σημασία». Η Οικογένεια Culicidae ανήκει στην Συνομοταξία των Αρθρόποδων (Arthropoda), στην Ομοταξία των Εντόμων (Insecta) και στην Τάξη των Διπτέρων (Diptera), όνομα που οφείλεται στην παρουσία ενός μόνο ζεύγους μεμβρανωδών πτερύγων στο μεσοθώρακα. Το δεύτερο ζεύγος πτερύγων έχει μετατραπεί, κατά τη διαδικασία της εξέλιξης, σε «αλτήρες», ένα ζεύγος ροπαλοειδών οργάνων (Τζανακάκης, 1995). Τα Δίπτερα, μια από τις μεγαλύτερες Τάξεις εντόμων σε αριθμό ειδών και η μεγαλύτερη από άποψη υγειονομικής σημασίας, ταξινομικά διαιρούνται σε δύο Υποτάξεις, στα Βραχύκερα (Brachycera) και στα Νηματόκερα (Nematocera). Τα Νηματόκερα, στα οποία ανήκουν και τα Culicidae, οφείλουν το όνομά τους στις νηματοειδείς κεραίες (Becker et. al., 2010).

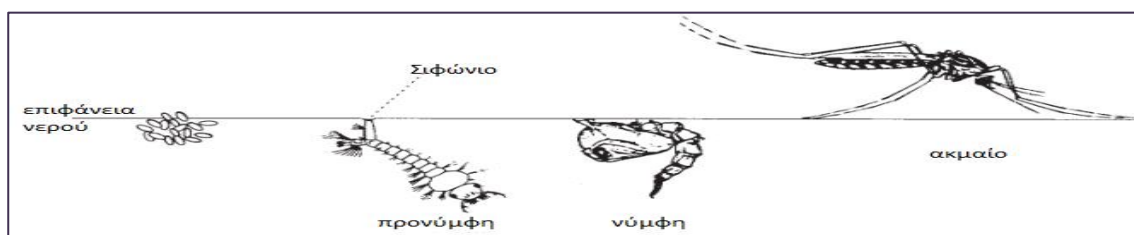
Η οικογένεια Culicidae είναι ευρέως διαδεδομένη στον πλανήτη και τα είδη της ταξινομούνται σε δυο Υποοικογένειες, την Υποοικογένεια Culicinae και την Υποοικογένεια Anophelinae (ανωφελή). Τα κουνούπια με τη μεγαλύτερη υγειονομική σημασία ανήκουν στα γένη *Anopheles*, *Aedes* και *Culex* (Tandina et al., 2018) (Εικόνα 1.1.). Το γένος *Anopheles* είναι το σημαντικότερο γένος της Υποοικογένειας Anophelinae, περιλαμβάνει πάνω από 450 είδη με τα πιο σημαντικά τα *Anopheles gambiae* και *Anopheles funestus*. Στην Υποοικογένεια Culicinae ανήκουν πάνω από 40 γένη. Ορισμένα από τα σημαντικότερα είδη, από άποψη υγειονομικής σημασίας, του γένους *Aedes* είναι τα είδη *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* (Ασιατικό κουνούπι τίγρης) και του γένους *Culex* το είδος *Culex pipiens* -κοινό κουνούπι- το οποίο έχει παγκόσμια διάδοση (Berenger and Parola, 2017).



**Εικόνα 1.1.** Είδη κουνουπιών (1) *Anopheles gambiae* (2) *Aedes aegypti* (3) *Aedes albopictus* (4) *Culex p. pipiens*.

### A.1.2. Βιολογικός Κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του κουνουπιού περιλαμβάνει τέσσερα στάδια ανάπτυξης το ωό, την προνύμφη, τη νύμφη και τέλος το ενήλικο (Εικόνα 1.2.). Η διάρκεια του βιολογικού κύκλου των κουνουπιών εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία και ολοκληρώνεται σε διάστημα 2-4 εβδομάδων, ανάλογα με το είδος και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Πηγή 1). Το ενήλικο θηλυκό, μετά τη γονιμοποίηση από το αρσενικό και τη λήψη αίματος που είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των ωών, εναποθέτει τα ωά του σε κατάλληλη για το είδος υδάτινη εστία, όπου μετά από κάποιο χρόνο εκκολάπτονται σε προνύμφες (Rozendaal, 1997). Οι προνύμφες αφού συμπληρώσουν την ανάπτυξή τους και μετά από τέσσερις εκδύσεις (προνυμφικές ηλικίες), μεταμορφώνονται σε νύμφες και από αυτές μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, ανάλογα με τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες, εξέρχονται τα ενήλικα έντομα. Σύντομα και πριν απομακρυνθούν από τις εστίες ανάπτυξής τους, τα θηλυκά συζευγνύονται με τα αρσενικά και ο κύκλος επαναλαμβάνεται.

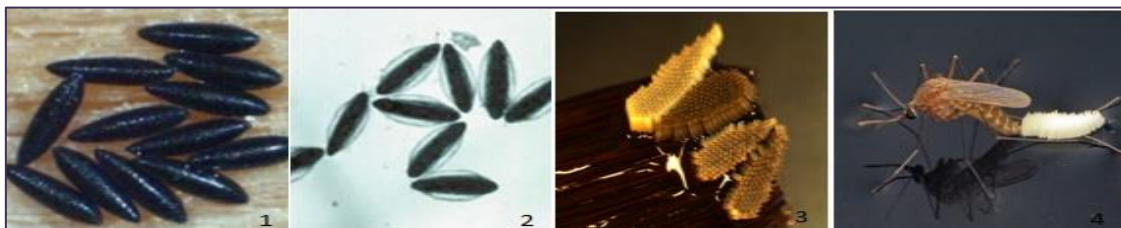


Εικόνα 1.2. Βιολογικός κύκλος κουνουπιού.

#### A.1.2.1. Ωά

Το θηλυκό κουνούπι εντοπίζει μία κατάλληλη εστία ύδατος και αφήνει τα ωά του, τα οποία κυμαίνονται από 100 έως 500 σε κάθε γονοτροφικό κύκλο. Τα ωά που τοποθετούνται άμεσα στην επιφάνεια του νερού εκκολάπτονται σε 1-3 ημέρες, χρόνος που εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Ορισμένα είδη τοποθετούν τα ωά τους σε υγρό χώμα ή σε άλλο υγρό υπόστρωμα όπως σε κορμούς δένδρων, όμως ο χρόνος επώασης ποικίλλει, αφού τα ωά αυτά θα εκκολαφθούν όταν κατακλυστούν από νερό (Πηγή 1). Είναι πολύ ευαίσθητα στην ξηρασία. Σε τροπικά κλίματα η εκκόλαψη διαρκεί πολύ λιγότερο από ότι σε ψυχρότερες και ξηρότερες περιοχές. Τα ωά κάποιων ειδών είναι πολύ πιο ανθεκτικά σε αντίξοες συνθήκες με χαρακτηριστικό παράδειγμα εκείνα του γένους *Aedes* που μπορούν να παραμείνουν αφυδατωμένα για μήνες, ακόμη και χρόνια και να εκκολαφθούν μόλις βραχούν. Είναι επιμήκη, μικροσκοπικά (έως 1 mm), ποικίλλουν σε χρωματισμούς και εναποτίθενται μεμονωμένα ή πολλά μαζί σε σχηματισμούς που λέγονται «σχεδίες» (egg rafts) (Εικόνα 1.3.). Ανάλογα με τον τρόπο

εναπόθεσης και τη δυνατότητα ή όχι αυτόνομης πλεύσης, φέρουν ή όχι πλωτήρες. Στο γένος *Anopheles* τα ωά είναι σκούρου χρώματος, εναποτίθενται μεμονωμένα, κατευθείαν στην επιφάνεια του νερού και φέρουν διαφανείς πλωτήρες. Στο γένος *Aedes* είναι σκούρου χρώματος και δεν φέρουν πλωτήρες γιατί εναποτίθενται σε επιφάνειες που πλέουν στο νερό και είναι μαύρα. Στο γένος *Culex* είναι ανοιχτόχρωμα, επίσης χωρίς πλωτήρες και σχηματίζουν σχεδίες. Από τα ωά αυτά, οι προνύμφες, εκκολάπτονται όταν κατακλυστούν με νερό (Rozendaal, 1997).



**Εικόνα 1.3.** (1) Ωά *Aedes albopictus* μεμονωμένα (2) Ωά *Anopheles* με πλωτήρες (3) Ωά *Culex* οργανωμένα σε σχεδίες (4) Κουνούπι του γένους *Culex* που γεννά ωά.

#### **A.1.2.2. Προνύμφες**

Οι προνύμφες αναπτύσσονται στο νερό και τρέφονται με άλγη, πλαγκτόν, μύκητες, βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς (Πηγή 2). Το στάδιο της προνύμφης έχει τέσσερις προνυμφικές ηλικίες. Η συνολική χρονική διάρκεια ανάπτυξης εξαρτάται από το είδος του κουνουπιού, τη θερμοκρασία του νερού, την ποσότητα και ποιότητα της διαθέσιμης τροφής, με συνήθη χρόνο ανάπτυξης τις 7-10 ημέρες. Οι προνύμφες είναι ένα ενεργά τρεφόμενο στάδιο, είναι επιμήκεις, άποδες, φέρουν τριχίδια στο σώμα τους, έχουν ευκρινώς διαχωρισμένη κεφαλή και παρουσιάζουν γρήγορη κίνηση με χαρακτηριστικό στριφογύρισμα του κοιλιακού τους τμήματος. Για την παραλαβή του οξυγόνου φέρουν είτε αναπνευστικό σιφώνιο στο τελευταίο αναπνευστικό τμήμα (*Culex*, *Aedes*) και βρίσκονται υπό γωνία ως προς την επιφάνεια του νερού είτε η αναπνοή τους γίνεται μέσω αναπνευστικών κηλίδων και τοποθετούν το σώμα τους παράλληλα με την επιφάνεια του νερού (*Anopheles*) (Εικόνα 1.4.) (Rozendaal, 1997).

#### **A.1.2.3. Νύμφες**

Η διάρκεια του νυμφικού σταδίου είναι 1-3 ημέρες, αλλά στο σύντομο αυτό χρονικό διάστημα γίνονται σημαντικές αλλαγές στο εσωτερικό τους με πλήρη αποδόμηση των προνυμφικών ιστών και την αναδόμηση του ακμαίου (Εικόνα 1.4.). Είναι χαρακτηριστικά κυρτές, υδρόβιες, μοιάζουν με «κόμμα» και ποικίλλουν στο χρώμα ανάλογα με το είδος, συνήθως όμως είναι ανοιχτόχρωμες. Είναι λιγότερο δραστήριες από τις προνύμφες καθώς δεν τρέφονται (Spielman and D'Antonio, 2001) και όταν

ενοχληθούν εκτελούν πλήρη αναστροφή. Το εμπρόσθιο τμήμα τους είναι αρκετά μεγάλο και αποτελείται από το κεφάλι και το θώρακα (κεφαλοθώρακας) και φέρει ένα ζεύγος αναπνευστικών εξαρτημάτων (αναπνευστικό σιφώνιο) στην άκρη, με αποτέλεσμα κατά το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα να παραμένουν στην επιφάνεια του νερού (Rozendaal, 1997).



**Εικόνα 1.4.** Νύμφη, προνύμφες *Culex* και *Aedes* με το σώμα να σχηματίζει γωνία με την επιφάνεια του νερού και έκδυση-έξοδος ενήλικου.

#### **A.1.2.4. Ακμαία**

Όταν το ακμαίο σχηματιστεί πλήρως, η νύμφη αρχίζει να εισπνέει αέρα με συνέπεια την αύξηση της εσωτερικής πίεσης. Το ακμαίο ξεπροβάλλει σιγά-σιγά από το νυμφικό περίβλημα, δημιουργώντας μια σχισμή στο πάνω μέρος του σώματος και στέκεται στην επιφάνεια του νερού μέχρι να στεγνώσουν και να ξεδιπλωθούν τα φτερά του, χρησιμοποιώντας σαν πλωτήρα το άδειο περίβλημα της νύμφης (Εικόνα 1.4.). Η διάρκεια της ζωής του εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, το φύλο και την εποχή του χρόνου. Τα αρσενικά ζουν για περίπου μία εβδομάδα ενώ τα θηλυκά ζουν περισσότερο και ανάλογα με τους παραπάνω παράγοντες το διάστημα αυτό μπορεί να φτάσει έως και ένα μήνα (Πηγή 1) (Rozendaal, 1997).

Τα στοματικά τους μόρια είναι νύσσοντος-μυζητικού τύπου και έχουν τη μορφή επιμήκους προβοσκίδας. Ο ερεθισμός του δέρματος (κοκκινίλα και κνησμός) που προκαλείται από ορισμένα είδη μετά τη νύξη, οφείλεται σε αντιπηκτικές ουσίες του σιέλου που εμποδίζουν το αίμα να πήξει ώστε το κουνούπι να εισροφά ευκολότερα το αίμα. Ο σίελος επίσης, περιέχει αναισθητικές ουσίες που βοηθούν στη μείωση του πόνου που προκαλείται κατά τη νύξη, ώστε να μειώνονται οι αμυντικές αντιδράσεις του ξενιστή. Όσον αφορά τα αρσενικά, ενώ έχουν προβοσκίδα δεν νύσσουν λόγω της ανατομίας των στοματικών τους μορίων (Σαββοπούλου-Σουλτάνη κ.α., 2011). Τα θηλυκά κουνούπια, χρειάζονται το αίμα ως πηγή πρωτεϊνών ώστε να ωριμάσουν τα ωά τους. Τα περισσότερα είδη δραστηριοποιούνται τις πρώτες πρωινές ώρες ή το σούρουπο, ενώ κατά τη διάρκεια της ημέρας, όπου η θερμοκρασία είναι υψηλότερη ξεκουράζονται, εκτός εάν ενοχληθούν (Crans, 1989). Ορισμένα είδη τσιμπούν και κατά τη διάρκεια της ημέρας

(*Aedes albopictus*). Υπάρχουν ανθρωπόφιλα κουνούπια (προτιμούν τον άνθρωπο), ορνιθόφιλα (προτιμούν τα πτηνά) ή και άλλα ζώα. Για να εντοπίσουν την τροφή τους προσελκύονται από τις οσμές, την κίνηση και τη θερμοκρασία του σώματος, την υγρασία, αλλά κυρίως από τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα, CO<sub>2</sub> (εκπνοή). Τα κουνούπια προσελκύονται από οποιαδήποτε δραστηριότητα που αυξάνει την παραγωγή CO<sub>2</sub> αλλά και τη παραγωγή άλλων ουσιών, όπως η 1-οκτεν-3-όλη (mushroom alcohol), η οποία βρίσκεται στον ιδρώτα και στην εκπνοή (Hallem et al., 2004) και το γαλακτικό οξύ (Πηγή 3). Εκτός από το αίμα, τρέφονται με σάκχαρα, π.χ. νέκταρ λουλουδιών, μελιτώδεις εκκρίσεις εντόμων (π.χ. αφίδες) και ώριμα φρούτα και την ενέργεια που αποκτούν από την τροφή τους τη χρειάζονται για τις δραστηριότητες που επιτελούν (όπως πτήση, σύζευξη, κ.α.).

### **A.1.3. Κουνούπια και Οικοσύστημα**

Τα κουνούπια είναι διαδεδομένα σε όλο τον πλανήτη, εκτός της Ανταρκτικής (Foster and Walker, 2019), προσαρμόζονται εύκολα σε διαφορετικά περιβάλλοντα και εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες σε πολυάριθμα οικοσυστήματα. Ζουν στη γη 226 εκατομμύρια χρόνια (Reidenbach et al., 2009), έχουν εξελιχθεί παράλληλα με άλλα είδη στην πορεία αυτή και μόνο μερικές εκατοντάδες είδη τσιμπούν ή ενοχλούν τους ανθρώπους. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατροφική αλυσίδα των ζώων και ενώ προκαλούν σημαντικά προβλήματα, ο αφανισμός τους θα έφερνε αρνητικές επιπτώσεις σε άλλα είδη του ζωικού βασιλείου. Πολλά είδη εντόμων, αράχνης, σαλαμάνδρας, σαύρας και βατράχων έχουν ως βασική πηγή τροφής τα κουνούπια και διαφορετικά θα έχαναν μια βασική πηγή διατροφής (Πηγή 4). Οι προνύμφες, στο υδάτινο περιβάλλον στο οποίο ζουν καταναλώνουν οργανική ύλη και βοηθούν με αυτόν τον τρόπο στην ανακύκλωσή της. Τέλος, τα κουνούπια λειτουργούν και ως επικονιαστές (ορχιδέα, σολιδάγο) (Πηγή 5).

Πολλοί επιστήμονες θεωρούν πως οι επιπτώσεις στο οικοσύστημα, σε περίπτωση αφανισμού των κουνουπιών, γρήγορα θα αντιμετωπίζονταν με τη αντικατάσταση ενός άλλου οργανισμού, όμως αυτός ο οργανισμός δεν γνωρίζουμε αν είναι χειρότερος εχθρός για τον άνθρωπο. Άλλοι επιστήμονες κατηγορηματικά αρνούνται μια τέτοια επέμβαση στη φύση, αν και οι ασθένειες θα μειώνονταν ραγδαία, καθώς τα ηθικά ζητήματα αλλά και η διατήρηση της βιοποικιλότητας φέρει ερωτηματικά (Fang, 2010). Ζητούμενο λοιπόν, είναι η μείωσή τους ώστε να μην προκαλούν όχληση και ασθένειες, με δράσεις που θα λαμβάνουν υπόψιν το περιβάλλον και τον άνθρωπο.

#### **A.1.4. Υγειονομική Σημασία**

Τα κουνούπια, μεταξύ των εντόμων, αποτελούν τους σημαντικότερους διαβιβαστές παθογόνων μικροοργανισμών.

##### **A.1.4.1. Νοσήματα Μεταδιδόμενα με Διαβιβαστές (VBD)**

Τα νοσήματα μεταδιδόμενα με διαβιβαστές (Vector Borne Diseases, VBD) είναι ασθένειες που προκαλούνται από παθογόνους οργανισμούς και μεταδίδονται με διαβιβαστές. Ο διαβιβαστής (vector) είναι οργανισμός φορέας ο οποίος μεταδίδει το παθογόνο από έναν ξενιστή σε έναν άλλο (Πηγή 7). Τα VBD αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτων σε χώρες με τροπικό και υποτροπικό κλίμα. Ο λόγος που καθιστά τα κουνούπια τόσο θανατηφόρα είναι ότι μέσω αυτών μεταδίδονται παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων αρμυποϊών, πρωτόζωων και άλλων παρασίτων προκαλώντας ασθένειες υψίστης υγειονομικής σημασίας. Σε μικρότερη έκταση, ίσως να μπορούν να μεταδοθούν και βακτηριακές ασθένειες (Dieme et al., 2015). Τα κουνούπια με τη μεγαλύτερη υγειονομική σημασία ανήκουν στα γένη *Anopheles*, *Aedes* και *Culex* (Tandina et al., 2018). Τα παθογόνα που μπορούν να μεταδοθούν μέσω των κουνουπιών, προσλαμβάνονται κατά τη διάρκεια που λαμβάνει το κουνούπι αίμα από τον ξενιστή που φέρει το παθογόνο και στη συνέχεια μεταφέρονται με τον σιέλο του στο αίμα του νέου ξενιστή.

Η ελονοσία, μια εκ των σοβαρότερων ασθενειών, μεταδίδεται μέσω του γένους *Anopheles* και προκαλείται από πρωτόζωα του γένους Πλασμώδιο (*Plasmodium*). Το είδος *Anopheles gambiae* μεταδίδει το επικίνδυνο παράσιτο που προκαλεί ελονοσία, το *Plasmodium falciparum*. Η ελονοσία, το έτος 2017, προκάλεσε 435.000 θανάτους παγκοσμίως, οι περισσότεροι εκ των οποίων αφορούσαν παιδιά κάτω από την ηλικία των πέντε ετών (WHO, 2018). Οι αρμυποϊοί (arthropod borne virus=arbovirus) είναι ιοί που μεταδίδονται από αρθρόποδα. Τα είδη που εκπληρώνουν αυτόν τον ρόλο φαίνεται να έχουν υιοθετήσει έναν βαθμό ανθρωποφιλικής συμπεριφοράς και να εμφανίζονται σε μεγάλη αφθονία και σε στενή γειτνίαση με ευπαθείς ξενιστές, κυρίως μέσω της εκμετάλλευσης των δημιουργηθέντων χώρων ανάπτυξης προνυμφών από τους ανθρώπους. Τουλάχιστον δέκα αρμυποϊοί ιατρικής και κτηνιατρικής σημασίας, που μεταδίδονται μέσω κουνουπιών, κυκλοφορούν σήμερα στην Ευρώπη (Brugman et al., 2018). Μέσω των ειδών *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* (Ασιατικό κουνούπι τίγρης) μεταδίδονται ο ιός Chikungunya, ο ιός Zika και οι ιοί που προκαλούν το Δάγκειο πυρετό, τον Κίτρινο πυρετό και τον πυρετό της κοιλάδας Rift (Πηγή 8). Πάνω από 3.9 δισεκατομμύρια άνθρωποι σε περισσότερες από 128 χώρες βρίσκονται σε κίνδυνο να

μολυνθούν με τον ιό του Δάγκειου πυρετού και οι καταγραφές μόλυνσης που υπολογίζονται κάθε χρόνο είναι 96 εκατομμύρια παγκοσμίως (WHO, 2019b). Στην Ελλάδα, μια μεγάλη επιδημία Δάγκειου πυρετού έλαβε χώρα στην Αθήνα το 1928, με μεγάλο αριθμό περιστατικών, πολλών εκ των οποίων με βαριά συμπτώματα ενώ καταγράφηκαν 1533 θάνατοι. Διαβιβαστής του ιού ήταν το είδος *Aedes aegypti*, το οποίο επικρατούσε στην περιοχή εκείνη την περίοδο (Chastel, 2009; Schaffner and Mathis, 2014). Ο Κίτρινος πυρετός έχει υψηλό ρυθμό θνησιμότητας και ο ιός Zika προκαλεί μακροχρόνιες νευρολογικές επιπτώσεις σε μωρά γεννημένα από μολυσμένες μητέρες (Πηγή 9). Ο Δάγκειος πυρετός, ο ιός Chikungunya και ο ιός Zika εμφάνισαν επιδημίες, σε πόλεις της Βραζιλίας και σε άλλες πόλεις της Αμερικανικής Ηπείρου, προκαλώντας νοσηρότητα και υψηλά επίπεδα απρόβλεπτων επιπλοκών (Paixao et al., 2018). Μέσω του είδους *Culex pipiens*, το πιο διαδεδομένο κουνούπι στην Ευρώπη, μεταδίδεται ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός Usutu κ.α. Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ο πιο κοινός ιός που μεταδίδεται μέσω των κουνουπιών στις ΗΠΑ (Πηγή 8, 10).

#### **A.1.4.2. Εγκατάσταση μη ιθαγενών ειδών. Αύξηση πληθυσμών και VBD**

Στην Ευρώπη υπάρχει γεωγραφική και κλιματική ποικιλομορφία. Προσαρμοσμένα σε αυτή τη κλιματική ποικιλομορφία, τα ιθαγενή κουνούπια είναι ταυτόχρονα πολυάριθμα και διαφορετικά. Μερικά είδη συναντώνται σε όλη την έκταση της Ευρώπης, ενώ άλλα έχουν μικρή διασπορά. Η πρόσφατη εμφάνιση ή επανεμφάνιση μη ιθαγενών κουνουπιών δίνει σημαντικό λόγο επαναξιολόγησης της απειλής των VBD. Πολλά είδη έχουν γίνει γνωστά για την εισβολή και εγκατάστασή τους στην περιοχή, όπως τα *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus*, *Culex tritaeniorhynchus* ενώ άλλα είδη έχουν εισβάλει αλλά δεν έχουν εγκατασταθεί, όπως τα *Ae. atropalpus* και *Ae. triseriatus* (Takken and van den Berg, 2019). Παράλληλα, η αύξηση του αριθμού των κουνουπιών που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια ακόμα και στις πιο αναπτυγμένες και οικονομικά εύρωστες περιοχές του πλανήτη, όπως είναι η Ευρώπη και οι ΗΠΑ εγείρει ανησυχίες σε παγκόσμιο επίπεδο σχετικά με τα αίτια της εμφάνισης, τις απειλές για την υγεία, την πρόληψη και τον έλεγχο (Paixao et al., 2018).

Η παγκόσμια εισαγωγή μη ιθαγενών ειδών κουνουπιών λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο, εξαιτίας του σύγχρονου εμπορίου, των εναέριων, θαλάσσιων και οδικών μετακινήσεων και των ταξιδιών μεγάλου μέρους του ανθρώπινου πληθυσμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εισαγωγή λάστιχων αυτοκινήτων, όπου στάσιμα νερά δημιουργούν κατάλληλο περιβάλλον για τις προνύμφες των κουνουπιών. Είναι πιθανό, η εισαγωγή λάστιχων από την Ασία να ήταν το μέσο με το οποίο εισήχθη το



*Aedes albopictus* στη Βόρεια Αμερική (Kling et al., 2007). Στην περίπτωση των ταξιδιών, ένας άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί σε μία χώρα και να μεταφέρει τον ιό σε μία άλλη (εισαγόμενο κρούσμα). Όταν υπάρχουν στην περιοχή κατάλληλα είδη διαβίβαστων, όσον αφορά ιούς στους οποίους ο κύριος ξενιστής είναι ο άνθρωπος, π.χ. ο ιός του Δάγκειου πυρετού, το παθογόνο που εισάγεται μπορεί να προκαλέσει επιδημία (εγχώριο κρούσμα) (Gould and Solomon, 2008). Παράλληλα, η αλλαγή του κλίματος επηρεάζει άμεσα τη βιολογία των φορέων, την αφθονία και τη γεωγραφική τους κατανομή, συμπεριλαμβανομένης της εδαφικής επέκτασης σε νέες περιοχές και αλλάζει την εξωγενή περίοδο επώασης των παθογόνων (Paixao et al., 2018). Τα κουνούπια εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό και συνδέονται στενά με το περιβάλλον. Η ζωή τους είναι ένας μικρόκοσμος νερού, διαθέσιμων οικοτόπων, θερμοκρασίας, αρπακτικών και ανταγωνιστών και κάθε πτυχή τους επηρεάζεται από τις παραμικρές αλλαγές στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να επεκτείνονται σε νέες περιοχές, πιο κατάλληλες για τη επιβίωσή τους, μεταφέροντας ταυτόχρονα και παθογόνα. Ως υδρόβια έντομα, ο κύκλος της ζωής τους και ο χρόνος ανάπτυξης εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα νερού. Οι ξηρασίες μπορούν να αυξήσουν τον πληθυσμό τους αυξάνοντας το στάσιμο ύδωρ, ενώ σε άλλες περιοχές η αύξηση της υγρασίας λόγω έντονων βροχοπτώσεων, θα ενίσχυε την επιβίωσή τους. Η αύξηση της θερμοκρασίας εγείρει τον πιο γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και δραστηριότητας και επηρεάζει την ικανότητά τους να διαχειμάζουν, γεγονός που βοηθά στην εξάπλωση τους σε βόρεια γεωγραφικά πλάτη (Bartlow et al., 2019). Σημαντικό ρόλο στην αύξηση των VBD παίζει η μη προγραμματισμένη αστικοποίηση, η ανάπτυξη αστικών παραγκουπόλεων, η έλλειψη αξιόπιστων σωληνώσεων ή επαρκούς διαχείρισης των στερεών αποβλήτων. Οι αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές, εξαιτίας θερμοκρασιακών μεταβολών και βροχοπτώσεων, μπορούν επίσης να επηρεάσουν (WHO, 2017).

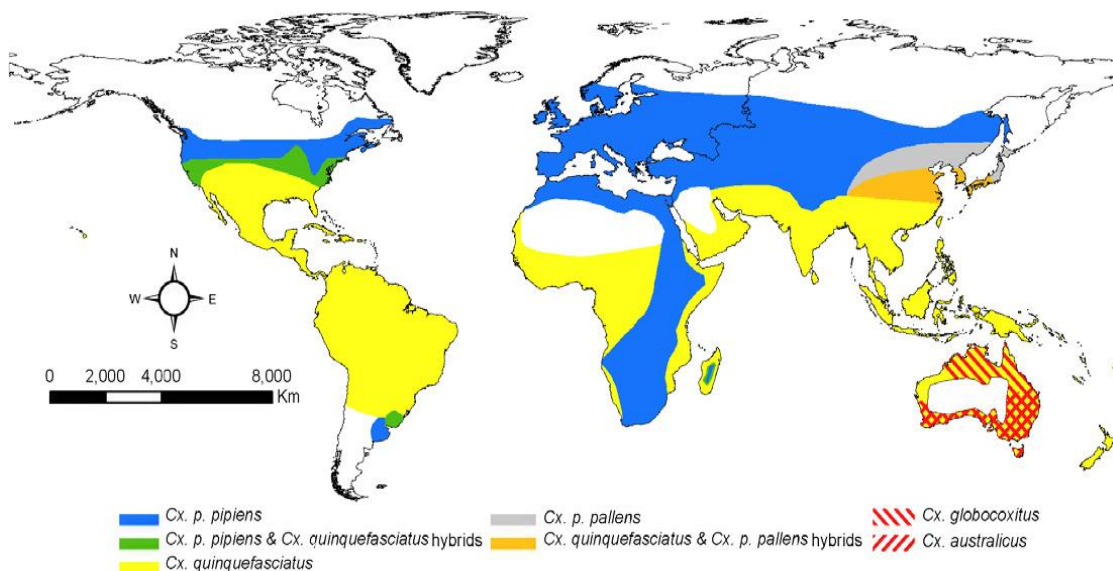
## **A.2. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Culex pipiens***

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί 60 είδη κουνουπιών (Samanidou-Voyadjoglou et al., 2005). Λόγω της γεωμορφολογικής θέσης και άλλων κατάλληλων κλιματικών συνθηκών, ευνοείται η αύξηση των πληθυσμών των κουνουπιών ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών. Εκτεταμένες καλλιέργειες ρυζιού, υγρότοποι κοντά σε οικισμούς και η κακή διαχείριση υδάτων δημιουργούν ένα ιδανικό περιβάλλον για τον πολλαπλασιασμό τους (Beleri et al., 2017). Τις τελευταίες δεκαετίες τα VBD αυξάνονται ραγδαία. Πέραν της εγκατάστασης μη ιθαγενών ειδών, τα αυτόχθονα κρούσματα αυξάνονται με έντονο ρυθμό, με εκείνα που οφείλονται στον ιό του Δυτικού

Νείλου από το 2010 να είναι στο επίκεντρο. Η μεγάλη σημασία του είδους *Culex ripiens*, του πιο διαδεδομένου κουνουπιού στην Ευρώπη, έγκειται στην παγκόσμια εξάπλωσή του και στο γεγονός ότι αποτελεί έναν εκ των κυριότερων διαβιβαστών του ιού του Δυτικού Νείλου (WNV) αλλά και άλλων παθογόνων που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στους ανθρώπους και σε ζώα (Spanoudis et al., 2019).

### A.2.1. Σύμπλεγμα *Culex ripiens*

Το *Culex ripiens* αντιπροσωπεύει ένα σύμπλεγμα ειδών κουνουπιών και αποτελείται από τα *Culex ripiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. australicus* και *Cx. globocoxitus* (Εικόνα 1.5.). Στο είδος *Cx. ripiens* ανήκουν δύο υποείδη, το *Cx. ripiens ripiens* και το *Cx. ripiens pallens* (Farajollahi et al., 2011). Το *Cx. p. ripiens* (northern house mosquito, Linnaeus 1758) συναντάται σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, όπως η Ευρώπη ενώ το *Cx. quinquefasciatus* (southern house mosquito, Say 1823) σε πιο θερμές περιοχές π.χ. Αφρική (Αθανασίου κ.α., 2012). Παράλληλα, υπάρχει και το υβρίδιο τους σε περιοχές με ενδιάμεσο κλίμα. Το *Cx. p. ripiens* διαχωρίζεται σε δύο μορφολογικά ίδιους βιότυπους, οι οποίοι εμφανίζουν διαφορετικές συμπεριφορές, τον *ripiens* (Linnaeus 1758) και τον *molestus* (Forskål 1775) (Vinogradova, 2000). Ο βιότυπος *ripiens* είναι ευρύγαμος (διασταυρώνεται σε ανοιχτούς χώρους), ετεροδυναμικός (υποβάλλεται σε χειμέρια αναπαραγωγική διάπαυση), μη αυτογενής (απαιτεί πρόσληψη αίματος για την παραγωγή αυγών) και προτιμάει το αίμα των πτηνών.



**Εικόνα 1.5.** Παγκόσμια κατανομή του συμπλέγματος *Culex ripiens*. Το γεωγραφικό εύρος για το *Culex p. ripiens* αφορά δύο βιότυπους (*ripiens* και *molestus*). Το είδος *Culex australicus* και *Culex globocoxitus* περιορίζονται στην Αυστραλία.

Ο βιότοπος *molestus* είναι στενόγαμος (μπορεί να διασταυρωθεί σε περιορισμένους χώρους), ομοδυναμικός, παραμένοντας ενεργός κατά τη διάρκεια του χειμώνα, αυτογενής (δεν απαιτεί πρόσληψη αίματος για την παραγωγή απογόνων) και προτιμάει να θρέφεται από θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Kent et al., 2007). Οι δύο τύποι στη Βόρεια Ευρώπη έχουν διαχωρισμένους οικολογικούς θώκους. Ο βιότοπος *ripiens* προτιμά χερσαία μέρη για εναπόθεση σχεδίων ωών και ανάπτυξη προνυμφών π.χ. υπαίθριους χώρους συγκέντρωσης νερού, ενώ ο *molestus* προτιμά υπόγεια σημεία για την ωοθεσία και αναπαραγωγή, π.χ. κελάρια, σκεπασμένα αποχετευτικά δίκτυα, βόθρους και υπόγειους σιδηρόδρομους. Στη Νότια Ευρώπη διαβιούν συμπατρικά σε υπέργεια μέρη, γεγονός που ευνοεί τον υβριδισμό τους και έχουν περιγραφεί πληθυσμοί με ενδιάμεσα βιολογικά χαρακτηριστικά (Gomes et al., 2013).

#### **A.2.2. Μορφολογία και Βιολογία *Culex ripiens***

Το *Cx p. ripiens* έχει μεσαίο μέγεθος (4-10 mm), ανοιχτό καστανό χρώμα και έντονο πολυμορφισμό. Τα φτερά του είναι χρωματικά ομοιόμορφα και η προβοσκίδα του είναι διακεκομμένη και προς τα κάτω σε σχέση με το υπόλοιπο σώμα. Πολλαπλασιάζεται σε στάσιμα νερά και οι προνύμφες εμφανίζονται σε μικρές ή μεγάλες, καθαρές ή μολυσμένες, τεχνητές ή φυσικές συγκεντρώσεις νερού, ακόμα και αν υπάρχει μικρή ποσότητα άλατος. Οι πρώτες προνύμφες συχνά εμφανίζονται συγχρόνως με εκείνες των ανωφελών και συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους εντός μίας ή μερικών εβδομάδων, ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα ακμαία μπορούν να διανύσουν απόσταση που δεν ξεπερνά τα 500-800 μέτρα από την εστία ανάπτυξής τους και τα θηλυκά που εμφανίζονται στα τέλη του καλοκαιριού διαχειμάζουν μέχρι την άνοιξη. Σε ζεστούς χειμώνες βγαίνουν από το καταφύγιό τους και ψάχνουν νερό ώστε να γεννήσουν τα ωά τους (Πηγή 2). Τα ωά εναποτίθενται στην επιφάνεια του νερού και αυτά επιπλέουν σε σχεδίες των 100 ή και περισσότερων ωών για 2-3 μέρες μέχρι να εκκολαφθούν (Rozendaal, 1997 Harbach, 2008). Η νύξη πραγματοποιείται βραδινές ώρες, μεταξύ της δύσης του ηλίου και της ανατολής (Πηγή 11).



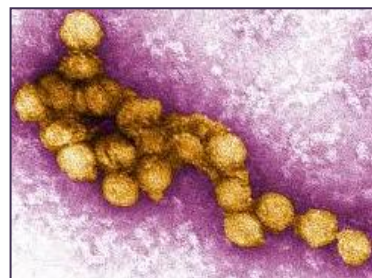
**Εικόνα 1.6.** Στάδια *Culex ripiens* (1) ωά οργανωμένα σε σχεδία (2) προνύμφη 4<sup>ης</sup> ηλικίας (3) νύμφη (4) ακμαίο.

### A.2.3. Μετάδοση παθογόνων μέσω του είδους *Culex ripiens*

Το είδος *Cx. ripiens* αποτελεί τον κύριο διαβιβαστή του ιού του Δυτικού Νείλου. Άλλοι σημαντικοί ιοί που μπορεί να μεταδώσει είναι ο ιός της εγκεφαλίτιδας Saint Louis, οι ιοί Usutu, Sindbis και οι Rift Valley και Tahyna που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα κατοικίδια ζώα. Δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι το *Culex ripiens* συμβάλλει στη μετάδοση ιών όπως ο ιός Chikungunya και ο ιός του Δάγκειου πυρετού (Brugman et al., 2018). Επιπλέον, μεταδίδονται παράσιτα, όπως το πρωτόζωο *Plasmodium relictum*, προκαλώντας ελονοσία στα πτηνά, το παράσιτο *Wuchereria bancrofti*, το οποίο προκαλεί στους ανθρώπους λεμφαδενική φιλαρίαση (Farajollahi et al., 2011) και το παράσιτο *Dirofilaria immitis* που προκαλεί τη φιλαρίαση του σκύλου και τυχαία μπορεί να προσβάλλει και τον άνθρωπο (Πηγή 6).

#### A.2.3.1. Ιός του Δυτικού Νείλου (WNV)

Ο ιός του Δυτικού Νείλου, West Nile virus (WNV) είναι μονόκλωνος RNA ιός, ο οποίος προκαλεί τον πυρετό του Δυτικού Νείλου (Εικόνα 1.7.). Είναι μέλος της οικογένειας *Flaviviridae*, και συγκεκριμένα του γένους *Flavivirus*. Πέραν του γένους *Culex*, ο ιός μεταφέρεται και από σιμπούρια. Ο κύριος ξενιστής του ιού είναι τα πουλιά, με τον κύριο κύκλο μετάδοσης να είναι ο κύκλος «πτηνό-κουνούπι-πτηνό» (Mackenzie et



**Εικόνα 1.7.** Μικρογραφία του ιού του Δυτικού Νείλου.

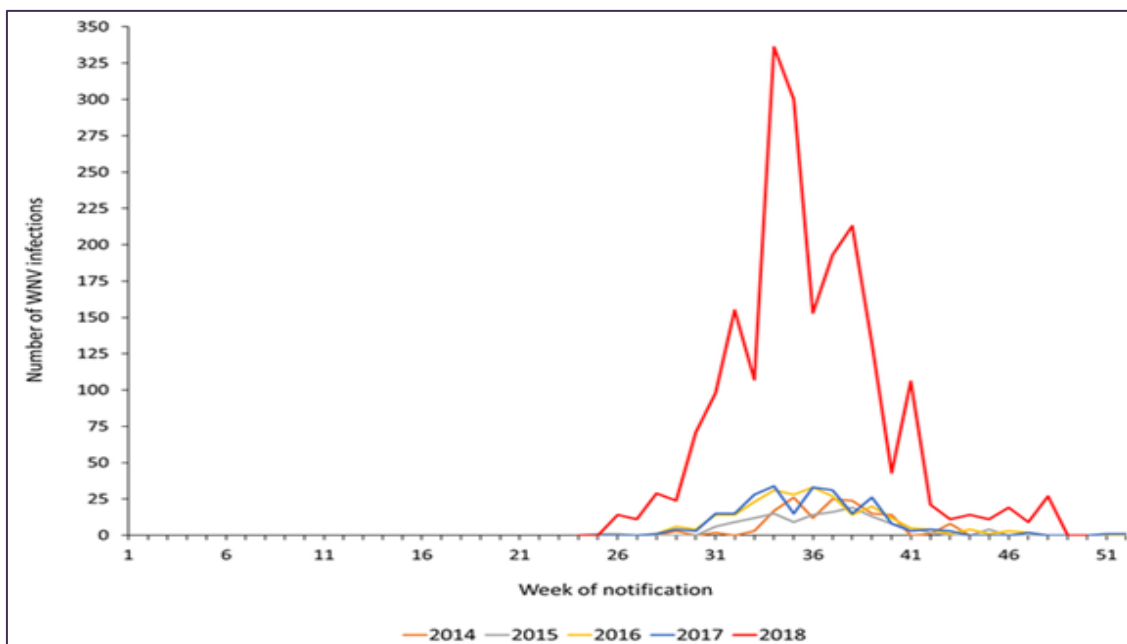
al., 2004). Οι άνθρωποι δεν μεταδίδουν περαιτέρω τον ιό σε άλλα κουνούπια. Ο ιός ονομάστηκε έτσι γιατί αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην επαρχία του Δυτικού Νείλου στην Ουγκάντα το 1937. Το 80% των ανθρώπων που μολύνονται με τον ιό δεν εκδηλώνουν κάποιο σύμπτωμα. Περίπου 20% εμφανίζουν ήπια μορφή της νόσου, που μπορεί να εκδηλωθεί με συμπτώματα που ομοιάζουν με την εικόνα της γριπώδους συνδρομής, με δερματικά εξανθήματα, διόγκωση των λεμφαδένων αλλά και με συμπτώματα του γαστρεντερικού συστήματος και υποχωρούν μόνα τους. Λιγότερο από 1% που μολύνονται, κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, εμφανίζουν τη σοβαρή μορφή της νόσου όπου προσβάλλεται το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) (εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα ή οξεία χαλαρή παράλυση). Προς το παρόν δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο έναντι του ιού για τον άνθρωπο. Η συχνότητα των επιδημιών έχει αυξηθεί τα τελευταία 15-20 χρόνια και κρούσματα και επιδημίες λοίμωξης από τον WNV σε ανθρώπους και ζώα έχουν εκδηλωθεί στην Αφρική, τη Βόρεια Αμερική, τη Μέση Ανατολή, την κεντρική και νότιο-ανατολική Ευρώπη, τη

Ρωσία, την Αυστραλία, τη νοτιο-δυτική Ασία. Οι χώρες στις οποίες έχουν καταγραφεί οι μεγαλύτερες επιδημίες παγκοσμίως είναι η Ρουμανία, η Ρωσία, το Ισραήλ, οι ΗΠΑ και η Ελλάδα, περιοχές που αντιστοιχούν στις μείζονες μεταναστευτικές οδούς των πτηνών. Στην Ευρώπη η μετάδοση του ιού παρουσιάστηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960 στη νότια Γαλλία, ενώ από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 έλαβαν χώρα συχνότερες επιδημίες. Η πρώτη μεγάλη επιδημία σε ανθρώπους στην Ευρώπη καταγράφηκε στη Ρουμανία το 1996-1997, ενώ μεγάλη επιδημία καταγράφηκε το 1999 στη νότια Ρωσία. Το 2010 για πρώτη φορά καταγράφηκε στην Ελλάδα επιδημία λοίμωξης από τον ιό, η οποία ήταν η μεγαλύτερη στην Ευρώπη μετά το 1996. Σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας έχουν καταγραφεί κρούσματα λοίμωξης από τον WNV κατά τα έτη 2010-2014 και 2017-2018. Στον Πίνακα 1.1. παρουσιάζονται συνοπτικά τα κρούσματα σε ανθρώπους και ζώα που διαγνώστηκαν και δηλώθηκαν στη χώρα μας. Λόγω της σύνθετης επιδημιολογίας του ιού, οι περιοχές κυκλοφορίας του για το έτος 2019, δεν μπόρεσαν να προβλεφθούν με ασφάλεια. Ο ιός έχει εγκατασταθεί στη χώρα μας, όπως και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (Πηγή 12).

**Πίνακας 1.1.** Κρούσματα λοίμωξης από τον WNV για τα έτη 2010-2018 στην Ελλάδα.

Κρούσματα λοίμωξης από τον WNV	Έτος									
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
Σύνολο κρουσμάτων	262	100	161	86	15	0	0	48	316	
Με προσβολή του ΚΝΣ	197	75	109	51	14	0	0	28	243	
Χωρίς προσβολή του ΚΝΣ	65	25	52	35	1	0	0	20	73	
Θάνατοι κρουσμάτων	35	9	18	11	6	0	0	5	<b>50</b>	

Στην Ευρώπη το 2018, ο συνολικός αριθμός κρουσμάτων σε ανθρώπους και ζώα αυξήθηκε από 1832 σε 2083, συγκριτικά με το έτος 2017. Στο γράφημα 1.1. φαίνεται ο αριθμός των κρουσμάτων του WNV σε χώρες της Ευρώπης σε σχέση με την επιδημιολογική εβδομάδα (2014-2018) (Πηγή 13).



**Γράφημα 1.1.** Αριθμός των κρουσμάτων από τον WNV σε χώρες της ΕΕ ανά επιδημιολογική εβδομάδα, 2014-2018.

### A.3. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΟΥΝΟΥΠΙΩΝ

Η ολιστική διαχείριση των κουνουπιών και των προβλημάτων που δημιουργούν στη δημόσια υγεία, στο περιβάλλον και στη τοπική οικονομία είναι αναγκαία και για την επίτευξή της πρέπει να εφαρμόζονται Ολοκληρωμένα Προγράμματα Καταπολέμησης Κουνουπιών. Για την αντιμετώπιση των κουνουπιών και την πρόληψη μετάδοσης VBD, όλοι οι εμπλεκόμενοι φορείς, όπως Περιφέρειες, Δήμοι και τα αρμόδια Υπουργεία, πανεπιστημιακοί και ερευνητικοί φορείς, ιδιώτες ανάδοχοι και όποιοι άλλοι συμμετέχουν στην οργάνωση και υλοποίηση των έργων καταπολέμησης πρέπει να είναι σε στενή συνεργασία. Η οργάνωση των ολοκληρωμένων προγραμμάτων καταπολέμησης κουνουπιών σε μια περιοχή, ο σχεδιασμός των προγραμμάτων, η εντομολογική επιτήρηση, η αντιμετώπιση των προνυμφών και των ακμαίων, η προστασία του προσωπικού, η ενημέρωση του κοινού, ο έλεγχος των υπολειμμάτων των βιοκτόνων και τέλος, η αξιολόγηση και ο απολογισμός είναι απαραίτητα στοιχεία ώστε να πραγματοποιηθεί ο στόχος της ορθολογικής αντιμετώπισης των αρθρόποδων αυτών (Πηγή 15).

Η αντιμετώπιση των εντόμων δεν στηρίζεται μόνος στις χημικές μεθόδους αλλά στον συνδυασμό ποικιλίας μεθόδων όπως φυσικές, βιολογικές και χημικές, με στόχο την μείωση των πληθυσμών των εντόμων σε ανεκτά επίπεδα. Ο συνδυασμός μέτρων αποτελεί όπλο για την αντιμετώπιση η οποία στηρίζεται πρώτα στην καταπολέμηση και

τον περιορισμό των προνυμφών και συμπληρωματικά στην καταπολέμηση των ακμαίων (Michaelakis et al., 2007; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Η αντιμετώπιση των εντόμων υγειονομικής σημασίας είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς επηρεάζουν την διαβίωση, την υγεία και τη ζωή του ανθρώπου. Τα μέτρα που λαμβάνονται πρέπει να στοχεύουν στην μείωση των πληθυσμών, να εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και να απομακρύνουν τα επιβλαβή είδη από το χώρο διαβίωσης του ανθρώπου. Οι αλληλεπικαλυπτόμενοι στόχοι για την αντιμετώπιση των κουνουπιών είναι η πρόληψη από τα τσιμπήματα των κουνουπιών, η διατήρηση των πληθυσμών σε αποδεκτά επίπεδα, η ελαχιστοποίηση της επαφής μεταξύ κουνουπιών και σπονδυλωτών και η μείωση του χρόνου ζωής των θηλυκών (Foster and Walker, 2019).

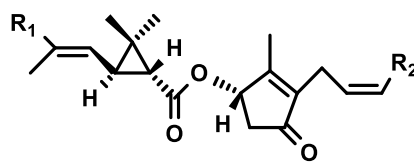
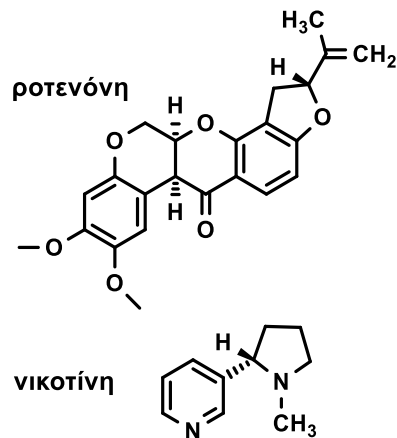
### **A.3.1. Εντομοκτόνα**

Η αναγκαιότητα της καταπολέμησης των εντόμων αποτελούσε και αποτελεί ουσιαστικό κομμάτι της ζωής των ανθρώπων τόσο για τον περιορισμό της όχλησης τους και της μετάδοσης ασθενειών, όσο και για την προστασία καλλιεργειών. Πριν ακόμα ξεκινήσουν να καλλιεργούν τη γη, οι πρόγονοί μας χρησιμοποιούσαν φωτιές με πολύ καπνό για την απώθηση των εντόμων και επικάλυπταν το σώμα τους με λάσπη ή σκόνη (Ware and Whitacre, 2004). Υπάρχουν αναφορές για χρήση θείου ως εντομοκτόνο από τους Σουμέριους το 2500 π.Χ. καθώς και από την Ομηρική εποχή, το 1000 π.Χ. περίπου. Την ίδια εποχή στην Κίνα χρησιμοποιούσαν ενώσεις του υδραργύρου και του αρσενικού (Ravichandra, 2018). Από τον Πλίνιο το Δεύτερο 23-79 μ.Χ. καταγράφηκε στην εγκυκλοπαίδειά του «Natural History» ένας μεγάλος αριθμός εντομοκτόνων ουσιών (Kishore et al., 2014). Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε ποικιλία υλικών με αμφίβολα αποτελέσματα όπως εκχυλίσματα πιπεριού και καπνού, σαπουνόνερο, ασβεστόνερο (διάλυμα  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), ξύδι, τερεβινθίνη (νέφτι), ιχθυέλαιο, άλμη κ.α. Μέχρι τις αρχές του 1940, η χρήση των εντομοκτόνων περιοριζόταν κυρίως στη χρήση του θειαφιού, του υδροκυανίου, ενώσεων του αρσενικού, ορισμένων πετρελαϊκών κλασμάτων, του κρούλιθου, της νικοτίνης, της ροτενόνης και του πυρέθρου (Ware and Whitacre, 2004). Η νικοτίνη είναι φυσικό προϊόν, αλκαλοειδές, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο τουλάχιστον από το 1690 και εξάγεται από τα φύλλα του καπνού (Tomizawa and Casida, 2005). Η ροτενόνη, επίσης φυσικό προϊόν, ανήκει στην οικογένεια των ροτενοειδών, είναι κρυσταλλική ισοφλαβόνη και εξάγεται από τις ρίζες και τους μίσχους διάφορων τροπικών και υποτροπικών ειδών φυτών (Πηγή 16). Το πύρεθρο είναι ένα φυσικό εντομοκτόνο και είναι η κοινή ονομασία που αναφέρεται στις αποξηραμένες ανθοκεφαλές του Χρυσάνθεμου του σταχτόφυλλου

(*Tanacetum cinerariifolium*) με δραστικές ενώσεις τις πυρεθρίνες (Dewick, 2002) (Εικόνα 1.8.). Το υδροκυάνιο (HCN) ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα.

Με την έναρξη του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου ξεκίνησε μια νέα περίοδος καταπολέμησης των εντόμων, εκείνη της χημικής αντιμετώπισης, όπου γίνεται οργανική σύνθεση εντομοκτόνων. Η ανάγκη για αντικατάσταση των επικίνδυνων ενώσεων για την ανθρώπινη υγεία οδήγησε στη σύνθεση του π, π'-διχλωρο-διφαινυλοτριχλωροαιθάνιου (DDT). Το 1874 συντέθηκε για πρώτη φορά το DDT (Πίνακας 1.2.), μια άχρωμη, άγευστη, σχεδόν άοσμη, κρυσταλλική οργανοχλωριωμένη ένωση (WHO, 1989) από τον Othmar Zeidler κάτω από την επίβλεψη του Adolf von Baeyer (Zeidler, 1874), ενώ το 1939 ανακαλύφθηκαν από τον Ελβετό χημικό Paul Hermann Müller οι εντομοκτόνες ιδιότητες της ένωσης, γεγονός που οδήγησε το 1948 στην απονομή του Βραβείου Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής (Πηγή 17). Τη δεκαετία του 1940, το DDT χρησιμοποιήθηκε για την καταπολέμηση των εντόμων (φορέων) που μετέδιδαν την ελονοσία (κουνούπια) και τον τύφο (ψείρες του ανθρώπου κ.α.). Στην Ελλάδα το DDT ήταν γνωστό, λόγω του αντίστοιχου εμπορικού σκευάσματος ως «φλιτ» (Εικόνα 1.9.) και η συστηματική χρήση του άρχισε από το 1945-1946 με τη βοήθεια του Οργανισμού Περίθαλψης και Αποκατάστασης των Ηνωμένων Εθνών (UNRRA) για την αντιμετώπιση της ελονοσίας, η οποία από τα πρώτα χρόνια των ψεκασμών μειώθηκε σημαντικά (Τσιάμης κ.α., 2017). Παρά την αποτελεσματικότητα του DDT, ανησυχίες και αντιδράσεις σχετικά με την ασφάλεια για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον υπήρξαν από την αρχή της χρήσης του. Η κλιμάκωση των αντιδράσεων έγινε μετά το 1962, με το περιβαλλοντικό κίνημα να γίνεται όλο και πιο δυνατό μέχρι την τελική απαγόρευση του DDT στην Αμερική το 1972 από την Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) (Carson, 1997). Η Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους Έμμονους Οργανικούς Ρύπους (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants) τέθηκε σε παγκόσμια ισχύ στις 17 Μαΐου 2004 και απαγορεύτηκε ανάμεσα σε άλλα και το DDT. Παρά την απαγόρευση, σε κάποιες χώρες συνεχίζεται η χρήση του σε κλειστούς χώρους, λόγω των μεγάλων προβλημάτων ελονοσίας, όπως στην Ινδία, Κίνα, Βόρεια Κορέα και σε χώρες της Αφρικής, σύμφωνα με απόφαση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, 2019a). Το DDT είναι τοξικό, μη βιοδιασπώμενο, λιπόφιλο, βιοσυσσωρεύεται και είναι πιθανώς καρκινογόνο (Loomis et al., 2015).





πυρεθρίνες

πυρεθρίνη I  $R_1: CH_3, R_2: CH=CH_2$

πυρεθρίνη II  $R_1: CH_3O_2C, R_2: CH=CH_2$

τζασμολίνη I  $R_1: CH_3, R_2: CH_2CH_3$

τζασμολίνη II  $R_1: CH_3O_2C, R_2: CH_2CH_3$

σινερίνη I  $R_1: CH_3, R_2: CH_3$

σινερίνη II  $R_1: CH_3O_2C, R_2: CH_3$



**Εικόνα 1.8.** Χημική δομή των φυσικών προϊόντων νικοτίνη, ροτενόνη και πυρεθρινών.

**Εικόνα 1.9.** Εμπορικό σκεύασμα με περιεκτικότητα σε DDT 50%, περίπου 1960. Αμερικανός στρατιώτης επιδεικνύει τη χρήση ψεκαστικού DDT χειρός, 1973. Εμπορικό σκεύασμα (FLIT) με περιεκτικότητα σε DDT 5% και τρόμπια ψεκασμού.

### A.3.1.1. Συνθετικά Εντομοκτόνα

Μετά την ανακάλυψη του DDT, γενικεύτηκε η χρήση οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων και άνοιξε ο δρόμος για την παραγωγή μιας πληθώρας οργανικών σκευασμάτων (Πίνακας 1.2.). Τα εντομοκτόνα επιδρούν στο Νευρικό Σύστημα των εντόμων (ΝΣ). Η μεταφορά εντολών για συγκεκριμένες λειτουργίες γίνεται μέσω του ΝΣ. Για να περάσει το νευρικό ερέθισμα από το ένα κύτταρο στο άλλο πρέπει να περάσει το συναπτικό χάσμα. Αυτό πραγματοποιείται με την παρέμβαση χημικών ουσιών που ονομάζονται νευροδιαβιβαστές όπως η ακεταλοχολίνη, η επινεφρίνη, το γ-αμινο-βουτυρικό οξύ (GABA), η ντοπαμίνη, η γλυκίνη και η ισταμίνη και μεταβιβάζονται στους δέκτες (receptors) του άλλου κυττάρου. Η ομαλή λειτουργία των διαβαστών εξαρτάται από τους διαύλους ιόντων ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) οι οποίοι βρίσκονται στα άκρα των νευρικών κυττάρων. Η ομοιόμορφη κατανομή των ιόντων δημιουργεί ένα ηλεκτρικό δυναμικό με το οποίο πραγματοποιείται η μετάδοση σημάτων-εντολών (Πηγή 14).

#### **A.3.1.1.1. Οργανοχλωριωμένα (OCs)**

Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες είναι υδρογονάνθρακες στους οποίους άτομα άνθρακα είναι ενωμένα με άτομα χλωρίου. Απορροφώνται γρήγορα από το δέρμα των εντόμων, έχουν μεγάλη λιποδιαλυτότητα, μεγάλη υπολειμματική δράση, δεν διασπώνται στη φύση και συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό των θηλαστικών, λόγος ο οποίος έχει οδηγήσει σε απαγόρευση πολλών εξ αυτών. Διαχωρίζονται κυρίως σε δύο μεγάλες κατηγορίες, πρώτον αυτές που ομοιάζουν του DDT και δεύτερον στα χλωριωμένα κυκλοδιένια με κύριους εκπροσώπους την αλδρίνη (Πίνακας 1.2.), διελδρίνη, ενδρίνη και εππαχλώρ (Πηγή 18). Οι ενώσεις τύπου DDT φαίνεται ότι παρεμβαίνουν στην αξονική μετάδοση των νευρικών παλμών. Τα κανάλια νατρίου διεγείρονται από αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την υπερδιέγερση του νεύρου, την παράλυση και τελικά το θάνατο του εντόμου. Τα κυκλοδιένια επιδρούν στον υποδοχέα του GABA με αποτέλεσμα την αναστολή ροής ιόντων χλωρίου στο νεύρο, τη σταδιακή παράλυση και το θάνατο (Coats, 1990).

#### **A.3.1.1.2. Οργανοφωσφορικά (OPs)**

Τα οργανοφωσφορικά είναι μια μεγάλη οικογένεια οργανικών χημικών ενώσεων που είναι παράγωγα του φωσφορικού οξέος ή συναφών οξέων όπως το φωσφονικό, θειοφωσφορικό, θειονοφωσφορικό, πυροφωσφορικό, διθειοφωσφορικό, διθειοφωσφονικό. Είναι εντομοκτόνα επαφής και στομάχου, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματικότητα και τη μεγαλύτερη τοξικότητα για τον άνθρωπο και τα ζώα, γι'αυτό κατά την εφαρμογή είναι απαραίτητη η λήψη όλων των μέτρων ασφαλείας. Βάσει της δομής τους ταξινομούνται στα αλειφατικά παράγωγα π.χ. το μαλαθείο, στα φαινολικά παράγωγα π.χ. το τέμεφος και στα ετεροκυκλικά παράγωγα π.χ. το χλωροπυριφός (Πίνακας 1.2.). Τα οργανοφωσφορικά δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός βασικού ενζύμου του ΚΝΣ των εντόμων, που καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, αναστέλλοντας τη λειτουργία της. Αυτό καταλήγει σε συσσώρευση ακετυλοχολίνης στις συνάψεις, με συνέπεια τη διακοπή της μεταφοράς μηνυμάτων, την αχρήστευση του ΝΣ και τελικά τον θάνατο (Πηγή 18).

#### **A.3.1.1.3. Καρβαμιδικά**

Οι καρβαμιδικές ενώσεις είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος, αποτελούν μια σημαντική ομάδα οργανικών ενώσεων στην καταπολέμηση των εντόμων και ανακαλύφθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '50, μιας και τα οργανοφωσφορικά είχαν αρχίσει να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. Παραδείγματα καρβαμιδικών που

χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση κουνουπιών είναι το bendiocarb και το proroxur (Πίνακας 1.2.). Όπως και τα οργανοφωσφορικά, είναι ευρέος φάσματος και ισχυροί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, με την παρεμπόδιση της να είναι λιγότερο μόνιμη σε σύγκριση με τα οργανοφωσφορικά, γεγονός που τα καθιστά ασφαλέστερα για τον άνθρωπο κατά τη διάρκεια χρήσης τους (Πηγή 18).

#### **A.3.1.1.4. Πυρεθροειδή**

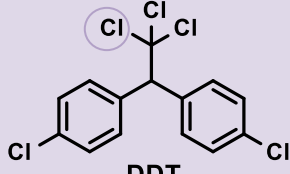
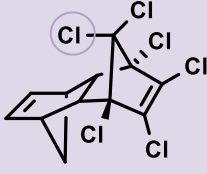
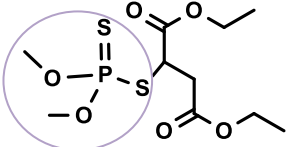
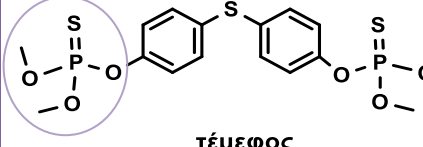
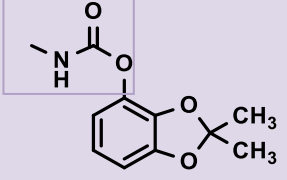
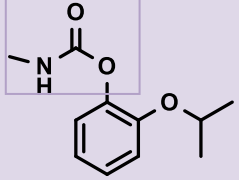
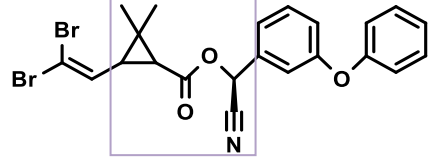
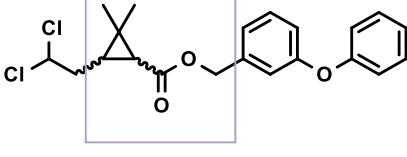
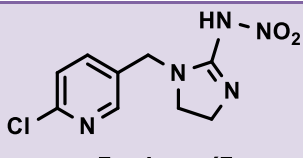
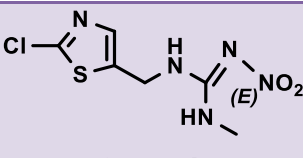
Οι πυρεθρίνες, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο A.3.1., βιοαποικοδομούνται και η υπολειμματικότητά τους είναι μικρή ωστόσο είναι φωτοδιασπώμενες ενώσεις με υψηλό κόστος. Τα συνθετικά ανάλογά τους που συντέθηκαν λόγω αυτών των μειονεκτημάτων, ονομάζονται πυρεθροειδή και έχουν μικρότερο κόστος και μικρότερη ευαισθησία στο φως. Συχνά προστίθεται σε αυτά πιπερονυλοβουτοξειδίο (PBO), το οποίο δρα συνεργιστικά. Με το PBO παρεμποδίζονται τα ένζυμα των εντόμων που μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα και κατ' επέκταση αυξάνεται τη διάρκειά τους στο σώμα του εντόμου και η αποτελεσματικότητά τους. Έχουν ευρύ φάσμα με έλλειψη εκλεκτικότητας στα ωφέλιμα έντομα και είναι τοξικά έναντι υδρόβιων οργανισμών, επομένως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προνυμφοκτόνα. Τα πυρεθροειδή, οι πυρεθρίνες και τα οργανοχλωριωμένα τύπου DDT “βραχυκυκλώνουν” το ΝΣ των εντόμων ενεργοποιώντας ιοντικά κανάλια ( $\text{Na}^+$ ) με συνεπακόλουθο την νευρική υπερδιέργεια, την παράλυση και τελικά τον θάνατο. Η δράση τους είναι αντιστρεπτή, οπότε έντομα με χαμηλή ευαισθησία ή που εκτίθενται σε χαμηλή συγκέντρωση μπορεί να συνέλθουν (Πηγή 18).

#### **A.3.1.1.5. Νεονικοτινοειδή**

Τα νεονικοτινοειδή εμφανίστηκαν σχετικά πρόσφατα και είναι εντομοκτόνα ευρέος φάσματος με αποτέλεσμα να έχουν μειωθεί πληθυσμοί ωφέλιμων εντόμων όπως αυτός των μελισσών (Πηγή 19). Η ιμιδακλοπρίδη (Πίνακας 1.2.) κυκλοφόρησε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και χρησιμοποιείται σε μεγάλη κλίμακα. Άλλο νεονικοτινοειδές είναι η κλοθειανιδίνη (Πίνακας 1.2.). Χημικά σχετίζονται με τη νικοτίνη, όμως η κατηγοριοποίηση βάσει της δομής τους είναι δύσκολη. Γενικά είναι αρωματικές, ετεροκυκλικές ενώσεις με συζυγείς δεσμούς και τα κοινά στοιχεία των ενώσεων που έχουν συντεθεί τα τελευταία χρόνια είναι η αρωματική ετεροκυκλική ομάδα, οι ελαστικές συνδετικές αλυσίδες, η ετεροκυκλική ομάδα ή ομάδα γουανιδίνης/αμιδίνης και μία ηλεκτρονιοελκτική ομάδα (Buszewski et al., 2019). Η δράση τους οφείλεται στη δέσμευση των μετασυναπτικών (νικοτινικών) υποδοχέων της ακετυλοχολίνης στο

περιφερειακό ΝΣ των εντόμων και όχι στην παρεμπόδιση της ακετυλοχολινεστεράσης, όπως η νικοτίνη. Αποτέλεσμα της δέσμευσης των υποδοχέων είναι η παρεμπόδιση της φυσιολογικής μετάδοσης των νευρικών σημάτων, η διαρκής υπερδιέγερση, η πρόκληση νευρικών σπασμών, η παράλυση και τελικά ο θάνατος του εντόμου (Jeschke and Nauen, 2010).

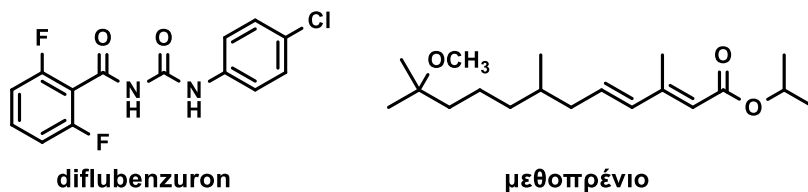
**Πίνακας 1.2.** Χημικές δομές και κατηγορίες συνθετικών εντομοκτόνων.

Εντομοκτόνα	Χαρακτηριστικές Δομές	
OCs	 <p>DDT</p>	 <p>αλδρίνη</p>
OPs	 <p>μαλαθειό</p>	 <p>τέμεφος</p>
Καρβαμιδικά	 <p>bendiocarb</p>	 <p>προροχur</p>
Πυρεθροειδή	 <p>δελταμεθρίνη</p>	 <p>περμεθρίνη</p>
Νεονικοτινοειδή	 <p>ιμιδακλοπρίδη</p>	 <p>κλοθειανιδίνη</p>

### A.3.1.2. Ρυθμιστές Ανάπτυξης Εντόμων (IGRs)

Μία νέα προσέγγιση για την καταπολέμηση των κουνουπιών είναι οι Ρυθμιστές Ανάπτυξης Εντόμων (Insect Growth Regulators, IGRs), μια ομάδα εντομοκτόνων που δεν ταξινομούνται με βάση τη χημική τους δομή αλλά με βάση τον τρόπο δράσης τους. Οι κυριότερες ομάδες των IGRs είναι οι αναστολείς σύνθεσης της χιτίνης και οι ενώσεις που παρεμβαίνουν στη δράση των ορμονών των εντόμων. Δεν πρέπει να συγχέονται με άλλα συνθετικά εντομοκτόνα των οποίων ο μηχανισμός δράσης είναι διαφορετικός και στοχεύει στο ΝΣ των εντόμων. Ένας IGR δεν είναι απαραίτητο να είναι τοξικός απέναντι στον στόχο του αλλά μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ανωμαλίες οι οποίες επηρεάζουν την επιβίωση του εντόμου. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι οι περισσότεροι IGRs που είναι αποτελεσματικοί, προκαλούν άμεσα τον θάνατο λόγω κάποιας αποτυχημένης ζωτικής διαδικασίας και λειτουργούν είτε μέσω της ρύθμισης της μεταμόρφωσης είτε μέσω της παρεμβολής στην αναπαραγωγή. Οι ενώσεις οι οποίες διακόπτουν τη μεταμόρφωση του εντόμου είναι υπεύθυνες και για τον σχηματισμό ακμαίων που δεν αναπαράγονται, και εκείνες που παρεμβαίνουν ειδικά στην αναπαραγωγή μπορεί να σχηματίσουν ενήλικα με συγκεκριμένες μορφογενετικές ανωμαλίες. Δεν είναι εκλεκτικοί, όμως θεωρούνται περισσότερο ασφαλείς από τα άλλα συνθετικά εντομοκτόνα.

Οι αναστολείς σύνθεσης της χιτίνης (Chitin Synthesis Inhibitors, CSIs) είναι κυρίως προνυμφοκτόνα και εφόσον οι προνύμφες έρθουν αντιμέτωπες με αυτές τις ενώσεις αναπτύσσονται έως την έκδυση χωρίς να μπορούν να μεταμορφωθούν, μιας και δεν έχει βιοσυντεθεί η χιτίνη, κύριο συστατικό του εξωσκελετού των εντόμων και δεν έχει σχηματιστεί ο νέος ενδοσκελετός. Αντιπρόσωπος των CSIs είναι το diflubenzuron (Εικόνα 1.10.), εγκεκριμένο προνυμφοκτόνο και στην χώρα μας. Η ανάπτυξη των εντόμων ελέγχεται με την ΡΤΤΗ, τις ορμόνες νεότητας (JHs) και τα εκδυστεροειδή. Οι JHs ελέγχουν την εμβρυογένεση, τη μεταμόρφωση, την αναπαραγωγή, τη διάπαυση, την επικοινωνία και άλλες διαδικασίες. Τα συνθετικά ανάλογα των ορμονών νεότητας (JHAs), όπως το μεθοπρένιο (Εικόνα 1.10.) μιμούνται τις JHs και προκαλούν πρόωρη ανάπτυξη, ενώ οι anti-JHs ανταγωνίζονται τις JHs και καθυστερούν την ανάπτυξη (Tunaz and Uygun, 2004).



**Εικόνα 1.10.** Χημική δομή του diflubenzuron (CSI) και του μεθοπρενίου (JHA).

### **A.3.1.3. Εντομοκτόνα και Επιπτώσεις**

Τα εντομοκτόνα στοχεύουν στην παρεμπόδιση της φυσιολογικής λειτουργίας των εντόμων και τελικά το θάνατό τους. Με τη χρήση τους πραγματοποιήθηκε γρήγορη κάλυψη μεγάλων εκτάσεων, άμεσο αποτέλεσμα με χαμηλό κόστος (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011), αύξηση της γεωργικής παραγωγής και βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Τα σύγχρονα εντομοκτόνα βοήθησαν την αύξηση της παραγωγής μέχρι και 50% κατά την περίοδο 1945-1965 (Πηγή 20). Παράλληλα, η συμβολή τους στον περιορισμό ασθενειών που μεταδίδονται μέσω εντόμων, είναι μεγάλη. Εντούτοις, η εκτεταμένη και αλόγιστη χρήση εντομοκτόνων ευρέος φάσματος και με υψηλή υπολειμματική δράση οδήγησε στην δημιουργία τοξικολογικών και οικοτοξικολογικών προβλημάτων (Becker et al., 2010). Βέβαια οι αρνητικές επιπτώσεις της χρήσης εντομοκτόνων περιορίζονται, ύστερα από την εκπόνηση εξειδικευμένων μελετών που καθορίζουν την κατάλληλη εποχή επέμβασης και τη χρήση της ελάχιστης δυνατής ποσότητας με τον καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, με γνώση, ενημέρωση και ευαισθητοποίηση από όλους τους πολίτες (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Η αντιμετώπιση των κουνουπιών μπορεί να επιτευχθεί με γνώμονα τη περιβαλλοντική διαχείριση και η επιστημονική κοινότητα οφείλει να εστιάσει στην ανάπτυξη νέων μεθόδων και νέων, ασφαλέστερων εντομοκτόνων πιο φιλικών στον πλανήτη.

#### **A.3.1.3.1. Επιπτώσεις στην Ανθρώπινη Υγεία**

Οι επιπτώσεις των εντομοκτόνων στην υγεία περιλαμβάνουν τόσο οξεία όσο και χρόνια προβλήματα. Οι οξείες επιπτώσεις στην υγεία εμφανίζονται αμέσως μετά την έκθεση σε αυτά και μπορεί να περιλαμβάνουν ερεθισμό στο δέρμα και τα μάτια, πονοκέφαλο, ζάλη, ναυτία, αδυναμία, δυσκολία στην αναπνοή, διανοητική σύγχυση και αποπροσανατολισμό, σπασμούς, κώμα και θάνατο. Οι χρόνιες επιπτώσεις στην υγεία μπορεί να μην είναι εμφανείς μέχρι μήνες ή χρόνια μετά την έκθεση και περιλαμβάνουν διαταραχές στο νευρικό, αναπαραγωγικό, ανοσοποιητικό και λεμφικό σύστημα και την εμφάνιση καρκίνου. Τα παιδιά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην έκθεση σε εντομοκτόνα λόγω του μικρού μεγέθους του σώματός τους και του ανώριμου ανοσοποιητικού συστήματος. Παρά το γεγονός ότι ο καθένας είναι σε κίνδυνο από την έκθεση, οι πιο ευάλωτες ομάδες είναι τα παιδιά, οι έγκυες γυναίκες, οι ηλικιωμένοι, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία και τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (Stahl, 2002).

#### **A.3.1.3.2. Περιβαλλοντικές Επιπτώσεις**

Η ανίχνευση υπολειμμάτων εντομοκτόνων σε τρόφιμα και η είσοδός τους στην τροφική αλυσίδα, η μόλυνση του περιβάλλοντος, η ρύπανση των υπόγειων υδάτων, η βιοσυσσώρευση και άλλες αρνητικές επιδράσεις σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο, όπως ο άνθρωπος και τα ωφέλιμα έντομα αποτελούν σημαντικά ζητήματα που ακολούθησαν την αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων (Novak and Lampman, 2010; Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Τα εντομοκτόνα δεν κάνουν, όπως είναι φυσικό, διάκριση ανάμεσα σε ωφέλιμα και βλαβερά έντομα. Το γεγονός ότι ο αριθμός των μελισσών έχει μειωθεί σημαντικά εξαιτίας της χρήσης εντομοκτόνων και κυρίως των νεονικοτινοειδών, δημιουργεί σημαντικά προβλήματα για την ομαλή λειτουργία του οικοσυστήματος (Colin et al., 2004). Οι μέλισσες έχουν ενεργό ρόλο στην γονιμοποίηση των φυτών, καθώς δρουν ως μηχανικοί μεταφορείς της γύρης, αποτελώντας το 80% περίπου των επικονιαστικών εντόμων (Πηγή 21). Στις 27 Απριλίου 2018, κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης συμφώνησαν στην απαγόρευση των νεονικοτινοειδών ιμιδακλιπρίδη, κλοθειανιδίνη και θειαμεθοξάμη (Πίνακας 1.2.), εκτός της χρήσης τους σε κλειστά θερμοκήπια, ύστερα από αναφορά της EFSA σχετικά με τον υψηλό κίνδυνο που αντιμετωπίζουν οι μέλισσες και η απαγόρευση τέθηκε σε ισχύ στα τέλη του 2018 (Πηγή 19, 22).

Επιπλέον, είναι πιθανόν άλλες μορφές ζωής να τραφούν από τμήματα του φυτού που έχουν ψεκάσει με εντομοκτόνο ή να καταναλώσουν έντομα που έχουν υποστεί επίδραση εντομοκτόνου. Τα εντομοκτόνα υπό μορφή κόκκων είναι επικίνδυνα για τα πτηνά, καθώς μπορεί να καταναλωθούν από αυτά και να επιφέρουν το θάνατο. Σε περίπτωση που οι κόκκοι διαλυθούν και υπολείμματα του εντομοκτόνου βρεθούν σε τροφή που καταναλώσει κάποια μορφή ζωής, τότε είναι πιθανόν να επέλθει δηλητηρίαση. Επηρεάζεται άμεσα λοιπόν η τροφική αλυσίδα και τα περισσότερα εντομοκτόνα βιοσυσσωρεύονται (Palmer et al., 2007). Ανάλογα με τη μέθοδο εφαρμογής και τους κλιματικούς παράγοντες, μόνο το 10% των συμβατικών εφαρμοσμένων αγροχημικών μπορεί να φθάσει στο στόχο τους εγκαίρως και σε επαρκείς ποσότητες (Michaelakis et al., 2007).

#### **A.3.1.3.3. Ανθεκτικότητα**

Ορισμένα έντομα, όπως τα κουνούπια, αναπτύσσουν μηχανισμούς αντίστασης. Ως ανθεκτικότητα ορίζεται «η αναπτυσσόμενη ικανότητα μιας φυλής εντόμων να ανέχεται δόσεις τοξικών ουσιών που θα αποδεικνύονταν θανάσιμες για την πλειονότητα των ατόμων ενός φυσιολογικού πληθυσμού του ίδιου είδους» (Βόντας κ.α., 2007). Η αντοχή

που μπορεί να δείξει κάποιο έντομο όταν εκτεθεί σε εντομοκτόνο είναι διαφορετική και δεν κληρονομείται από γενιά σε γενιά. Η ανθεκτικότητα είναι φαινόμενο επιλογής, αποτέλεσμα δηλαδή των αλλαγών στις συχνότητες των γονιδίων σε ένα πληθυσμό.

Πριν από την εφαρμογή 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 ανθεκτικότητα χαρακτηρίζεται ως διασταυρούμενη ή έμμεση ανθεκτικότητα (cross resistance) όταν ο πληθυσμός δεν είναι ανθεκτικός σε ένα μόνο εντομοκτόνο μιας συγκεκριμένης κατηγορίας, αλλά και σε άλλα εντομοκτόνα της ίδιας κατηγορίας και ως πολλαπλή ανθεκτικότητα (multiple resistance) όταν ο πληθυσμός είναι ανθεκτικός σε διαφορετικές κατηγορίες εντομοκτόνων καθώς υπάρχουν ξεχωριστοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας για μη σχετιζόμενα εντομοκτόνα (Becker et al., 2010).

### A.3.2. Προνυμφοκτονία

Κυρίως για λόγους προστασίας της δημόσιας υγείας, η καταπολέμηση των ακμαίων με τις ειδικές επεμβάσεις που πραγματοποιούνται, όπως οι ψεκασμοί, είναι απαραίτητη σε ορισμένες περιπτώσεις. Η προνυμφοκτονία όμως στοχεύει στην αποτελεσματικότητα με τη χρήση εφαρμογών με ήπιες περιβαλλοντικές παρεμβάσεις αλλά και στον περιορισμό των εστιών ανάπτυξης και θα πρέπει να προηγείται και να δίνεται έμφαση σε αυτή. Σκοπός της προνυμφοκτονίας είναι να διατηρήσει τον κίνδυνο μετάδοσης των ασθενειών χαμηλό,



**Εικόνα 1.11.** Προνύμφη του είδους *Culex pipiens*.

καταπολεμώντας ένα σημαντικό τμήμα των πληθυσμού των κουνουπιών-φορέων πριν την ενηλικίωση και τη διασπορά τους. Η διαχείριση των κουνουπιών στο στάδιο της προνύμφης είναι πιο εύκολη, καθώς τα ενδιαίτημα των ακμαίων δεν είναι εύκολα προσβάσιμα. Βέβαια, η προνυμφοκτονία και συνολικά η σωστή διαχείριση των κουνουπιών, δεν μπορεί να επιτευχθεί χωρίς την εντομολογική επιτήρηση. Περιλαμβάνει τη χαρτογράφηση των εστιών αναπαραγωγής, τη συστηματική παρακολούθηση και καταγραφή των ειδών και πληθυσμών τους, την κατανομή τους σε τόπο και χρόνο, καθώς και το δειγματοληπτικό έλεγχο για τον εντοπισμό μολυσμένων εντόμων από συγκεκριμένα παθογόνα όποτε κρίνεται αναγκαίο (Πηγή 15).



### **A.3.2.1. Περιορισμός-Εξάλειψη Εστιών Ανάπτυξης**

Ο περιορισμός και κατ' επέκταση η εξάλειψη των εστιών ανάπτυξης των προνυμφών αποτελεί έναν εκ των σημαντικότερων μέτρων, μιας και προσφέρει μακροχρόνιο όφελος, ελαχιστοποιώντας την ευχέρεια πολλαπλασιασμού των κουνουπιών και μειώνει τη δυνατότητα ανάπτυξης υψηλών πληθυσμών για μεγάλο διάστημα χωρίς την ανάγκη χρήσης βιοκτόνων. Τέτοιες τακτικές είναι η επιχωμάτωση μικρών κοιλοτήτων του εδάφους και ο καθαρισμός της βλάστησης των εστιών για τη διευκόλυνση της κίνησης του νερού, ώστε να παρασύρονται τα ατελή στάδια (αρδευτικά ή αποστραγγιστικά κανάλια ή τάφροι, δεξαμενές συλλογής νερού, όχθες ποταμών ή ρυακιών, κοίτες χειμάρρων). Επιπλέον, είναι απαραίτητος ο περιορισμός των εστιών κοντά σε κατοικημένες περιοχές, όπως σιντριβάνια, μικρές καλλωπιστικές λίμνες, δεξαμενές εκτός λειτουργίας, αποχετεύσεις, διαρροές των συστημάτων ύδρευσης, φραγμένοι αγωγοί ομβρίων, δοχεία αποθήκευσης νερού ή άλλα αντικείμενα που κατακρατούν το νερό της βροχής ή ποτίσματος, εγκαταλελειμμένοι χώροι και κτίρια όπου συνήθως συσσωρεύονται απορρίμματα πάσης φύσεως, βιολογικοί καθαρισμοί κλπ. Κάθε πολίτης οφείλει με τη σειρά του να περιορίσει τις εστίες στους ιδιωτικούς χώρους. Ενδεικτικά, μπορούν να αναφερθούν οι διακοσμητικές δεξαμενές στις αυλές των σπιτιών, τα πεταμένα λάστιχα αυτοκινήτων, οι φραγμένες υδρορροές, τα στάσιμα νερά από λεκάνες, βάζα και γλάστρες, οι λακκούβες στο χλοοτάπητα ή σε άλλα σημεία του κήπου που συγκρατούν νερό, οι υδραυλικές εγκαταστάσεις με διαρροές, οι πισίνες που δεν καθαρίζονται και τα τενεκεδένια κουτιά ξεχασμένα στον κήπο με στάσιμο νερό στο εσωτερικό τους (Πηγή 15).

### **A.3.2.2. Βιολογική Αντιμετώπιση**

Η βιολογική καταπολέμηση σχετίζεται με τη μείωση του πληθυσμού στόχου με την χρήση αρπακτικών, παθογόνων, ανταγωνιστών ή ακόμη και τοξινών από μικροοργανισμούς (Woodring and Davidson, 1996) και μπορεί να επιτευχθεί με μεθόδους εμβολιασμού "inoculative" ή μαζικής εξαπόλυσης "inundative". Στον εμβολιασμό απελευθερώνεται μικρός αριθμός αρπακτικών, παρασίτων ή παθογόνων στο περιβάλλον του οργανισμού-στόχου, όπου οι παράγοντες αυτοί εγκαθίστανται, αναπαράγονται και πολλαπλασιάζονται στο νέο τους περιβάλλον με σκοπό τη μείωση του στόχου για μια σειρά γενεών, π.χ. η εξαπόλυση κουνουποφάγων ψαριών σε ορυζώνες. Στη μαζική εξαπόλυση απελευθερώνονται μαζικά αρπακτικά, παράσιτα, παθογόνα ή τοξίνες στο περιβάλλον των κουνουπιών για την άμεση επίδραση στους πληθυσμούς τους (Bellini et al., 1994; Walton, 2007).

#### **A.3.2.2.1. Φυσικοί Εχθροί**

Οι φυσικοί εχθροί των ανήλικων σταδίων είναι αποτελεσματικότεροι σε σχέση με εκείνους των ενηλίκων, διότι τα ανήλικα συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένα ενδιαιτήματα, ενώ τα ακμαία είναι εύκολο να αποφύγουν τους εχθρούς τους μιας και δραστηριοποιούνται κυρίως τις νυχτερινές ώρες (Becker et al., 2010). Για την αντιμετώπιση των ανηλικών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα αρπακτικά, π.χ. υδρόβια ημίπτερα και σκαθάρια, κωπήποδα (Copepoda), ύδρες (hydras) και πλατυέλμινθες (Turbellarian flatworms) (Foster and Walker, 2019). Το γένος *Toxorhynchites* (Εικόνα 1.12.), με μήκος που φτάνει τα 18 mm, ανήκει στην Υποοικογένεια κουνουπιών Culicinae και οι προνύμφες του έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, αν και τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα επιτυχή (Kumar and Hwang, 2006). Οι προνύμφες αυτές κυνηγούν και τρέφονται με προνύμφες κουνουπιών, ακόμα και του δικού τους είδους (κανιβαλισμός) (Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, 2011). Η συγκεκριμένη διατροφή, τους επιτρέπει να συλλέγουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στο στάδιο της προνύμφης με αποτέλεσμα τα ακμαία θηλυκά να μη τρέφονται με αίμα και δεν θεωρούνται είδη υγειονομικής σημασίας (Σαββοπούλου-Σουλτάνη κ.α., 2011).

Τα λαβροφάγα ψάρια είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που έχουν εφαρμοσθεί σε αρκετές χώρες, από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Είναι μικρού μεγέθους ώστε να επιβιώνουν σε ρηχά νερά, χρησιμοποιούν και άλλα είδη λείας, σε περίπτωση που οι προνύμφες των κουνουπιών απουσιάζουν, αντέχουν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασίας (10-40°C) και έντασης φωτός, είναι ανθεκτικά, αντέχουν στη μεταφορά και δεν αποτελούν τροφή για άλλα αρπακτικά ζώα. Ένα από τα κυριότερα είδη που χρησιμοποιούνται γι' αυτό το σκοπό είναι το *Gambusia affinis* (κουνουπόψαρο) (Εικόνα 1.12.) (Chandra et al., 2008). Εισήχθη στην Ελλάδα το 1927 και έχει ευρεία διάδοση σε περιοχές με γλυκά νερά. Χρησιμοποιήθηκε με μεγάλη αποτελεσματικότητα για την καταπολέμηση των κουνουπιών και ειδικότερα των ανωφελών που είναι υπεύθυνα για τη μετάδοση της ελονοσίας (Becker et al., 2010). Παρ' όλα αυτά, το γεγονός πως πολλά είδη κουνουπιών προτιμούν να εναποθέτουν τα αυγά τους σε οικοτόπους με χαμηλό κίνδυνο θήρευσης, οδηγεί πολλές φορές σε αποτυχία αντιμετώπισης των προνυμφών με λαβροφάγα ψάρια. Η χρήση τους, ιδιαίτερα σε πολύπλοκα, οικολογικής σημασίας συστήματα, όπως οι ορυζώνες, έχει προκαλέσει περιβαλλοντικές ανησυχίες, εν όψει των ανεπιθύμητων συνεπειών τους στην τοπική υδρόβια πανίδα και τη διαταραχή των φυσικών οικοσυστημάτων, με τα ψάρια θηρευτές να συναγωνίζονται τους ενδημικούς θηρευτές (Hoddle, 2004).



**Εικόνα 1.12.** Φυσικοί εχθροί. Θηλυκό και αρσενικό *Gambusia affinis*. Προνύμφη του είδους *Toxorhynchites rutilus* καταναλώνει προνύμφη του γένους *Culex*.

#### **A.3.2.2.2. Βιολογικά Παρασκευάσματα**

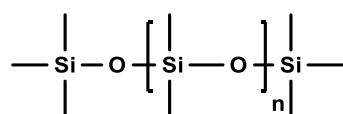
Τα φυσικά παθογόνα που κυκλοφορούν και σε εμπορική κλίμακα είναι σκευάσματα των παθογόνων βακίλων *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (B.t.i.) και του *Bacillus sphaericus* (B.s.). Προνυμφοκτόνο ρόλο στο B.t.i., διαδραματίζουν τα σπόρια του βακίλου, όπου κατά το σχηματισμό τους παράγονται τοξίνες που ενεργοποιούνται στον πεπτικό σωλήνα του εντόμου με την προϋπόθεση το pH να είναι αλκαλικό (Tetreau et al., 2012). Το B.t.i παράγει 4 ενδοτοξίνες (Cry 4a, Cry 4b, Cry 11a, Cry 1A) (Ζιώγας και Μαρκόγλου, 2007). Η κατανάλωση των τοξινών από τις προνύμφες, κυρίως των πρώτων ηλικιών που τρέφονται περισσότερο, προκαλούν βλάβη στο πεπτικό τους σύστημα, ενώ είναι αβλαβείς γι' άλλους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Tetreau et al., 2012). Δεν ανακυκλώνονται στο περιβάλλον και γι' αυτό απαιτούνται επανειλημμένες εφαρμογές.

Παρόμοιες ιδιότητες έχει και το B.s., το οποίο είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό ενάντι των ειδών *Culex* spp. και *Anopheles* spp. και ανακυκλώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο περιβάλλον, διατηρώντας την προνυμφοκτόνο του δράση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, η εκτεταμένη του χρήση είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ανθεκτικότητας στη Γαλλία και στη Βραζιλία. Οι ανθεκτικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από την έκκριση πρωτεασών στο έντερο, οι οποίες απενεργοποιούν τις πρόδρομες μορφές των τοξινών του B.s. και για αυτό το λόγο η χρήση του απαιτεί προσοχή (Poopathi and Abidha, 2010). Αν και βιοκτόνα βιολογικής προέλευσης, με βάση το B.t.i. και το B.s., χρησιμοποιούνται σε πολλές χώρες αποτελεσματικά και χωρίς αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον, η χρήση τους περιορίζεται. Ο περιορισμός οφείλεται στη μικρή υπολειμματική τους διάρκεια (Tetreau et al., 2012), στο υψηλό κόστος εξαιτίας του τρόπου παρασκευής τους, στην εξάρτηση της αποτελεσματικότητάς τους από τις συνθήκες περιβάλλοντος και στην υψηλή εξειδίκευση του προσωπικού που τα εφαρμόζει.

### A.3.2.3. Μονομοριακά φιλμ με βάση την σιλικόνη

Παρά τις οικολογικές συνέπειες, το πετρέλαιο χρησιμοποιήθηκε παλαιότερα σε υδάτινες επιφάνειες σαν εμπόδιο της μετατροπής των ανήλικων σταδίων σε ακμαία. Η αντικατάστασή του από έλαια φυτών δεν ήταν αποτελεσματική, καθώς το στρώμα που δημιουργείται συσσωρεύεται κοντά σε βλάστηση και επηρεάζεται από τον αέρα. Τα τελευταία χρόνια, τα μονομοριακά φιλμ που βασίζονται στη σιλικόνη, silicone-based monomolecular film (MMF), έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση των κουνουπιών (Sukkanon et al., 2016). Δρουν εναντίον των προνυμφών των κουνουπιών με μηχανικό τρόπο, εφαρμόζονται εύκολα σε υδατινούς όγκους χωρίς ψεκασμό και εξαπλώνονται γρήγορα σε όλη την υδατινή επιφάνεια σχηματίζοντας μονομοριακή μεμβράνη με επακόλουθο τη διαταραχή της επιφανειακής τάσης του νερού (Πηγή 23). Εμποδίζεται έτσι η αναπνοή των προνυμφών/νυμφών των κουνουπιών, με αποτέλεσμα τη θανάτωσή τους από ασφυξία, επέρχεται πνιγμός των ακμαίων που προκύπτουν από τις νύμφες μιας και δεν μπορούν να πετάξουν και παρεμποδίζεται η ωτοκία λόγω της δυσκολίας απόθεσης ωών (Becker et al., 2010).

Οι PDMSs (πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο) (Εικόνα 1.13.) ανήκουν σε μία ομάδα πολυμερών οργανικών ενώσεων του πυριτίου, γνωστές στο ευρύ κοινό ως σιλικόνες. Είναι αδρανείς, μη τοξικές, μη αναφλέξιμες, και συναντώνται σε ένα εύρος προϊόντων. Έχουν μεγάλο μοριακό βάρος, μικρή διαλυτότητα, δεν πραγματοποιείται βιοσυσσώρευση διότι είναι αδύνατον να προσροφηθούν και να διαπεράσουν οποιαδήποτε κυτταρική μεμβράνη έμβιου οργανισμού και η δέσμευσή τους στο έδαφος με την πάροδο του χρόνου οδηγεί σε βιοαποικοδόμηση. Αποικοδομούνται σε μία υδατοδιαλυτή ένωση  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{OH})_2$  (διυδροξυδιμεθυλοσιλάνιο) και έπειτα σε  $\text{CO}_2$ , νερό και άλατα πυριτίου (άμμος), είναι ασφαλείς για το περιβάλλον και για την ανθρώπινη υγεία, δεν παρουσιάζουν επιπτώσεις σε υδατινούς οργανισμούς ή σε οργανισμούς του εδάφους, τοξικότητα, καρκινογένεση, επίδραση στην αναπαραγωγή, μεταλλάξεις και αυτοάνοσες διαταραχές στους ανθρώπους. Στη χώρα μας κυκλοφορεί το προνυμφοκτόνο σκεύασμα μονομοριακού φιλμ με βάση τη σιλικόνη, AQUATAIN AMF, μέλος των PDMSs, και δεν απαιτείται άδεια έγκρισης κυκλοφορίας του ως βιοκτόνο-εντομοκτόνο υγειονομικής σημασίας (Πηγή 24).



Εικόνα 1.13. Χημική δομή PDMSs.

#### **A.3.2.4. Εγκεκριμένα Βιοκτόνα**

Η καταπολέμηση των προνυμφών με βιοκτόνα ξεκινά εγκαίρως, αμέσως μετά την εμφάνιση των πρώτων προνυμφών στις υδάτινες εστίες και συνεχίζει έως και τουλάχιστον μέχρι τις αρχές Οκτωβρίου. Ο ψεκασμός πραγματοποιείται με κατάλληλα ψεκαστικά μηχανήματα, ώστε το βιοκτόνο να φθάνει στην επιφάνεια του νερού της εστίας και να μην κατακρατείται από υπάρχουσα βλάστηση. Τα βιοκτόνα είναι δυνατόν να προκαλέσουν ρύπανση του περιβάλλοντος ή/και τοξικότητα στους διάφορους οργανισμούς, επομένως επιλέγονται βάσει της χρήσης για την οποία προορίζεται το νερό της εστίας. Η εφαρμογή τους γίνεται κυρίως από εδάφους και μόνο σε ειδικές περιπτώσεις από αέρος, εφόσον υπάρχει αδυναμία κάλυψης των εστιών με επίγεια μέσα (π.χ. ορυζώνες, έλη κλπ.). Όταν το νερό χρησιμοποιείται για το πότισμα των ζώων, την άρδευση των καλλιεργειών και σε περιπτώσεις όπου ζουν σε αυτό υδρόβιοι οργανισμοί, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Τα νερά που προορίζονται για απόληψη πόσιμου νερού, καθώς και τα ιχθυοτρόφα ύδατα δεν ψεκάζονται εξαιτίας της τοξικότητας των σκευασμάτων. Σε οικολογικά προστατευόμενες περιοχές (Natura κλπ.) ενδείκνυται μόνο η χρήση των σκευασμάτων B.t.i. Τα σκευάσματα βιοκτόνων που χρησιμοποιούνται στα προγράμματα καταπολέμησης των προνυμφών διαθέτουν έγκριση κυκλοφορίας στη χώρα μας. Η χρήση κάθε εγκεκριμένου σκευάσματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με την έγκριση κυκλοφορίας του και τις οδηγίες ασφαλούς και ορθής χρήσης, που περιγράφονται στην ετικέτα. Στην Ελλάδα επιτρέπονται ορισμένα σκευάσματα με δραστικές το βιολογικό παράγοντα B.t.i. που επιτρέπεται η χρήση του και σε ορυζώνες και το IGR εντομοκτόνο diflubenzuron, που επιτρέπεται η χρήση του μόνο σε υδάτινους όγκους (Πηγή 15).

#### **A.3.3. Ακμαιοκτονία**

Η αντιμετώπιση των ακμαίων πρέπει να εφαρμόζεται συμπληρωματικά της καταπολέμησης των προνυμφών, όταν οι συνθήκες το επιβάλλουν, π.χ. στην περίπτωση εμφάνισης επιδημιών.

##### **A.3.3.1. Βιολογική Αντιμετώπιση**

Πολλοί φυσικοί εχθροί έχουν την ικανότητα να περιορίζουν τον αριθμό των ακμαίων, ωστόσο δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανεξάρτητη μέθοδος. Έχουν καταγραφεί πολλά ζώα που συμβάλλουν στην καταπολέμηση, από αρπακτικά αρθρόποδα (αράχνες, λιβελούλες κ.α.) έως αμφίβια (π.χ. βάτραχοι-*Bufo virides*) (Raghavendra et al., 2008), ερπετά όπως είδη σαυρών, υδρόβια πουλιά που τρέφονται με τις

προνύμφες των κουνουπιών ή με τα ενήλικα έντομα και θηλαστικά (π.χ. νυχτερίδες). Τα αρπακτικά έντομα, σε σχέση με τους υπόλοιπους φυσικούς εχθρούς, έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν κουνούπια σε ποικιλία ενδιαιτημάτων, όπου η εφαρμογή άλλων βιολογικών μέτρων καταπολέμησης είναι δύσκολη, όπως τρύπες δέντρων και υδάτινες μάζες που συγκρατούνται από τα φυτά σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Shaalán and Canyon, 2009).

Τέλος, τα σαρκοφάγα φυτά, με τη βοήθεια ορισμένων οργάνων τους, συλλαμβάνουν έντομα, τα οποία με κατάλληλες διεργασίες τα μετατρέπουν σε αφομοιώσιμες ουσίες πλούσιες σε άζωτο. Έχει παρατηρηθεί ότι τα φυτά αυτά, 400 είδη περίπου, βρίσκονται σε υγρά βαλτώδη μέρη ή ακόμη και μέσα στο νερό, όπου η περιεκτικότητα του εδάφους και του νερού σε άζωτο είναι χαμηλή.

### **A.3.3.2. Τεχνική Εξαπόλυσης Στείρων Εντόμων (SIT)**

Η καταπολέμηση φυσικού πληθυσμού με τεχνικές γενετικού ελέγχου αποτελεί ένα νέο όπλο για τη μείωση των VBD και την καταπολέμηση των εντόμων που τις μεταδίδουν (Varmus et al., 2003). Μια τέτοια τεχνική, γνωστή και ως SIT (Sterile Insect Technique), έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών εντόμων και έχει ως στόχο τη διαταραχή της φυσικής αναπαραγωγικής διαδικασίας (Dyck et al., 2005). Βασίζεται στη μαζική εκτροφή, τη στείρωση των αρσενικών και την απελευθέρωσή τους στην ύπαιθρο, όπου ζευγαρώνουν με τα αυτόχθονα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού. Τα θηλυκά που ζευγαρώνουν με τα στείρα αρσενικά παράγουν μη βιώσιμα ωά και ο γηγενής πληθυσμός των εντόμων μειώνεται (Nolan et al., 2011). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε προγράμματα καταπολέμησης της ελονοσίας. Το ΜΦΙ σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, την Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (ΕΕΑΕ) και το Joint FAO/IAEA Insect Pest Control Laboratory έχουν ήδη ξεκινήσει την εφαρμογή της μεθόδου αυτής στη χώρα μας έναντι του *Aedes albopictus* από το φθινόπωρο του 2018 στην περιοχή της Βραυρώνας (Πηγή 25).

Η στείρωση γίνεται, συνήθως μέσω της ακτινοβολίας γάμμα, διάφορων χημικών ενώσεων ή μέσω της παραγωγής στείρων υβριδίων. Ορισμένα μειονεκτήματα της τεχνικής SIT είναι η χρονοβόρα, χειρωνακτική διαλογή αρσενικών ενηλίκων, η πιθανότητα απελευθέρωσης γόνιμων αρσενικών παρά τη χρήση της ακτινοβολίας, η μειωμένη διάρκεια ζωής τους, το υψηλό κόστος της ακτινοβολίας και η δυνητική επικινδυνότητά της. Μεγάλη σημασία διαδραματίζει η περίοδος εξαπόλυσης, ώστε να επιτευχθεί ανταγωνισμός με τα άγρια αρσενικά και να συζευχθούν με τα θηλυκά του φυσικού πληθυσμού (Becker et al., 2010).

### A.3.3.3. Παγίδες και Ελκυστικά

Η χρήση παγίδων και ελκυστικών χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση του πληθυσμού των ακμαίων, αλλά και συμπληρωματικά για την αντιμετώπισή τους μέσω της μαζικής συλλογής τους. Οι παγίδες που κυκλοφορούν στο εμπόριο έχουν ως ελκυστικό συνήθως το CO<sub>2</sub> μαζί με άλλες ενώσεις που ελκύουν τα έντομα (γαλακτικό οξύ, αμμωνία, 1-οκτεν-3-όλη, ακετόνη, καρβοξυλικά οξέα μικρής αλυσίδας) και ορισμένες από αυτές δρουν συνεργιστικά. Η παραγωγή CO<sub>2</sub> γίνεται συνήθως με καύση προπανίου, χρήση βακτηρίων ή/και μυκήτων καθώς και ξηρού πάγου (στερεή μορφή CO<sub>2</sub>). Πολλές από τις παγίδες είναι φωτεινές, καθώς ελκύουν κουνούπια που είναι δραστήρια και νύσσουν τη νύχτα (Sriwichai et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές για τον έλεγχο των κουνουπιών επικεντρώνονται σε φιλικότερες στο περιβάλλον προσεγγίσεις, όπως η χρήση σημειοχημικών φυσικής ή χημικής προέλευσης (Sukumaran, 2016). Τα σημειοχημικά είναι μόρια, υπεύθυνα για την επικοινωνία μεταξύ των εντόμων και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα αλληλοχημικά και τις φερομόνες (Mori, 2000). Σε αντίθεση με τα αλληλοχημικά που χρησιμοποιούνται για επικοινωνία από άτομα που ανήκουν σε διαφορετικά είδη, οι φερομόνες χρησιμοποιούνται από άτομα του ίδιου είδους (Charman, 1998).

H(-)-(5R,6S)-6-ακετοξυ-5-εξαδεκανολιδίνη είναι φερομόνη ωοθεσίας, περιέχεται στις σταγόνες που σχηματίζονται στην κορυφή κάθε ωού στις σχεδίες, όπως στο είδος *Culex quinquefasciatus* και δρα ως υποκινητής για ωοαπόθεση και άλλων θηλυκών στο συγκεκριμένο σημείο (Michaelakis et al., 2005). Υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση των ακμαίων είναι η στρατηγική «Προσέλκυσης και Εξολόθρευσης» (“Attract and Kill”) όπου το έντομο οδηγείται στο βιοκτόνο και όχι το βιοκτόνο στο έντομο. Με αυτή τη μέθοδο συνδυάζεται η χρήση φερομονών με εντομοκτόνα, ελαχιστοποιείται η χρήση των εντομοκτόνων, καθώς η επέμβαση γίνεται στο στάδιο της προνύμφης και μόνο στους προκαθορισμένους χώρους, αποφεύγεται η επαφή με οργανισμούς που δεν είναι στόχοι και ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Βέβαια, η εξειδίκευση ως προς τον οργανισμό στόχο είναι μεγάλη και η υψηλή πτητικότητα των φερομονών απαιτεί τη δημιουργία σταθερών συστημάτων αποδέσμευσής τους. Στην έρευνα των Michaelakis et al., 2007 χρησιμοποιήθηκε το προνυμφοκτόνο τέμεφος και μικροκάψουλες πολυουρίας, στις οποίες εγκλείεται το μίγμα διαστερεομερών της φερομόνης ωοθεσίας 6-ακετοξυ-5-εξαδεκανολιδίνη. Οι μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

#### **A.3.3.4. Χημική Αντιμετώπιση**

Κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών, σε περιοχές υψηλού κινδύνου, εντοπίζονται τα καταφύγια διαχείμασης των ακμαίων, π.χ. καταλύματα ζώων και άλλα οικήματα, και ψεκάζονται με κατάλληλα βιοκτόνα πριν την άνοιξη, ώστε να εξοντωθεί ο πληθυσμός που δίνει την πρώτη γενιά. Οι υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών χώρων (IRS), οι εκνεφώσεις (ULV) από εδάφους και η εφαρμογή ακμαιοκτόνων βιοκτόνων από αέρος εφαρμόζονται συμπληρωματικά σε περίπτωση καταγραφής κρουσμάτων VBD.

##### **A.3.3.4.1. Υπολειμματικοί Ψεκασμοί**

Οι υπολειμματικοί ψεκασμοί εσωτερικών χώρων (Indoor residual spraying, IRS) πραγματοποιούνται σε εσωτερικούς τοίχους και ταβάνια κτιρίων, καλά αεριζόμενων και συχνά σε χώρους με πυκνή βλάστηση ή έλη ακόμα και σε χώρους οικόσιπων ζώων. Ο εσωτερικός ψεκασμός και η αποτελεσματικότητα του οφείλεται στον ενδοφιλικό χαρακτήρα των κουνουπιών, που ψάχνοντας για αίμα, εισέρχονται στο οικιακό περιβάλλον των ανθρώπων και των ζώων. Όταν το κουνούπι έρθει σε επαφή με ψεκασμένη επιφάνεια, απορροφά θανάσιμη δόση και επέρχεται θάνατος. Ο ψεκασμός σε εξωτερικές επιφάνειες κτιρίων πραγματοποιείται όταν κρίνεται απαραίτητο, όπως κατά τη διάρκεια επιδημιών. Συνήθως πραγματοποιείται ένας ψεκασμός τον χρόνο, πριν την πρώτη γενιά και τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως τα πυρεθροειδή. Η μέθοδος αυτή αποτελεί σημαντικό όπλο για τον περιορισμό των VBD (WHO, 2015).

##### **A.3.3.4.2. Ψεκασμοί ανοιχτού χώρου με σκευάσματα υπέρμικρου όγκου (UVL) από εδάφους ή αέρος**

Τα σκευάσματα υπέρμικρου όγκου (UVL) είναι ακμαιοκτόνα και η συνεχόμενη χρήση τους είναι απαραίτητη για την επιτυχία της ακμαιοκτονίας. Η εφαρμογή αυτή στηρίζεται στον ελάχιστο αποδοτικό όγκο προϊόντος χωρίς περαιτέρω διάλυση. Σε περίπτωση διάλυσης, όπως και στην IRS, τότε αυτή ορίζεται ως LV (low volume) ή HV (high volume), αναλόγα με το επίπεδο της διάλυσης. Η συγκέντρωση του προϊόντος εξαρτάται από την δραστική και ο όγκος που εφαρμόζεται εξαρτάται από την τοξικότητα της ένωσης και το είδος που στοχεύει. Το μέγεθος του σωματιδίου παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση του προϊόντος, με βέλτιστη διάμετρο μικρότερη των 20 μm, τόσο μικρό ώστε να παράγεται επαρκής ποσότητα, αλλά και τόσο μεγάλο ώστε να έρχεται σε



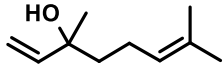
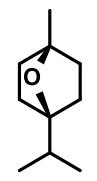
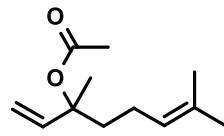
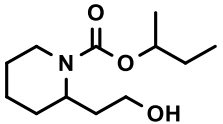
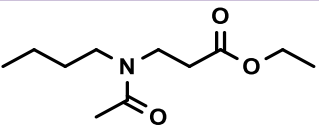
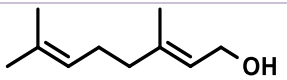
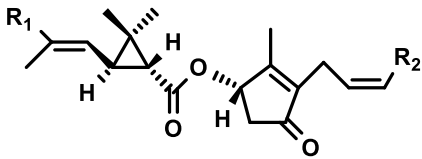
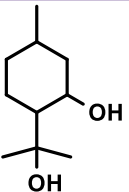
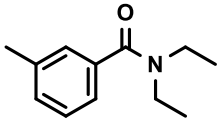
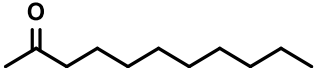
επαφή με το σώμα του στόχου. Η ποικιλία των συσκευών είναι μεγάλη. Ψεκασμοί με UVL από εδάφους αλλά και αέρος εφαρμόζονται εδώ και 45 χρόνια (Bonds, 2012).

#### **A.3.3.5. Ατομική Προστασία**

Η ενημέρωση και ευαισθητοποίηση του πληθυσμού είναι αναπόσπαστο κομμάτι ενός Ολοκληρωμένου Προγράμματος Καταπολέμησης Κουνουπιών. Κάποια από τα προτεινόμενα μέτρα είναι η τοποθέτηση αντικουνουπικών πλεγμάτων (σητών) στις οικίες και η χρήση κουνουπιέρων, ανεμιστήρων ή κλιματιστικών. Η χρήση μηχανικών μέσων δεν έχει ως σκοπό την μείωση των κουνουπιών αλλά την προστασία και την άνετη διαβίωση των ανθρώπων και των ζώων από αυτά στους χώρους διαβίωσής τους. Μέτρα προστασίας μεταξύ άλλων είναι το κούρεμα του γρασιδιού, θάμνων και φυλλωσιών, το πότισμα των φυτών κατά τις πρωινές ώρες και η κάλυψη του σώματος με κατάλληλα ενδύματα που προστατεύουν το σώμα (Πηγή 15). Με τον καπνισμό εσωτερικών ή εξωτερικών χώρων γίνεται διάχυση πτητικών βιοκτόνων στον αέρα, με επάκολουθο κυρίως την απώθηση των κουνουπιών παρά τη θανάτωσή τους και βρίσκονται σε μορφή καπνογόνων σπιράλ (φιδάκια), ηλεκτροθερμαινόμενων πλακιδίων και υγρών εντομοαπωθητικών χώρου. Η δραστική ουσία απελευθερώνεται έπειτα από θέρμανση, με διάρκεια δράσης όσο η καύση τους (Εμμανουήλ, 1999; Σαββοπούλου-Σουλτάνη κ.α., 2011). Τα εντομοαπωθητικά τύπου σπιράλ περιέχουν κατά κύριο λόγο πυρεθρίνες, κατά τη χρήση τους όμως παράγονται προϊόντα ατελούς καύσης όπως το μονοξειδίο του άνθρακα και πτητικές ενώσεις (VOCs). Κάποιες από τις ενώσεις που εκλύονται είναι καρκινογόνες, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), η φορμαλδεΰδη και το βενζόλιο και άλλες ενώσεις (αλδεΰδες) προκαλούν ερεθισμό στα μάτια και στο αναπνευστικό σύστημα (Zhang et al., 2010). Η φορμαλδεΰδη που εκπέμπεται από ένα σπιράλ μπορεί να είναι τόσο υψηλή όσο η ποσότητα που εκπέμπεται από 51 τσιγάρα (Liu et al., 2003). Η χρήση τους πρέπει να γίνεται με προσοχή και όχι σε κλειστούς χώρους. Τα βιοκτόνα, σε μορφή αερολύματος (aerosol), συνήθως περιέχουν πυρεθροειδή. Προορίζονται για την απαλλαγή του εσωτερικού των οικιών από κουνούπια ή άλλα ενοχλητικά έντομα, πρέπει να εφαρμόζονται σε κλειστό χώρο με κλειστές εξόδους και θανατώνουν τα κουνούπια άμεσα. Η σιτρονέλλα, το αιθέριο έλαιο των φύλλων και μίσχων διαφορετικών ειδών του γένους *Cymbopogon* (λεμονόχορτο) ταξινομείται στο εμπόριο σε δύο χημειότυπους, τον Ceylon και τον Java (Wany et al., 2013). Η μεθυλο-ευγενόλη που περιέχεται στον τύπο Ceylon σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου και στο Ηνωμένο Βασίλειο έχει απαγορευτεί η χρήση του. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό περί βιοκτόνων

(ΕΕ) 528/2012, δε θεωρείται εγκεκριμένο εντομοαπωθητικό (Πηγή 26) (Williams et al., 2013). Τα εγκεκριμένα εντομοαπωθητικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται, βρίσκονται σε μορφή αεροζόλ, πλακιδίου, σπείρας, υγρού, λοσιόν με δραστικές που φαίνονται στον Πίνακα 1.3. (Πηγή 27).

**Πίνακας 1.3.** Εντομοαπωθητικά και χημικές δομές.

Εντομοαπωθητικό	Δομή
<p>έλαιο λεβαντίνης (κύρια συστατικά)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>λιναλοόλη</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>ευκαλυπτόλη</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>οξικός λιναλυλεστέρας</p> </div>
<p>ικαριδίνη (ή πικαριδίνη)</p>	<div style="text-align: center;">  </div>
<p>IR3535</p>	<div style="text-align: center;">  </div>
<p>γερανιόλη</p>	<div style="text-align: center;">  </div>
<p>πυρεθρίνες</p>	<div style="text-align: center;">  </div>
<p>EC Oil (H/C) PMD</p>	<div style="text-align: center;">  <p>cis &amp; trans ισομερή</p> </div>
<p>DEET</p>	<div style="text-align: center;">  </div>
<p>2-εντεκανόνη</p>	<div style="text-align: center;">  </div>

#### **A.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ ΔΡΑΣΗ**

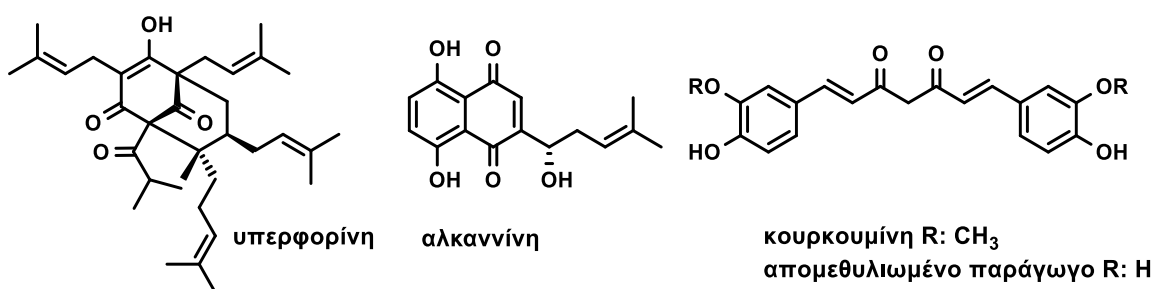
Το υψηλό κόστος των οργανοσυνθετικών εντομοκτόνων, οι περιβαλλοντικές ανησυχίες, οι ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων, η τοξικότητα και η παγκόσμια αύξηση ανθεκτικότητας οδήγησαν την έρευνα στην ανάπτυξη εντομοκτόνων φυσικής προέλευσης, μια εναλλακτική για την καταπολέμηση των κουνουπιών, χωρίς να επιβαρύνει την υγεία οργανισμών που δεν είναι στόχοι, ούτε και το περιβάλλον (Severini et al., 1993; Kishore et al., 2014). Πολλά είδη φυτών, είναι γνωστό πως έχουν βιολογική δράση και αυτό οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Τα φυσικά προϊόντα είναι χημικές ενώσεις που παράγονται από έναν ζωντανό οργανισμό όπως φυτά, μικροοργανισμούς και ζώα. Πέραν των πρωτογενών μεταβολιτών, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, νουκλεϊκά οξέα που αφορούν ενώσεις ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του οργανισμού, οι δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είναι απαραίτητοι για την επιβίωση, παράγονται σε μικρές ποσότητες και είναι χαρακτηριστικοί σε κάθε είδος (Stanforth, 2006). Με τον όρο φυσικά προϊόντα αναφερόμαστε κατά κύριο λόγο στους δευτερογενείς μεταβολίτες. Φυσικά προϊόντα θεωρούνται και τα εκχυλίσματα των φυτών και οι ενώσεις που μπορούν να απομονωθούν από αυτά. Επιπλέον, οι ενώσεις που συντίθενται στο εργαστήριο και απαντούν στη φύση θεωρούνται φυσικά προϊόντα. Πολλά φυσικά προϊόντα έχουν φαρμακολογική ή βιολογική δράση σε διάφορα πεδία και η εργαστηριακή σύνθεσή τους αποτελεί εργαλείο και πηγή έμπνευσης, λόγω των πολύπλοκων δομών τους, για νέες δομές με βελτιωμένη δράση.

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους, τα φυσικά προϊόντα είναι μία καλή πηγή εντομοκτόνων. Τα φυτοχημικά είναι ενώσεις που παράγονται από τους οργανισμούς κυρίως για την προστασία τους από παθογόνα, αρπακτικά ή ανταγωνιστές. Συχνά έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής στο περιβάλλον από τα συνθετικά εντομοκτόνα, βιοαποικοδομούνται, οδηγώντας σε μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Επιπλέον, τα βιοεντομοκτόνα φυτικής προέλευσης χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης από τα συνθετικά χημικά (Duke et al., 2010). Έτσι λοιπόν, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στην αξιολόγηση και τη σύνθεση φυσικών προϊόντων με εντομοκτόνο δράση. 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 οποία περιέχουν χημικές ενώσεις με εντομοκτόνες ιδιότητες (Ratnayake et al., 2001; Mongelli et al., 2002). Όπως έχει αναφερθεί και στην παράγραφο A.3.1., φυσικά προϊόντα με εντομοκτόνο δράση είναι νικοτίνη, η ροτενόνη,

της οποίας η χρήση έχει διακοπεί και οι φυσικές πυρεθρίνες, οι δραστικές ενώσεις του πυρέθρου οι οποίες είναι εστέρες που απομονώνονται από την εκχύλιση των αποξηραμένων ανθοκεφαλών του φυτού. Οι ξηρές ανθοταξίες περιέχουν 0.7-2% φυσικές πυρεθρίνες. Ένα τυπικό εκχύλισμα πυρέθρου περιέχει τα ακόλουθα ποσοστά πυρεθρινών (Εικόνα 1.8.): πυρεθρίνη I (35%), πυρεθρίνη II (32%), τζασμολίνη I (5%), τζασμολίνη II (4%), σινερίνη I (10%) και σινερίνη II (14%) (Dewick, 2002).

Τα αιθέρια έλαια είναι ευρέως φάσματος και η δράση τους μπορεί να σχετίζεται με την ανάσχεση λήψης τροφής από τα έντομα (antifeedants), την απωθητικότητα ή την υποκαπνιστική τους δράση (fumigants). Επιπλέον, μπορεί να επηρεάσουν βιολογικές παραμέτρους, όπως τον ρυθμό ανάπτυξης, τη διάρκεια ζωής και την αναπαραγωγή (Parachristos et al., 2004). Έχουν γίνει αρκετές μελέτες διερεύνησης της τοξικότητας αιθερίων ελαίων και συστατικών τους έναντι των προνυμφών του είδους *Culex pipiens* L. Οι Michaelakis et al., 2009a μελέτησαν την προνυμφοκτόνο δράση αιθερίων ελαίων ελληνικών φυτών της Οικογένειας *Rutaceae*, του είδους *Citrus* και οι τιμές  $LC_{50}$  για το πορτοκάλι (*Citrus sinensis* L.), το νεράτζι (*Citrus aurantium* L.) και το λεμόνι (*Citrus limon* L.) ήταν 51.5, 39.81 και 30.14 mg/L, αντίστοιχα. Όσον αφορά τα εναντιομερή του α- και β- πινένιου, συστατικά των εσπεριδοειδών που αναφέρθηκαν, οι τιμές  $LC_{50}$  κυμαίνονταν από 36.53 ως 66.52 mg/L.

Με άξονα την καταπολέμηση των κουνουπιών στο στάδιο των προνυμφών, έχουν συντεθεί σε εργαστήρια φυσικά προϊόντα και έχει αξιολογηθεί η δράση τους έναντι προνυμφών του είδους *Culex pipiens* L., όπως η αλκανίνη με  $LC_{50}$  12.35 mg/L (Michaelakis et al., 2009b), η υπερφορίνη με  $LC_{50}$  26.72 mg/L (Mitsopoulou et al., 2014), η κουρκουμίνη με  $LC_{50}$  19.07 mg/L και το απομεθυλιωμένο παράγωγό της με  $LC_{50}$  12.42 mg/L (Sagnou et al., 2012) (Εικόνα 1.14.).



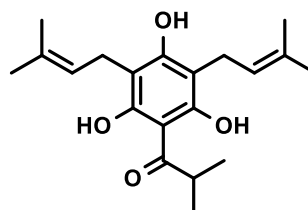
**Εικόνα 1.14.** Χημική δομή υπερφορίνης, αλκανίνης, κουρκουμίνης και της απομεθυλιωμένης κουρκουμίνης.

#### A.4.1. Το φυσικό προϊόν δεοξυκοχουμουλόνη (1)

Η δεοξυκοχουμουλόνη (1) (Εικόνα 1.16.) είναι ένα φυσικό προϊόν που ανήκει στις Μονοκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες (ΜΠΑ), οι οποίες απομονώνονται από είδη των οικογενειών *Myrtaceae* και *Cannabinaceae* και εμφανίζουν αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση (Mizobuchi et al., 1985; Zhao et al., 2005). Για παράδειγμα, από το λυκίσκο (*Humulus lupulus*) έχουν απομονωθεί δύο κατηγορίες ΜΠΑ, τα α-οξέα και τα β-οξέα τα οποία είναι παράγωγα των ακυλοφλωρογλυκινολών, με κοινό βιοσυνθετικό ενδιάμεσο τη δεοξυκοχουμουλόνη (1).



Εικόνα 1.15. Κώνος λυκίσκου της ποικιλίας Hallertauer.



δεοξυκοχουμουλόνη (1)  
Εικόνα 1.16. Χημική δομή της δεοξυκοχουμουλόνης (1).

#### A.4.2. Δευτερογενείς Μεταβολίτες Λυκίσκου

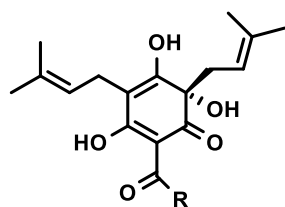
Ο λυκίσκος (*Humulus lupulus* Linnaeus) είναι ένα πολυετές φυτό, ανήκει στην Οικογένεια των *Κανναβινοειδών* (*Cannabaceae*) και χρησιμοποιείται στη ζυθοποιία. Τα φύλλα των κώνων του φυτού φέρουν αδενώδεις τρίχες που περιέχουν αιθέρια έλαια, τα οποία του προσδίδουν το χαρακτηριστικό του άρωμα, υδρόφοβες ενώσεις που ονομάζονται α- και β-πικρά οξέα και σε αυτά οφείλεται η πικρή γεύση της μπύρας, καθώς και ορισμένες φαινολικές ενώσεις, τα πρενυλ-φλαβονοειδή.

Τα κυριότερα τερπένια του αιθερίου ελαίου του λυκίσκου είναι τα μονοτερπένια α-πινένιο, β-πινένιο, μυρκένιο και λιμονένιο όπως επίσης και τα σесκιτερπένια, α-χουμουλένιο, β-φαρνεσένιο, β-καρυοφυλλένιο, α- και β-σελινένιο και γ-μουουρολένιο. Από τις οξυγονωμένες ενώσεις, που αποτελούν το 30% του ολικού ελαίου, οι κυριότερες είναι η λιναλοόλη, το οξειδίο του καρυοφυλλενίου και η φαρνεσόλη.

Η πλειοψηφία των πολυφαινολών εντοπίζεται στο φύλλο του μίσχου του άνθους, με την εξαίρεση των πρενυλ-φλαβονοειδών τα οποία εκκρίνονται από τους λουπουλινικούς αδένες μαζί με τα πικρά οξέα και τα αιθέρια έλαια. Τα φαινολικά συστατικά του λυκίσκου αποτελούν το 3-6% του ξηρού βάρους των κώνων και διαχωρίζονται σε 4 υποομάδες: φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες, φαινολικά καρβοξυλικά

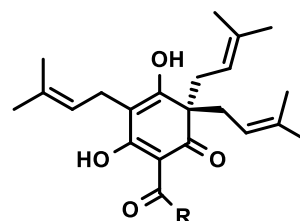
οξέα (παράγωγα του βενζοϊκού και κιναμωμικού οξέος) και άλλες φαινολικές ενώσεις (πρενυλιωμένα φλαβονοειδή, σπιλβενοειδή κλπ).

Οι κίτρινοι λουπουλινικοί αδένες εκκρίνουν τις ρητίνες (πικρά οξέα), με ευρύ φάσμα επιδράσεων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Είναι αποτελεσματικά κατά φλεγμονωδών και μεταβολικών διαταραχών, γεγονός που τα καθιστά υποψήφια για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη, των καρδιαγγειακών παθήσεων και του μεταβολικού συνδρόμου. Επιπλέον, έχουν πιθανή αντικαρκινική δράση παρεμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αγγειογένεση, προκαλώντας απόπτωση και αυξάνοντας την έκφραση των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Τα πικρά οξέα του λυκίσκου είναι πρενυλιωμένα παράγωγα της φλωρογλυκινόλης και ταξινομούνται ως α- και β-οξέα (Van Cleemput et al., 2009). Τα α-πικρά οξέα, είναι το πιο σημαντικό κλάσμα των ρητινών λυκίσκου. Εκκρίνονται με τη μορφή κίτρινης σκόνης και αποτελούν μίγμα ουσιών, αναλόγων της χουμουλόνης, τα οποία βρίσκονται σε όλες τις ποικιλίες λυκίσκου. Τα κύρια α-οξέα είναι η χουμουλόνη σε ποσοστό 35-70%, η κοχουμουλόνη (2) σε ποσοστό 20-55% και η αντχουμουλόνη σε ποσοστό 10-15% των ολικών α-οξέων. Η ποστχουμουλόνη, η πρεχουμουλόνη και η αντπρεχουμουλόνη είναι α-οξέα που βρίσκονται σε μικρές ποσότητες (Εικόνα 1.17.).



κοχουμουλόνη (2)	R: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
χουμουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
πρεχουμουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
ποστχουμουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}_3$
αντχουμουλόνη	R: $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
αντπρεχουμουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

**α-πικρά οξέα**



κολουπουλόνη (3)	R: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
λουπουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
πρελουπουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
ποστλουπουλόνη	R: $-\text{CH}_2\text{CH}_3$
αντλουπουλόνη	R: $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

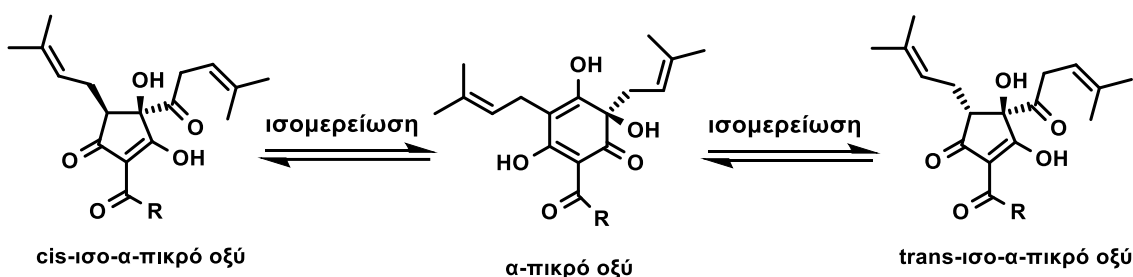
**β-πικρά οξέα**

**Εικόνα 1.17.** Χημικές δομές των βασικότερων αναλόγων των α- και β- πικρών οξέων.

Τα β-πικρά οξέα αποτελούνται από τα ανάλογα λουπουλόνη σε ποσοστό 30-55%, κολουπουλόνη (3) σε ποσοστό 20-55%, αντλουπουλόνη σε ποσοστό 5-10% των ολικών β-οξέων. Η πρελουπουλόνη και ποστλουπουλόνη βρίσκονται σε μικρές ποσότητες. Ως ενώσεις μη διαλυτές στο νερό έχουν μικρή σημασία στη ζυθοποίηση. Ωστόσο, λόγω των βιολογικών δράσεων τους, μελετώνται εκτενώς για πιθανές

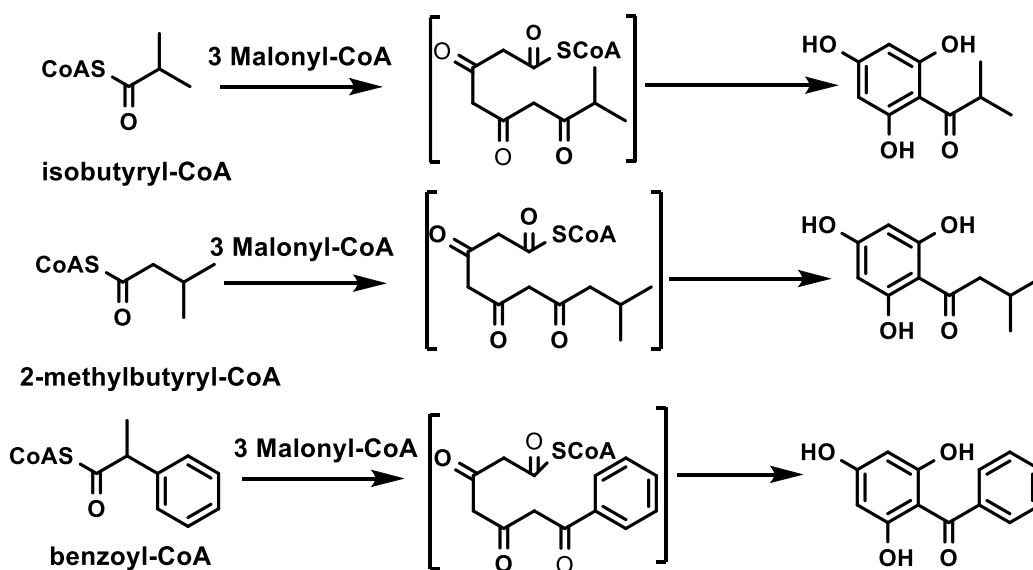
βιοϊατρικές εφαρμογές. Σε εμπορικό επίπεδο, τα α- και β-οξέα στο σύνολό τους (Εικόνα 1.17.), επιδρούν καθοριστικά στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου (πικράδα, άρωμα, γεύση, υφή αφρού) (Karabin et al., 2016).

Η πιο σημαντική αντίδραση των α-οξέων είναι η ισομερείωσή τους στα αντίστοιχα ισο-α-πικρά οξέα (Σχήμα 1.1.), η οποία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες 100 με 130 °C και pH 8 με 10. Κατά τη ζυθοποίηση, η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά το βρασμό του λυκίσκου στους 100°C, με ταυτόχρονη εφαρμογή ατμοσφαιρικής πίεσης για 90 λεπτά και τα πικρά α-οξέα ισομεριώνονται προς τα ισο-α-πικρά οξέα. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν πως σε αυτό το στάδιο η μετατροπή στα ισο-α-πικρά οξέα γίνεται μόλις κατά 50% (Karabin et al., 2016).



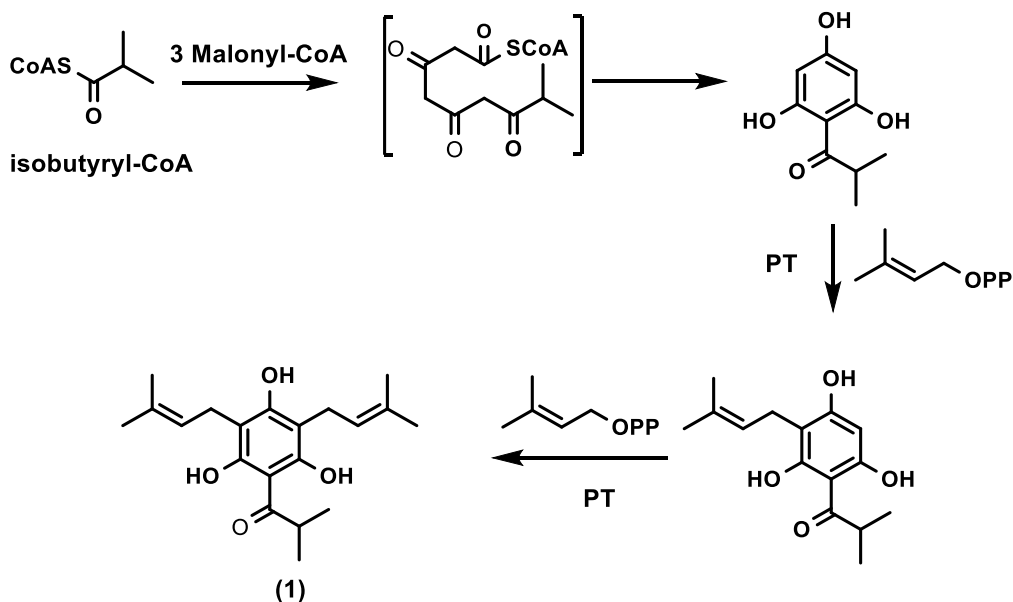
**Σχήμα 1.1.** Ισομερείωση των α-πικρών οξέων.

Μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η βιοσύνθεση των ακυλοφλωρογλυκινολών περιλαμβάνει τη συμπύκνωση ενός μορίου ακυλο-συνενζύμου A και τριών μορίων μαλονυλο-συνενζύμου (Goese et al., 1999). Το τετρακετίδιο που σχηματίζεται υπόκειται σε κυκλοποίηση προς το τελικό προϊόν (Σχήμα 1.2.).



**Σχήμα 1.2.** Βιοσύνθεση ακυλοφλωρογλυκινολών.

Τη σύνθεση της ακυλοφλωρογλυκινόλης ακολουθεί η υποκατάσταση του δακτυλίου με πρενυλικές ή γερανυλικές αλυσίδες (Zuurbier et al., 1998; Boubakir et al., 2005). Η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω της καταλυόμενης από ένζυμα προσθήκης πρενυλο- ή γερανυλο-πυροφωσφορικών εστέρων στην ακυλοφλωρογλυκινόλη.



**Σχήμα 1.3.** Βιοσύνθεση της δεοξυκοχομουλόνης (1).

Σημειώνεται πως οι ΜΠΑ κυκλοποιούνται και σχηματίζουν τις Πολυκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλωρογλυκινόλες, ΠΠΑ. Βιοσυνθετικά λοιπόν, οι ΠΠΑ προέρχονται από τις ΜΠΑ με τη δεοξυκοχομουλόνη (1) (Σχήμα 1.3.) να είναι κοινό βιοσυνθετικό ενδιάμεσο. Ανάλογα με το είδος του συνενζύμου που επικρατεί σε κάθε φυτό, απομονώνονται διαφορετικές ΠΠΑ ή ποσοστά τους. Αποτελούν μια τάξη ενώσεων μοναδικής δομικής αρχιτεκτονικής και ενδιαφέρουσας βιολογικής δράσης και απομονώνονται κυρίως από φυτά της Οικογένειας *Clusiaceae*. Η υπερφορίνη είναι από τους πιο σημαντικούς εκπροσώπους λόγω της βιολογικής της δράσης.

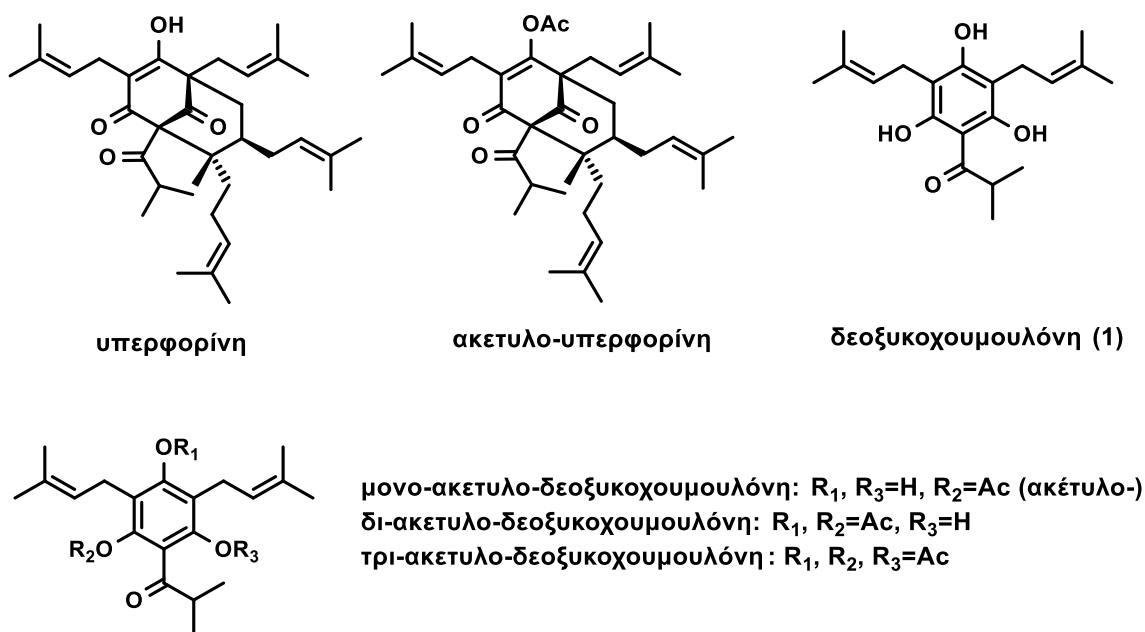


## **B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

## Β.1. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Ερευνητικής Εργασίας ήταν η σύνθεση οργανικών μορίων με προνυμφοκτόνο δράση έναντι του είδους κουνουπιού *Culex ripiens* L., που όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο Α.2.3., αποτελεί διαβιστή ιών και παρασίτων και είναι είδος υψίστης υγειονομικής σημασίας. Τα οργανικά μόρια, που σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και διερευνήθηκε η τοξικότητά τους σε προνύμφες του είδους *Culex ripiens*, είναι είτε φυσικά προϊόντα είτε ανάλογά τους, παράγωγα των ακυλοφλωρογλυκινολών.

Η ιδέα για το αντικείμενο της εργασίας αυτής βασίστηκε στα θετικά αποτελέσματα αξιολόγησης της προνυμφοκτόνου δράσης της υπερφορίνης, της δεοξυκοχουμουλόνης (1), η οποία είναι πρόδρομη ένωση της υπερφορίνης, και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους (Εικόνα 2.1.), σε προνύμφες του είδους *Culex ripiens*, 3<sup>ης</sup>-4<sup>ης</sup> ηλικίας, βιότυπου *molestus*. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά στο Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας του ΙΝΝ του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας, του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (Mitsoroulou et al., 2014).



**Εικόνα 2.1.** Χημικές δομές των ενώσεων οι οποίες δοκιμάστηκαν από τους Mitsoroulou et al., 2014.

Η σύγκριση των τιμών των δεικτών  $LC_{50}$  και  $LC_{90}$ , έδειξε ότι υπερφορίνη, και η δεοξυκοχομουλόνη (1) είναι οι πιο τοξικές από όλες τις ενώσεις των οποίων διευρενήθηκε η τοξικότητα, με τιμές  $LC_{50}$  26.72 mg/L και  $LC_{90}$  53.16 mg/L για την υπερφορίνη και  $LC_{50}$  51.03 mg/L και  $LC_{90}$  118.34 mg/L για τη δεοξυκοχομουλόνη (1). Μεταξύ των ακετυλιωμένων παραγώγων μόνο η μονο-ακετυλο-δεοξυκοχομουλόνη εμφάνισε σχετική δραστικότητα, με τιμή  $LC_{50}$  135.92 mg/L και  $LC_{90}$  245.01 mg/L.

Η τοξικότητα της δεοξυκοχομουλόνης (1) σε προνύμφες, οδήγησε στον σχεδιασμό νέων μορίων των οποίων οι δομές θα βασίζονταν σε αυτήν, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η αξιολόγησή τους και να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη δραστικότητα. Έτσι λοιπόν, το αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση και η ταυτοποίηση με φασματοσκοπικές μεθόδους (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός, NMR) γνωστών και νέων παραγώγων ακυλοφλωρογλυκινολών, καθώς και η διερεύνηση της τοξικότητάς τους σε προνύμφες του είδους κουνουπιού *Culex pipiens*, με σκοπό τη σύγκριση της δραστικότητας με τη δεοξυκοχομουλόνη (1) και τη βελτίωση της δράσης της.

## **B.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥΣ**

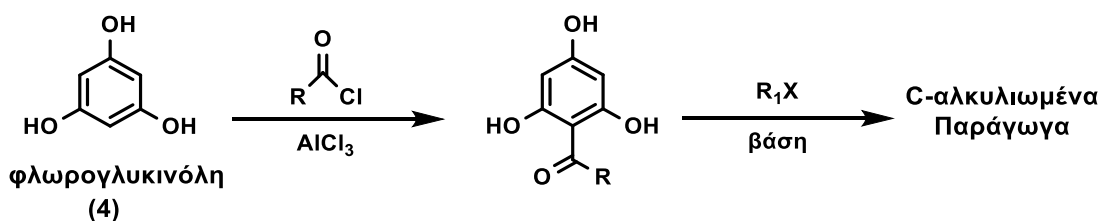
Τα μόρια που σχεδιάστηκαν, βασίστηκαν στη σύνθεση ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών και στην παραγοντοποίησή τους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.1. η δεοξυκοχομουλόνη (1) είναι μια ΜΠΑ και συγκεκριμένα μια διπρενυλιωμένη ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη.

- Πρωταρχικός στόχος ήταν η σύνθεση ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών με την εισαγωγή ακυλο-υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο της φλωρογλυκινόλης, όπως ισοβουτυρυλ-, κυκλοπροπανοϋλ- (c-προπανοϋλ-), βενζοϋλ-, ακετυλ-, πιβαλοϋλ- ομάδες.
- Η σύνθεση της δεοξυκοχομουλόνης (1), που προκύπτει από την C-πρενυλίωση της 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (Εικόνα 2.3.) αποσκοπούσε στην επαναδιερεύνηση της τοξικότητάς της.
- Η εισαγωγή υδρόφοβων ομάδων στο μόριο (1), όπως μεθυλομάδες, είχε ως στόχο τον έλεγχο της προνυμφοκτόνου δράσης του λιγότερου πολικού αυτού μορίου και την επιβεβαίωση της παρατήρησης προηγούμενων εργασιών, στις οποίες η ύπαρξη ελεύθερων υδροξυλομάδων οδηγούσε στην αύξηση της προνυμφοκτόνου δράσης εναντίον των προνυμφών του είδους *Culex pipiens*. Πιο συγκεκριμένα, η ακετυλίωση της δεοξυκοχομουλόνης (1) και της υπερφορίνης (Εικόνα 2.1.)

(Mitsoroulou et al., 2014), η ακετυλίωση των φυσικών προϊόντων αλκαννίνη, σικονίνη (Michaelakis et al., 2009b), καθώς και η κουρκουμίνη σε σχέση με το απομεθυλιωμένο παράγωγό της (Εικόνα 1.14.) (Sagnou et al., 2012), είχαν μειωμένη προνυμφοκτόνο δράση λόγω απουσίας του ελεύθερου υδροξυλίου.

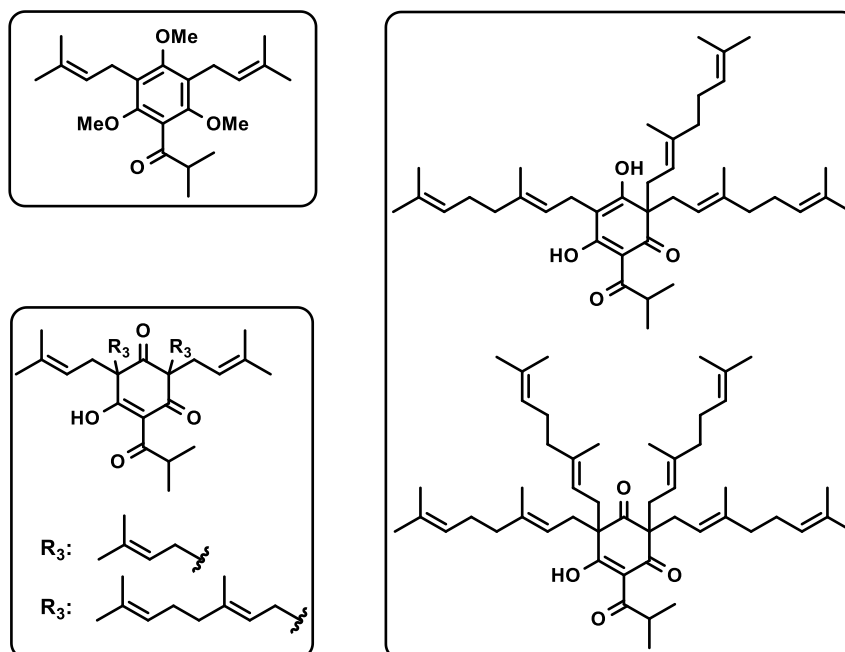
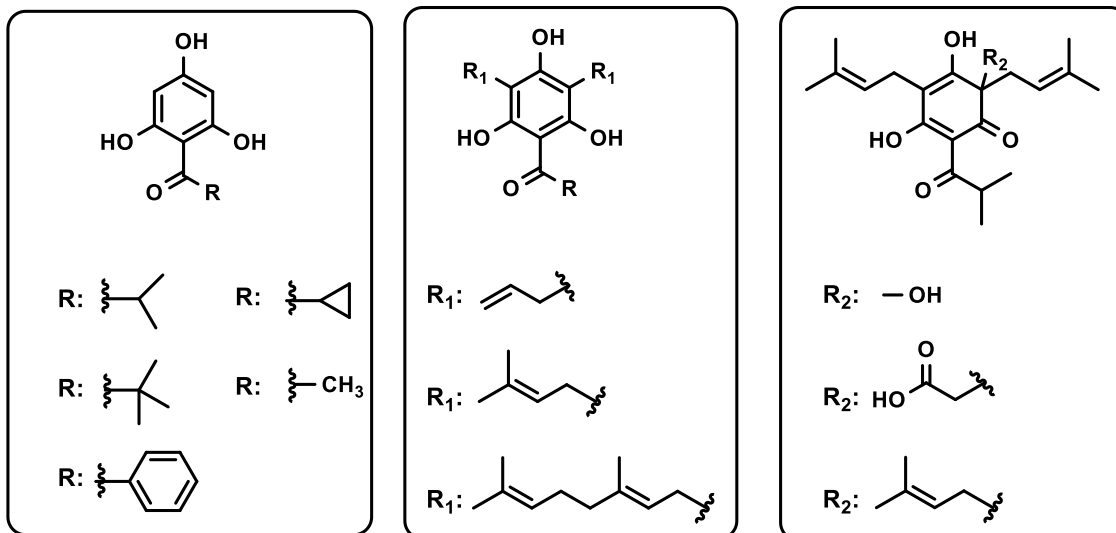
- Στόχος της εργασίας ήταν επίσης, η περαιτέρω παραγοντοποίηση της δεοξυκοχομουλόνης (1) προς την αύξηση της πολικότητας του μορίου, όπως η οξείδωση του μορίου (1) προς σχηματισμό του φυσικού προϊόντος κοχομουλόνη (2) (Εικόνα 2.3.) και η προσθήκη άλλων ομάδων όπως η καρβοξυμεθυλομάδα (-CH<sub>2</sub>COOH) στο δακτύλιο.
- Παράλληλα, σχεδιάστηκαν παράγωγα της δεοξυκοχομουλόνης (1), τα οποία προκύπτουν από την παραγοντοποίηση της με πρενυλο- ή γερανυλο- αλυσίδες για τον έλεγχο της προνυμφοκτόνου δράσης και τον έλεγχο της σχέσης της δομής με τη δραστηριότητα.
- Σχεδιάστηκαν δι-αλκυλιωμένα παράγωγα ακυλοφλωρογλυκινολών με αλλυλο-, πρενυλο- και γερανυλο- αλυσίδες για τη σύγκριση της δομής τους και της δράσης τους σε σχέση με τη δεοξυκοχομουλόνη (1).
- Τέλος, στόχος της εργασίας ήταν η παραγοντοποίηση της διγερανυλιωμένης ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) με γερανυλικές αλυσίδες και η σύγκριση της δράσης των παραγώγων αυτών με τα αντίστοιχα τρι- και τετρα- πρενυλιωμένα παράγωγα, κολουπουλόνη (3) και κολουπόνη (14).

Για τη σύνθεση των C-αλκυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών, η αντίδραση ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4) πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης Friedel Crafts. Έπειτα η δημιουργία δεσμού C-C, πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού ενολικού ανιόντος υπό την παρουσία βάσης και την μετέπειτα C-αλκυλίωση των ακυλοφλωρογλυκινολών προς σχηματισμό των C-αλκυλιωμένων παραγώγων.

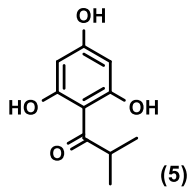


**Σχήμα 2.1.** Γενικό σχήμα αντιδράσεων σύνθεσης C-αλκυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών.

Παρακάτω δίνονται οι γενικές δομές των μορίων που σχεδιάστηκαν (Εικόνα 2.2.) καθώς και οι χημικές δομές των μορίων-στόχων (Εικόνα 2.3.) προς σύνθεση και διερεύνηση της τοξικότητάς τους έναντι των προνυμφών των κουνουπιών του είδους *Culex pipiens* L.

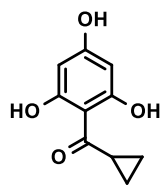


**Εικόνα 2.2.** Γενικές δομές μορίων-στόχων.



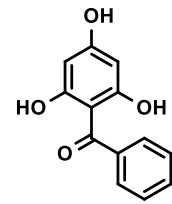
(5)

2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη



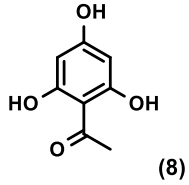
(6)

2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη



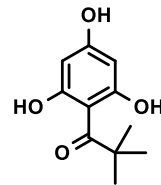
(7)

2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη



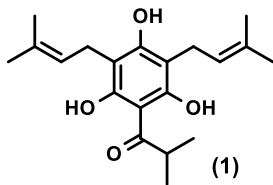
(8)

2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη



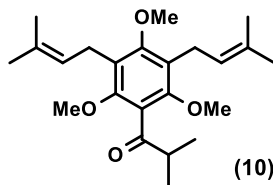
(9)

2-πιβαλοϋλο-φλωρογλυκινόλη



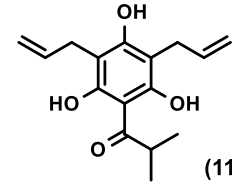
(1)

δεοξυκοχουμουλόνη



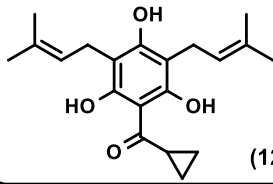
(10)

τριμεθυλο-δεοξυκοχουμουλόνη



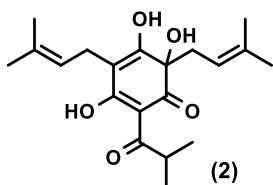
(11)

4,6-δι-αλλυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη



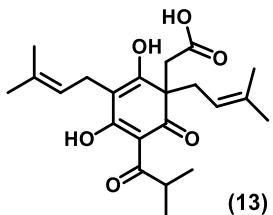
(12)

4,6-δι-πρενυλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη



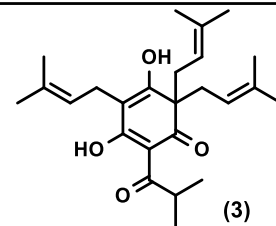
(2)

κοχουμουλόνη



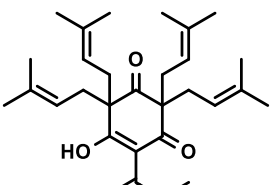
(13)

C-καρβοξυμεθυλιωμένο παράγωγο της δεοξυκοχουμουλόνης



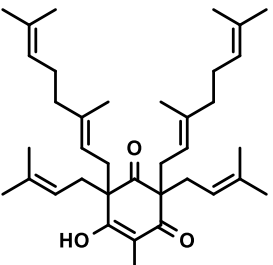
(3)

κολουπουλόνη



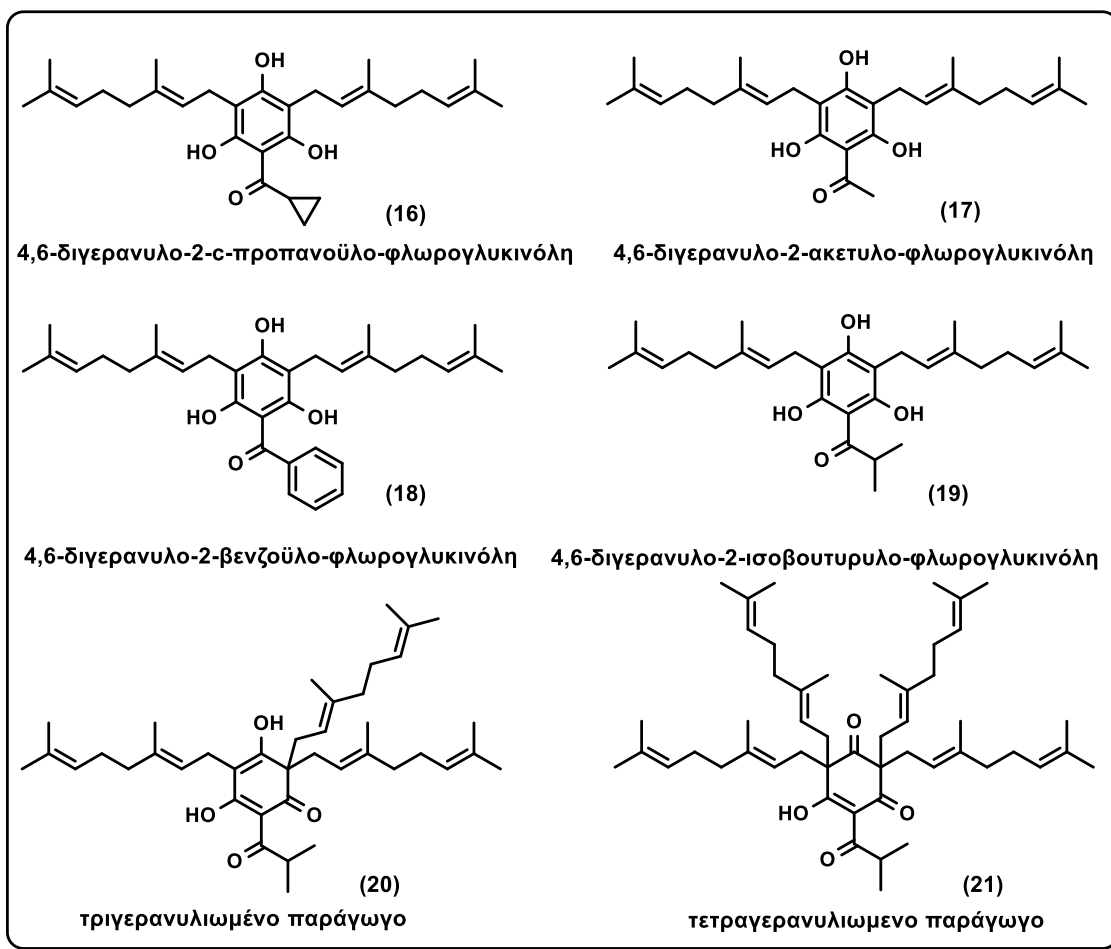
(14)

κολουπόνη



(15)

ανάλογο της κολουπόνης



Εικόνα 2.3. Μόρια-στόχοι.

### Β.3. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΟΝΥΜΦΟΚΤΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ

Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες κουνουπιών του είδους *Culex ripiens* βióτυπου *molestus*, προερχόμενες από την εργαστηριακή αποικία του είδους που εκτρέφεται στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο. Ο βióτυπος *molestus*, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο Α.2.1., είναι στενόγαμος, ομοδυναμικός, αυτογενής, προτιμάει να τρέφεται από θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, και προτιμά υπόγεια σημεία για την ωοθεσία και την αναπαραγωγή. Σε βιοδοκιμές νέων ενώσεων ενδείκνυται η χρήση εντόμων από εργαστηριακές εκτροφές, καθώς έτσι μπορεί να εξασφαλιστεί μεγάλος αριθμός εντόμων, ίδιας ηλικίας και ομοιόμορφης καλής κατάστασης. Η συγκεκριμένη αποικία κουνουπιών διατηρείται στο Μ.Φ.Ι. εδώ και 40 χρόνια και δεν έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα, επομένως ο πληθυσμός θεωρείται ευαίσθητος στις διάφορες χημικές ομάδες βιοκτόνων.

### B.3.1. 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  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , φωτοπερίοδο με 14 ώρες φως και 10 ώρες σκοτάδι και σχετική υγρασία 80%. Για την πραγματοποίηση της εργαστηριακής εκτροφής τα ωά των κουνουπιών του είδους *Culex pipiens* τοποθετούνταν σε εμαγιέ λεκάνες διαμέτρου 28 cm ανοικτού χρώματος (Εικόνα 2.4.) με λίγη τροφή για να εκκολαφθούν οι νέες προνύμφες, με την επώαση των ωών να διαρκεί 2-3 ημέρες. Στη συνέχεια οι προνύμφες τρέφονταν με αποξηραμένο ψωμί και ζύμη ώστε να εξασφαλιστούν οι απαραίτητες ποσότητες σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και μέταλλα (Bentley and Day, 1989). Η χορήγηση τροφής στις προνύμφες γινόταν κάθε μέρα. Ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση του προνυμφικού σταδίου κυμάνθηκε από 7-10 μέρες, ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας και τη διαθεσιμότητα τροφής. Μετά την ολοκλήρωση του προνυμφικού σταδίου, όπου οι προνύμφες μεταμορφώνονταν σε νύμφες, οι νύμφες συλλέγονταν με ειδικούς συλλέκτες από τις λεκάνες εκτροφής σε πλαστικά κύπελλα διαμέτρου 8 cm και τοποθετούνταν στους κλωβούς για το τελικό στάδιο της μεταμόρφωσής τους σε τέλεια έντομα. Η συχνότητα συλλογής νυμφών ήταν κάθε δύο ημέρες. Το νυμφικό στάδιο διαρκούσε περίπου 3-4 μέρες. Τα ακμαία τρέφονταν με διάλυμα νερού και ζάχαρης, το οποίο τοποθετούνταν μέσα στον κάθε κλωβό σε ένα μικρό γυάλινο δοχείο μαζί με μια κατασκευή σαν φιλίλι από διηθητικό χαρτί και βαμβάκι, για την ευκολότερη λήψη του διαλύματος από τα έντομα (Εικόνα 2.5.). Δύο τέτοια διαλύματα ήταν τοποθετημένα στον κλωβό και γινόταν αντικατάστασή τους από καινούρια κάθε τέσσερις μέρες.



Εικόνα 2.4. Εκτροφή προνυμφών.





**Εικόνα 2.5.** Κλωβός εκτροφής. Γυάλινο δοχείο με διάλυμα νερού και ζάχαρης για τη τροφή των ακμαίων.

### **B.3.2. Υλικά Πειράματος Προνυμφοκτονίας**

Για την εκτέλεση της βιοδοκιμής χρησιμοποιήθηκαν:

- Πλαστικά δοχεία (ποτήρια) χωρητικότητας 200 mL
- Ένας ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL
- Μηχανικές πιπέτες για τη μέτρηση και τοποθέτηση των ουσιών μέσα στα δοχεία
- Απεσταγμένο νερό με θερμοκρασία κατά τη βιοδοκιμή  $25 \pm 2$  °C
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Αιθανόλη 100% (EtOH)
- Γαλακτοματωποιητής TWEEN 20
- Προνύμφες κουνουπιών 3<sup>ης</sup>-4<sup>ης</sup> ηλικίας, οι οποίες τοποθετούνταν στα δοχεία
- Χώρος με συνθήκες κατάλληλες για την εκτέλεση της βιοδοκιμής (θερμοκρασία  $25 \pm 2$  °C, φωτοπερίοδος 14 ωρών φως και 10 ωρών σκοτάδι και σχετική υγρασία  $80\% \pm 1$ )



**Εικόνα 2.6.** Υλικά διεξαγωγής βιοδοκιμών προνυμφοκτονίας.

### B.3.3. 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 στα διάφορα εντομοκτόνα, με μικρές τροποποιήσεις (WHO, 2005). Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι βιοδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε πλαστικά δοχεία χωρητικότητας 200 mL, εντός των οποίων η ποσότητα του υδατικού διαλύματος με την αντίστοιχη δόση της υπό εξέταση ένωσης (διαλυμένες σε DMSO) ήταν 100 mL (Εικόνα 2.7.). Από την κάθε ένωση παρασκευαζόταν ένα μητρικό διάλυμα (stock solution) σε οργανικό διαλύτη (DMSO) περιεκτικότητας 10% β/ο (w/v) εντός γυάλινου φιαλιδίου (vial). Εντός των δοχείων βιοδοκιμών τοποθετούνταν 20 προνύμφες του *Culex pipiens* από την εργαστηριακή εκτροφή, ανεπτυγμένες 3<sup>ης</sup> ή νεαρές 4<sup>ης</sup> ηλικίας, σε υδατικό διάλυμα 100 mL με περιεκτικότητα σε DMSO 2% ο/ο (v/v) (98 mL νερό + 2 mL DMSO). Η προσθήκη του DMSO στο νερό σε περιεκτικότητα 2% ο/ο συντελούσε στην ομοιόμορφη κατανομή του οργανικού συστατικού σε υδατικό περιβάλλον. Μετά την τοποθέτηση των 20 προνυμφών στο υδατικό διάλυμα με DMSO, ακολουθούσε η προσθήκη των επιθυμητών δόσεων από το μητρικό διάλυμα των ουσιών. Η προσθήκη της ποσότητας της ουσίας που απαιτούνταν για τη δημιουργία της εκάστοτε επιθυμητής δόσης γινόταν στην επιφάνεια του νερού με τη χρήση πιπέτας και ακολουθούσε ανάδευση για 30" με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου με στόχο την ομογενοποίηση του τελικού διαλύματος.

Οι ενώσεις κολουπόνη (14) και το ανάλογό της (15) (Εικόνα 2.3.) που δεν είχαν καλή διαλυτότητα στο DMSO διαλύθηκαν σε EtOH. Τα βασικά στοιχεία της μεθόδου ήταν τα εξής: 20 προνύμφες κουνουπιών 3<sup>ης</sup>-4<sup>ης</sup> ηλικίας εμβαπτίστηκαν σε 2% v/v υδατικό διάλυμα TWEEN 20 (98 mL νερό και 2 mL Tween). Εν συνεχεία, προστέθηκε στο κάθε δοχείο συγκεκριμένη συγκέντρωση (δόση) από τα μητρικά διαλύματα (10% stock solution) των ενώσεων με EtOH.



**Εικόνα 2.7.** Βιοδοκιμή τοξικής δράσης οργανικών ενώσεων εναντίων προνυμφών του είδους *Culex pipiens*.

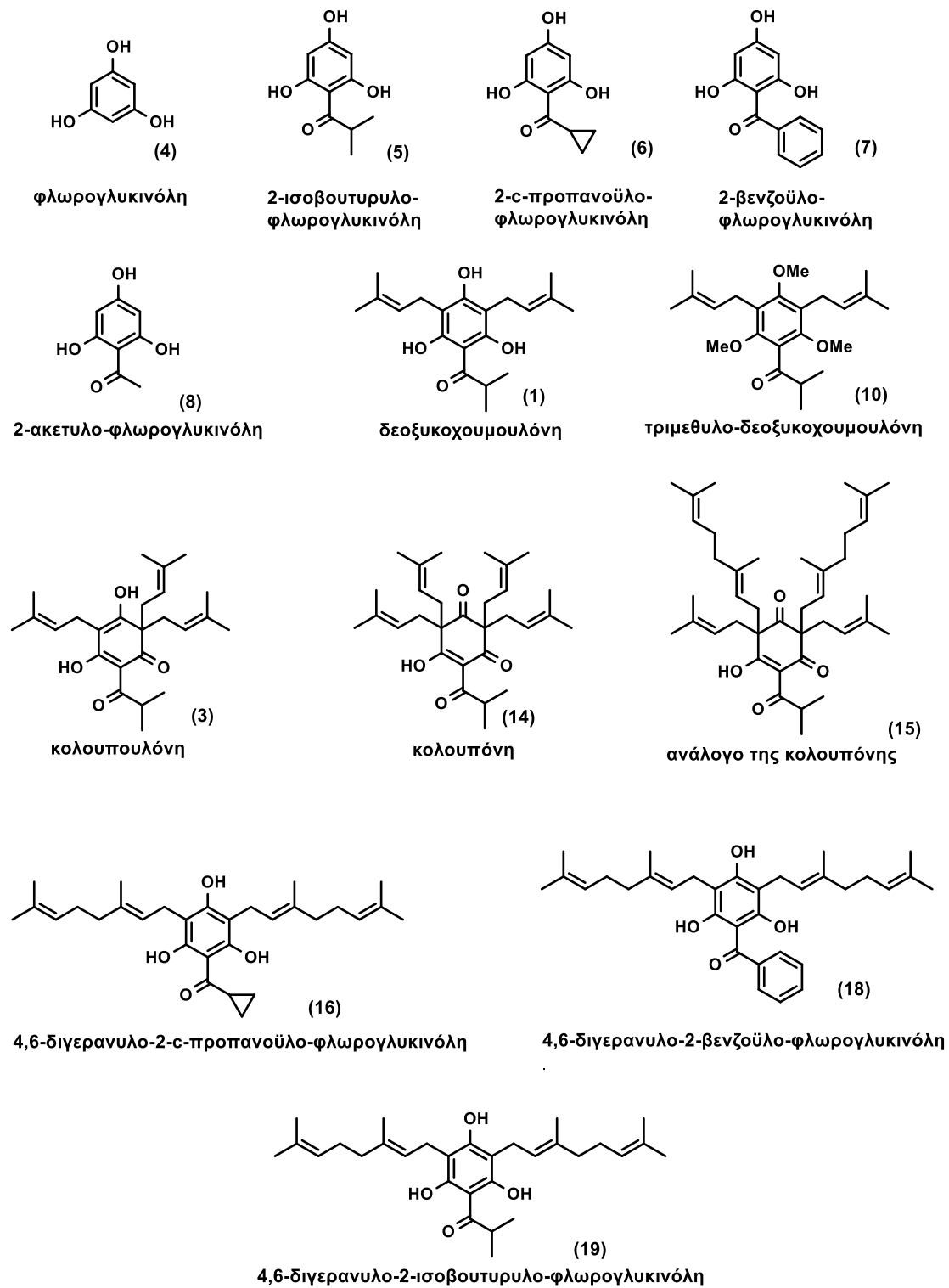
Με τις βιοδοκιμές μελετήθηκε η μεταβολή της θνησιμότητας σε συνάρτηση με τη μεταβολή της δόσης και εφαρμόστηκε σειρά δόσεων, οι οποίες έδωσαν θνησιμότητες πάνω από 0% και κάτω από 100%. Κάθε συγκέντρωση δοκιμάστηκε τέσσερις φορές (4 επαναλήψεις) και σε κάθε βιοδοκιμή υπήρχε παράλληλα και επέμβαση μάρτυρα (control) μόνο με 98 mL νερό + 2 mL DMSO, είτε 98 mL νερό + 2 mL Tween για τις ενώσεις κολουπόνη (14) και του αναλόγου της (15).

Η καταγραφή της θνησιμότητας έγινε 24 h μετά την έναρξη της βιοδοκιμής και κατά το διάστημα αυτό δεν χορηγήθηκε τροφή στις προνύμφες. Σύμφωνα με τη μέθοδο WHO, 2005, που ακολουθήθηκε, ως νεκρές προνύμφες υπολογίζονταν και αυτές που έχουν έντονη απόκλιση από τη φυσιολογική συμπεριφορά, όπως σπασμούς ή αδυναμία απομάκρυνσης όταν ενοχληθούν στην άκρη του σιφωνίου τους με τη μύτη μιας βελόνας, οι προνύμφες που αδυνατούσαν να κολυμπήσουν ως την επιφάνεια για να αναπνεύσουν και οι προνύμφες που δεν παρουσίαζαν τη χαρακτηριστική αντίδραση βύθισής τους στο νερό όταν εκείνο διαταρασσόταν.

Στη μελέτη διερευνήθηκε η τοξικότητα σε προνύμφες του είδους *Culex pipiens* των ενώσεων φλωρογλυκινόλη (4), 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (5), 2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6), 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (7), 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8), δεοξυκοχουμουλόνη (1), τριμεθυλο-δεοξυκοχουμουλόνη (10), κολουπουλόνη (3), κολουπόνη (14), ανάλογο της κολουπόνης (15), 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (16), 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (18), 4,6-διγερανυλο-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19) (Εικόνα 2.9.).



**Εικόνα 2.8.** Νεκρές προνύμφες του *Culex pipiens* μετά από 24 ώρες έκθεσης σε δόση 50 mg/L κολουπουλόνης (3).

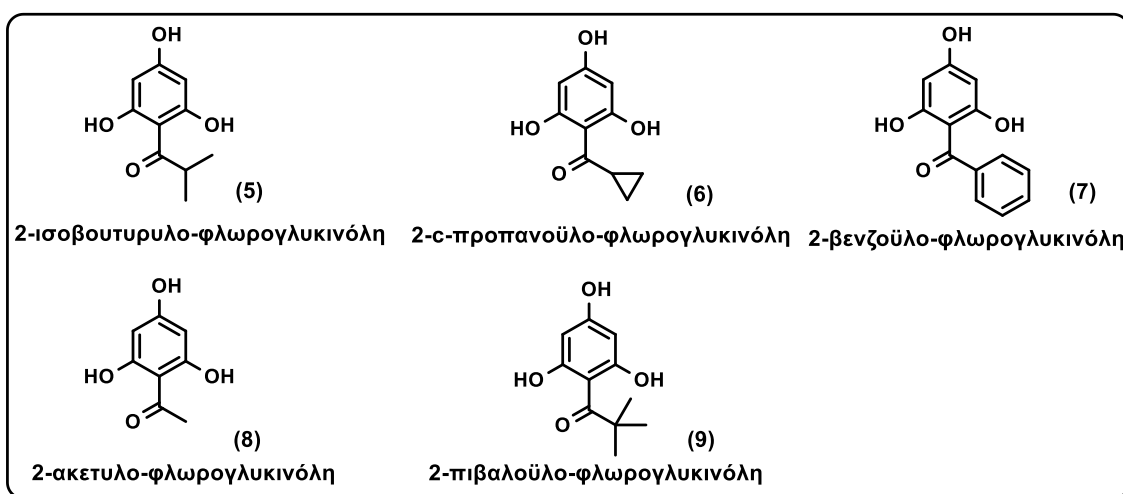


**Εικόνα 2.9.** Χημικές δομές ενώσεων των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα.

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## Γ.1. ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΚΥΛΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΗΣ (4)

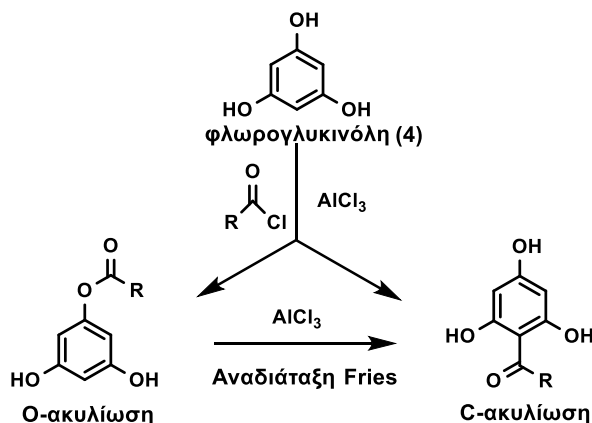
Επιλογή διαφορετικών ακυλοχλωριδίων μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση διαφορετικών ακυλοφλωρογλυκινολών και κατ' επέκταση σε άλλα μέλη της οικογένειας των ΠΠΑ, παρέχοντας ευελιξία στην επιλογή των συνθετικών στόχων. Τα ακυλωμένα μόρια-στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν η 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (5), η 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6), η 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (7), η 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8) και η 2-πιβαλοϋλο-φλωρογλυκινόλη (9) (Εικόνα 3.1.).



Εικόνα 3.1. Μόρια-στόχοι, παράγωγα φλωρογλυκινόλης (4).

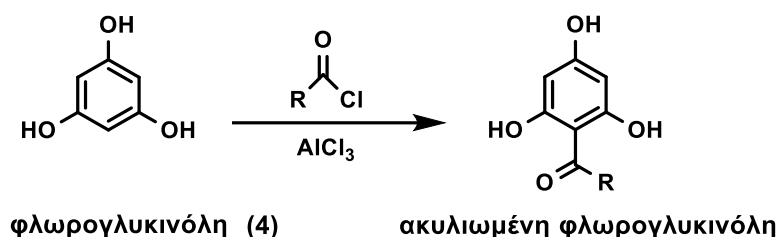
### Γ.1.1. Αντιδράσεις ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4)

Η φλωρογλυκινόλη (4), όπως και η φαινόλη είναι πυρηνόφιλα που μπορούν να αντιδράσουν σε δύο θέσεις, σε άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου (C-ακυλίωση) και στο οξυγόνο της υδροξυλομάδας που είναι υποκατεστημένη στον βενζολικό δακτύλιο (O-ακυλίωση). Παρουσία περίσσειας  $\text{AlCl}_3$ , ο εστέρας που σχηματίζεται μπορεί να αναδιαταχθεί προς το αντίστοιχο C-ακυλιωμένο παράγωγο (Σχήμα 3.1.).



Σχήμα 3.1. Γενικό σχήμα ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4).

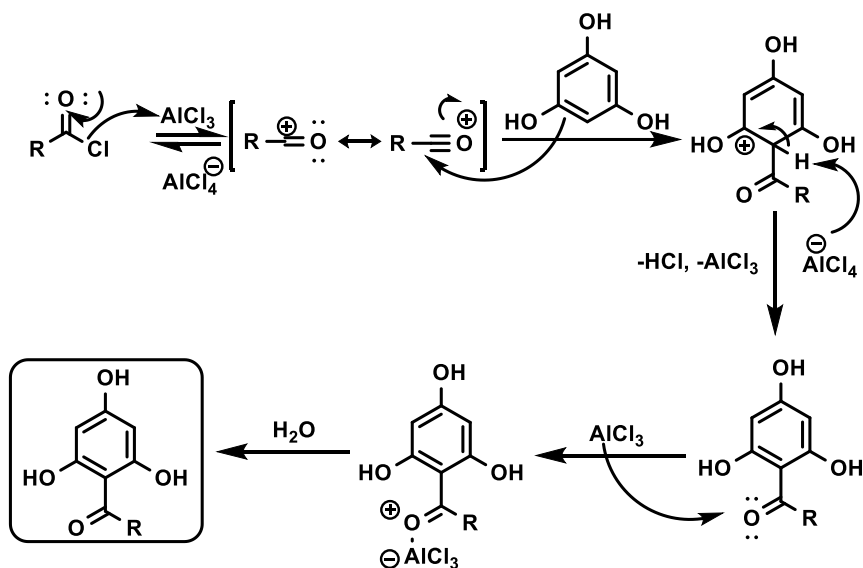
Με τη C-ακυλίωση, η οποία πραγματοποιείται μέσω ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, σχηματίζονται οι αρυλοκετόνες, προϊόντα σταθερά, που κυριαρχούν σε συνθήκες θερμοδυναμικού ελέγχου. Η σύνθεση των ακυλιωμένων παραγώγων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της αντίδρασης Friedel Crafts.



**Σχήμα 3.2.** C-ακυλίωση της φλωρογλυκινόλης (4).

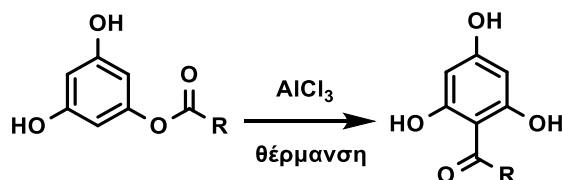
Η ακυλίωση Friedel Crafts είναι μία περίπτωση αρωματικής ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης, η οποία πραγματοποιείται με την επίδραση ενός ακυλοχλωριδίου παρουσία ενός οξέος κατά Lewis ως καταλύτη (π.χ. χλωριούχο αργίλιο,  $AlCl_3$ ). Οδηγεί στο σχηματισμό του δραστικού ακυλοκατιόντος ( $RCO^+$ ), το οποίο στη συνέχεια προσβάλλεται από την αρωματική ένωση και με απόσπαση πρωτονίου τελικά σχηματίζεται το ακυλιωμένο παράγωγό της, ένα σταθερό προϊόν υποκατάστασης και επανακτάται ο αρωματικός χαρακτήρας (Σχήμα 3.3.) (McMurry, 1995).

Το μόριο της φλωρογλυκινόλης (4) (Σχήμα 3.2.) φέρει τρεις υδροξυλομάδες ως υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο, οι οποίοι είναι ενεργοποιητές όρθο- και πάρα- κατεύθυνσης. Αυξανόμενης λοιπόν της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ο δακτύλιος καθίσταται αρκετά δραστικός και μπορεί να επιτευχθεί ακυλίωση κατά Friedel Crafts. Σε αντίθεση με άλλους αρωματικούς δακτυλίους με υποκαταστάτες ενεργοποιητές όρθο- και παρα- κατεύθυνσης, όπως στην περίπτωση της ανιλίνης ( $PhNH_2$ ), η υδροξυλομάδα της φαινόλης και κατ' επέκταση της φλωρογλυκινόλης, δεν αντιδρά με το  $AlCl_3$ , δε σχηματίζεται σύμπλοκο συναρμογής και επομένως ο δακτύλιος δεν απενεργοποιείται. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η υδροξυλομάδα είναι μία ασθενέστερη βάση, σε αντίθεση με την αμινομάδα στην περίπτωση της ανιλίνης, καθιστώντας το μόριο ικανό για αντίδραση Friedel Crafts (Burrows et al., 2013). Ωστόσο, στη βιβλιογραφία, υπάρχουν αναφορές σχετικά με τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του οξέος κατά Lewis και της υδροξυλομάδας της φαινόλης (Rappoport, 2003).



**Σχήμα 3.3.** Προτεινόμενος μηχανισμός C-ακυλίωσης της φλωρογλυκινόλης (4) μέσω της αντίδρασης Friedel Crafts.

Με την Ο-ακυλίωση, η οποία πραγματοποιείται μέσω εστεροποίησης σχηματίζονται εστέρες, προϊόντα που σχηματίζονται ταχύτερα και κυριαρχούν σε συνθήκες κινητικού ελέγχου. Παρ' όλα αυτά, όταν ο καταλύτης ( $\text{AlCl}_3$ ) βρίσκεται σε περίσσεια, τα προϊόντα της Ο-ακυλίωσης αναδιατάσσονται προς σχηματισμό των αντίστοιχων C-ακυλιωμένων παραγώγων (Fries rearrangement) (Σχήμα 3.4.) (Smith and March, 2007).



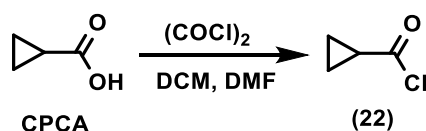
**Σχήμα 3.4.** Αναδιάταξη Fries.

Τα σύμπλοκα διασπώνται μόνο μετά την υδατική κατεργασία του μίγματος της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις Friedel-Crafts (αλκυλίωσεις ή ακυλίωσεις) δεν δίνουν προϊόντα όταν ο βενζολικός δακτύλιος εμπεριέχει υποκαταστάτες που είναι ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων. Γι' αυτό το λόγο το νιτροβενζόλιο ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ ) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης σε μία τέτοιου είδους αντίδραση, καθώς η νιτροομάδα απενεργοποιεί το δακτύλιο, εμποδίζοντάς τον να υποστεί ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση και να αντιδράσει με το ακυλοκατιόν (Smith and March, 2007). Παράλληλα, έχει υψηλό σημείο ζέσεως (Σ.Ζ. 210.9 °C) επιτρέποντας την υψηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων, υψηλή διηλεκτρική σταθερά και τάση να συμπλοκοποιείται με το  $\text{AlCl}_3$  (Perlovskaya et al., 2001).

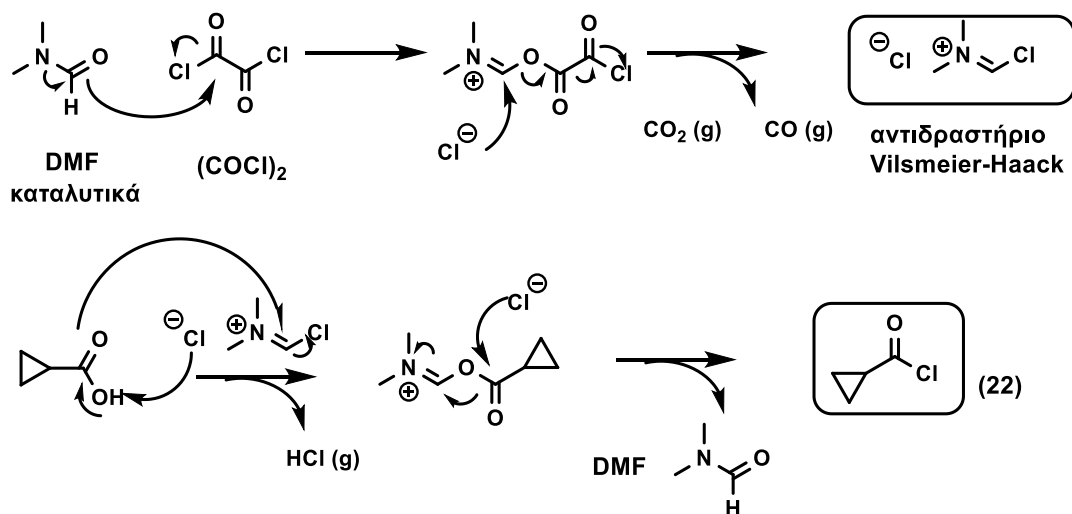


### Γ.1.2. Σύνθεση ακυλοχλωριδίου

Εκτός από το c-προπανούλο-χλωρίδιο (22) (Σχήμα 3.5.), τα ισοβουτυρο-, βενζούλο-, ακετυλο- και πιβαλοϋλο- χλωρίδια, που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή για τη σύνθεση των ακυλοφλωρογλυκινολών, ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο. Το c-προπανούλο-χλωρίδιο (22) συντέθηκε με χλωρίωση του κυκλοπροπανοϊκού οξέος (CPCA) με οξαλυλοχλωρίδιο  $(\text{COCl})_2$  και καταλυτική ποσότητα N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Ο μηχανισμός της χλωρίωσης φαίνεται στο Σχήμα 3.6. Στην οργανική σύνθεση το  $(\text{COCl})_2$  συχνά χρησιμοποιείται με τον καταλύτη N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο για τη σύνθεση ακυλοχλωριδίων από τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα. Το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack που σχηματίζεται από την αντίδραση του  $(\text{COCl})_2$  με το DMF, αντιδρά με το CPCA προς σχηματισμό του αντίστοιχου ακυλοχλωριδίου με παράλληλη παραγωγή αερίων, γεγονός που διευκολύνει τις αντιδράσεις. Το  $(\text{COCl})_2$  είναι πιο εκλεκτικό σε σχέση με άλλα αντιδραστήρια για τον σχηματισμό ακυλοχλωριδίων από καρβοξυλικά οξέα, όπως το  $\text{SOCl}_2$  (thionyl chloride), και προτιμάται η χρήση του (Clayden et al., 2000). Το χλωρίδιο χωρίς περαιτέρω επεξεργασία, χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο της ακυλίωσης προς σχηματισμό της 2-c-προπανούλο-φλωρογλυκινόλης (6) (Σχήμα 3.8.).



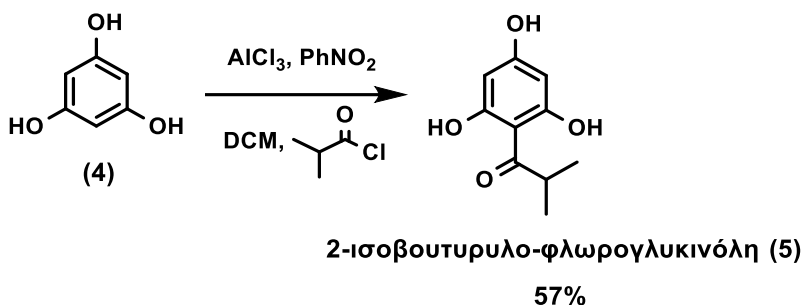
Σχήμα 3.5. Σύνθεση του c-προπανούλο-χλωριδίου (22).



Σχήμα 3.6. Μηχανισμός σύνθεσης c-προπανούλο-χλωριδίου (22).

### Γ.1.3. Σύνθεση ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών

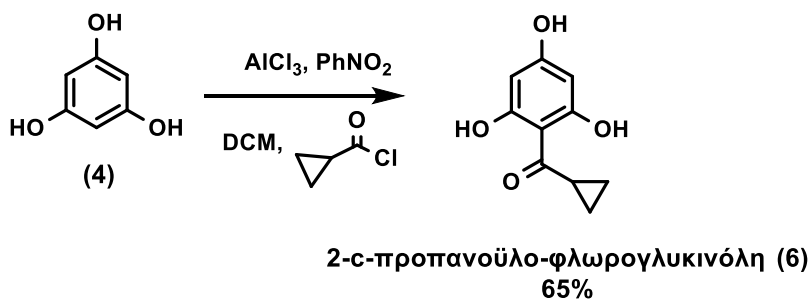
Με βάση τα παραπάνω συντέθηκε αρχικά η **2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (5)** (Σχήμα 3.7.) η οποία βασίστηκε σε βιβλιογραφική μέθοδο (Burckhardt et al., 1978) με ορισμένες τροποποιήσεις για την εύρεση καλύτερων συνθηκών απομόνωσης του προϊόντος.



**Σχήμα 3.7.** Σύνθεση της 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5).

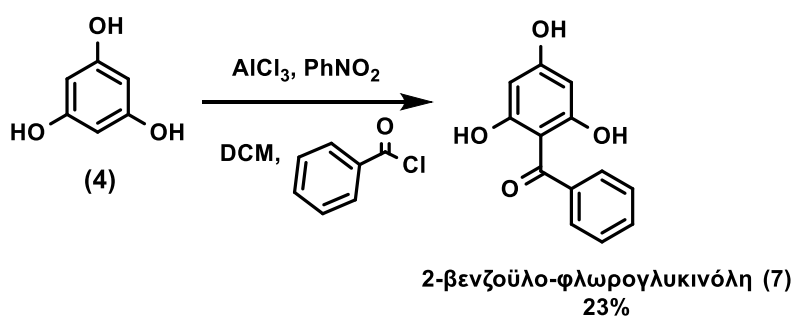
Σε διάλυμα της φλωρογλυκινόλης (4) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (DCM) προστέθηκε  $\text{AlCl}_3$  και  $\text{PhNO}_2$ . Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα ισοβουτυρυλοχλωριδίου σε  $\text{PhNO}_2$  σε κατάλληλη θερμοκρασία για την ομογενοποίηση του μίγματος. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα αποχύθηκε σε πυκνό  $\text{HCl}$  και πάγο. Η χρήση του  $\text{HCl}$  ήταν απαραίτητη για την καταστροφή των δημιουργηθέντων συμπλόκων και τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων. Οι οργανικές φάσεις εκχυλίστηκαν με πυκνό  $\text{NaOH}$  με σκοπό τη δημιουργία αλάτων της (5) και την απομάκρυνση του  $\text{PhNO}_2$  και του  $\text{DCM}$ . Ακολούθησε οξίνιση της υδατικής φάσης και εκχύλιση της οργανικής με αιθέρα. Η απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης ήταν 57%.

Για τη σύνθεση της **2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (6)** ακολουθήθηκαν οι συνθήκες σύνθεσης της (5) και η απόδοση της αντίδρασης ήταν 65% (Σχήμα 3.8.). Η προσθήκη  $\text{MeOH}$  στο σύστημα Εξανίου/ $\text{AcOEt}$  7:3 κατά την χρωματογραφία στήλης πραγματοποιήθηκε λόγω της κρυστάλλωσης του προϊόντος.



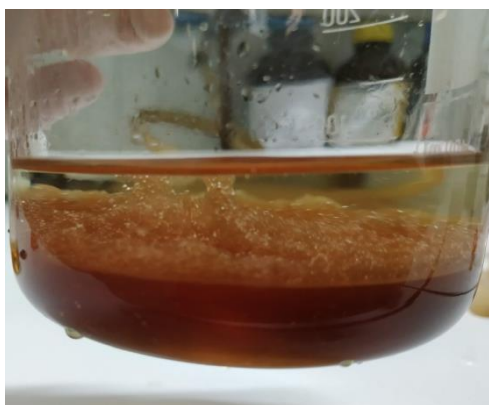
**Σχήμα 3.8.** Σύνθεση της 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (6).

Η σύνθεση της **2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλης (7)** πραγματοποιήθηκε όπως και στην περίπτωση των (5) και (6) σε υψηλότερη όμως θερμοκρασία και με μεγαλύτερη διάρκεια, με απόδοση 23% (Σχήμα 3.9.). Η μικρή απόδοση της 2-βενζοϋλοφλωρογλυκινόλης (7) οφείλεται στη δημιουργία γαλακτωμάτων και στη δυσκολία απομάκρυνσης των δημιουργηθέντων συμπλόκων. Ύστερα από την απόχυση του μίγματος της αντίδρασης σε H<sub>2</sub>O και πυκνό HCl προστέθηκε AcOEt και κρίθηκε απαραίτητη η διήθηση του οξιτισμένου μίγματος ώστε να ακολουθήσει η επεξεργασία του διηθήματος.

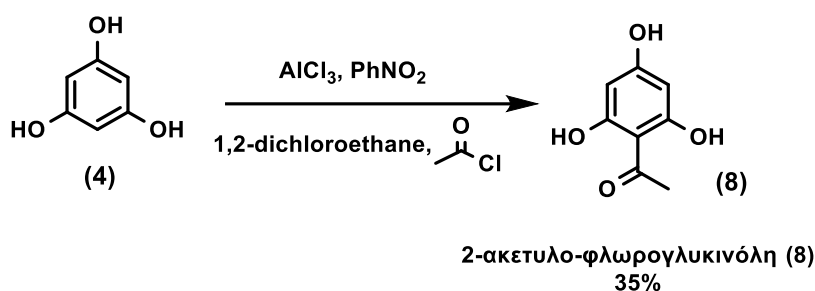


**Σχήμα 3.9.** Σύνθεση της 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλης (7).

Η σύνθεση και επεξεργασία της **2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλης (8)** πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με βιβλιογραφική μέθοδο (Zhou et al., 2017). Το μίγμα αποχύθηκε σε H<sub>2</sub>O και πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσσεις με AcOEt. Η μικρή απόδοση της αντίδρασης (16%) οφείλεται, πέραν της δημιουργίας γαλακτωμάτων και της δυσκολίας απομάκρυνσης του νιτροβενζολίου, στην κρυστάλλωση του προϊόντος κατά την απομόνωσή του. Για τη βελτίωση της απόδοσης, η επεξεργασία του μίγματος πραγματοποιήθηκε με τις συνθήκες της (5) και της (6), καθώς και τη προσθήκη MeOH στο σύστημα εξανίου/AcOEt κατά τη χρωματογραφία στήλης. Η απόδοση βελτιώθηκε (35%) (Σχήμα 3.10.), παρ' όλα αυτά δυσκολίες στην επεξεργασία του μίγματος συνέχισαν να υπάρχουν (Εικόνα 3.2.).

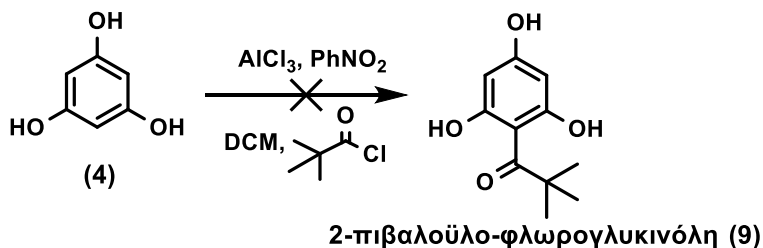


**Εικόνα 3.2.** Δυσκολίες κατά την απομόνωση της 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλης (8).



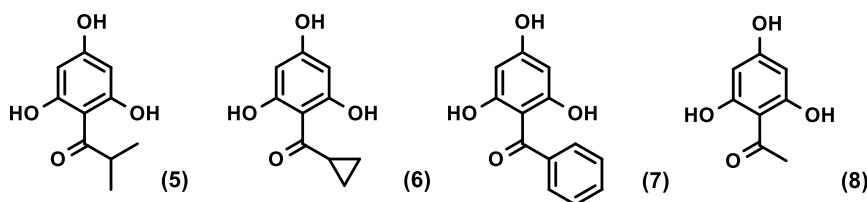
**Σχήμα 3.10.** Σύνθεση της 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλης (8).

Για τη σύνθεση της **2-πιβαλοϋλο-φλωρογλυκινόλης (9)** (Σχήμα 3.11.) ακολουθήθηκε η μέθοδος που εφαρμόστηκε στην περίπτωση της 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5). Παρ' όλα αυτά, ενώ η ανάδευση μετά την ολολήρωση της προσθήκης του πιβαλοϋλοχλωριδίου συνεχίστηκε για 22 ώρες ακόμα, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος. Στο μίγμα προστέθηκε ακόμα 0.5 ισοδύναμο χλωριδίου και η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 70°C χωρίς κάποια αλλαγή στην εικόνα της αντίδρασης και δεν απομονώθηκε κάποιο προϊόν. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεγάλη στερεοχημική παρεμπόδιση της πιβαλοϋλομάδας.



**Σχήμα 3.11.** Αδυναμία σύνθεσης της 2-πιβαλοϋλο-φλωρογλυκινόλης (9).

Τα ακυλιωμένα παράγωγα που συντέθηκαν στο εργαστήριο και αξιολογήθηκε η προνυμφοκτόνος δράση τους είναι η 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (5), η 2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6), η 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (7), η 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8) (Εικόνα 3.3.) (Εικόνα 3.4.). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να συντεθούν σε μεγάλη κλίμακα, σε ποσότητες γραμμαρίων, γεγονός που τα καθιστά ικανά μόρια για εφαρμογή.



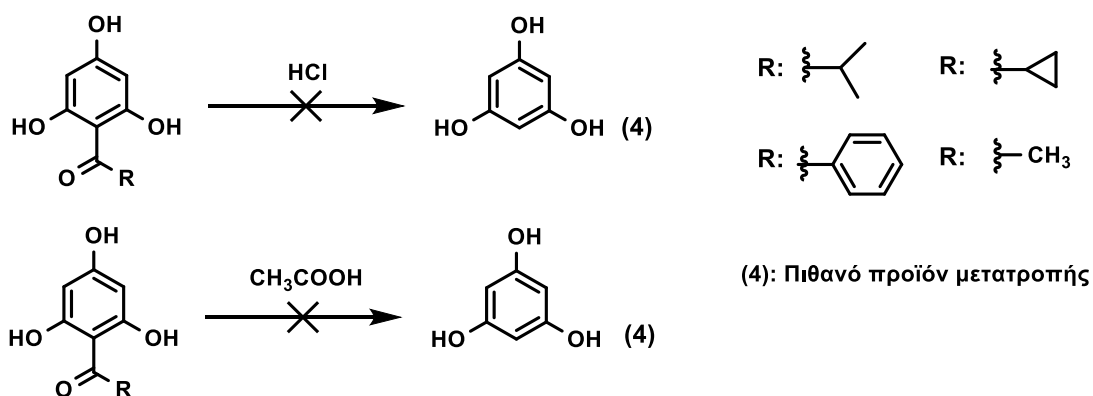
**Εικόνα 3.3.** Χημικές δομές ακυλοφλωρογλυκινολών που συντέθηκαν στο εργαστήριο.

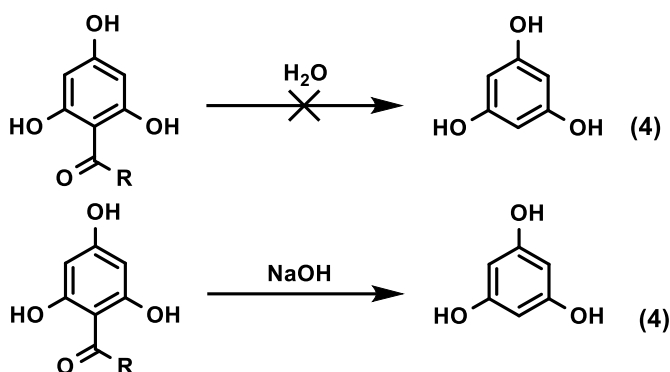


Εικόνα 3.4. Ακυλοφλωρογλυκινόλες σε σφαιρικές φιάλες.

#### Γ.1.4. Σταθερότητα ακυλοφλωρογλυκινολών

Η παρατήρηση μερικής μετατροπής των ακυλιωμένων προϊόντων (5), (6), (7) και (8) σε άλλα, μετά την επεξεργασία των μιγμάτων αντίδρασης σχηματισμού τους, οδήγησε στην ανάγκη μελέτης της σταθερότητάς τους. Η σταθερότητα καθένος από τα προϊόντα ακυλίωσης μελετήθηκε σε διαφορετικά pH, χρόνους και θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, η σταθερότητα των παραγώγων ελέγχθηκε σε θερμοκρασίες 25°C και 50°C και σε χρονικά διαστήματα μισής και μίας ώρας. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με διάλυση 2 mg από το κάθε παράγωγο, σε 1 mL υδατικού διαλύματος HCl (pH=1), CH<sub>3</sub>COOH (pH=5), NaHCO<sub>3</sub> (pH=9), NaOH (pH=14) και σε H<sub>2</sub>O (pH=7). Στη συνέχεια, σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκαν μικροεκχυλίσεις των μιγμάτων με AcOEt, ενώ για pH=9 και pH=14 προστέθηκε και CH<sub>3</sub>COOH και μελετήθηκε η σταθερότητα των ενώσεων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Σε ισχυρά αλκαλικές συνθήκες (pH=14) στους 25°C και 50°C διαπιστώθηκε ο σχηματισμός διαφορετικού προϊόντος, το οποίο όμως δεν ελέγχθηκε περαιτέρω (Πίνακας 3.1.) (Σχήμα 3.12.). Το προϊόν που σχηματίστηκε ήταν ίδιο σε όλες τις περιπτώσεις και η σύγκριση με τη φλωρογλυκινόλη με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υποδηλώνει ότι πρόκειται για αποακυλίωση των ενώσεων αυτών. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγεί τη μείωση των αποδόσεων των ενώσεων (5) ως (8), εντούτοις απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων.





**Σχήμα 3.12.** Έλεγχος σταθερότητας ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών σε διαφορετικές τιμές pH.

**Πίνακας 3.1.** Σταθερότητα ενώσεων (5) ως (8) ανάλογα με τη θερμοκρασία και το pH σε ½ ώρα.

Ακυλιωμένες φλωρογλυκινόλες	25°C	50°C
pH=1	+	+
pH=5	+	+
pH=7	+	+
pH=9	+	+
pH=14	-	-

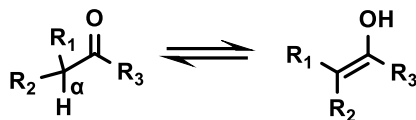
+ σταθερό, - μη σταθερό

## Γ.2. ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ

Για να γίνει κατανοητή η χημεία και η συμπεριφορά των ακυλοφλωρογλυκινολών κατά τις αντιδράσεις τους πρέπει να γίνει αναφορά πρώτον στην ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης και δεύτερον στη C-ακυλίωση.

### Γ.2.1. Ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης

Η ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης αναφέρεται στην χημική ισορροπία μεταξύ μιας κετονικής μορφής (κετόνη ή αλδεΐδη) και μιας ενόλης (αλκοόλης). Οι καρβονυλικές ενώσεις που διαθέτουν ένα ή περισσότερα άτομα υδρογόνου στους α άνθρακες τους, αλληλομετρέπονται ταχύτατα με τις αντίστοιχες ενόλες τους (Σχήμα 3.13.). Συνήθως, η χημική ισορροπία οδηγείται θερμοδυναμικά και κυριαρχεί η κετονική μορφή σε θερμοκρασία δωματίου λόγω της ενέργειας των δεσμών, παρ' όλα αυτά η ενολική μορφή είναι σημαντική για πολλές αντιδράσεις.



Σχήμα 3.13. Ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης.

Πολλοί παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν την ισορροπία προς την ενολική μορφή και είναι οι ίδιοι παράγοντες που σταθεροποιούν τα αλκένια και τις αλκοόλες. Η ενολική μορφή ευνοείται σε περιπτώσεις όπως η αρωματικότητα λόγω σταθεροποίησης, η παρουσία γειτονικών βάσεων κατά Lewis καθώς σχηματίζονται ισχυροί ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου και η περίπτωση της συζυγίας. Επιπλέον, ευνοείται το ισομερές αυτό παρουσία μη πολικού απρωτικού διαλύτη σε αντίθεση με πολικούς πρωτικούς διαλύτες, όπως το H<sub>2</sub>O, που συμμετέχουν στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου, παρεμποδίζοντας την δημιουργία ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου οι οποίοι σταθεροποιούν την ενολική μορφή. Τέλος, όπως και στην περίπτωση των αλκενίων, όσο αυξάνεται η υποκατάσταση τόσο ευνοείται η ενολική μορφή (Πηγή 28).

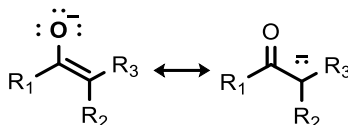
Πίνακας 3.2. Περιπτώσεις στις οποίες ευνοείται η ενολική μορφή.

Παράγοντας	Παράδειγμα	Σχόλια
Αρωματικότητα		
Δεσμοί Υδρογόνου		
Συζυγία		Ο διπλός δεσμός σε συζυγία με τον βενζολικό δακτύλιο ευνοεί την ενολική μορφή.
Διαλύτης		Αναλογία ταυτομερών σε: (α) βενζόλιο 6:94 (β) νερό 81:19
Υποκατάσταση		Η αύξηση της υποκατάστασης στον C ευνοεί την ενολική μορφή της ένωσης A λόγω θερμοδυναμικής σταθερότητας του διπλού δεσμού.

## Γ.2.2. Σχηματισμός ενολικού ανιόντος

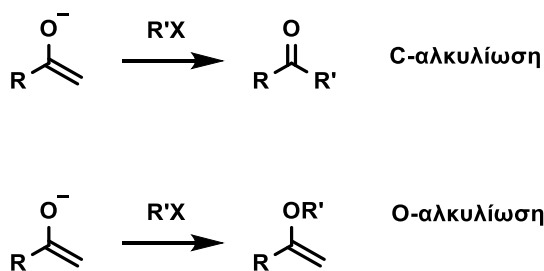
### Δημιουργία δεσμού C-C μέσω αλκυλίωσης πυρηνόφιλου άνθρακα

Οι καρβονυλικές ενώσεις που έχουν α-H μπορούν να δώσουν ενολικά ανιόντα ή να αντιδράσουν μέσω της ενολικής τους δομής. Οι αντιδράσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσω των ενολικών ανιόντων είναι μεγάλης σημασίας για την Οργανική Σύνθεση και με τις περισσότερες από αυτές δημιουργείται δεσμός C-C. Η δημιουργία δεσμών C-C αποτελεί τη βάση για την κατασκευή ανθρακικών σκελετών στη σύνθεση οργανικών μορίων και ο σχηματισμός σ δεσμού μεταξύ ατόμων άνθρακα μπορεί να γίνει μεταξύ ενός πυρηνόφιλου και ενός ηλεκτρονιόφιλου αλκυλιωτικού μέσου. Το αποπρωτονιωμένο ενδιάμεσο (ενολικό ανιόν) είναι σημαντικό στη χημεία του καρβονυλίου, ως ισχυρό πυρηνόφιλο και αποτελεί υβρίδιο δύο δομών συντονισμού (Σχήμα 3.14.).



Σχήμα 3.14. Δομές συντονισμού του ενολικού ανιόντος.

Τα ενολικά ιόντα, τα οποία προκύπτουν από αποπρωτονίωση με κατεργασία βάσης, μπορούν να αλκυλωθούν παρουσία αλκυλαλογονιδίου μέσω μιας S<sub>N</sub>2 υποκατάστασης. Η αλκυλίωση ενός ενολικού ανιόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε στο οξυγόνο είτε στον άνθρακα και συνήθως προκύπτουν μίγματα αυτών. Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την πορεία της αντίδρασης, όπως η πυκνότητα αρνητικού φορτίου, το είδος του διαλύτη, η επιλογή της βάσης, η διαλυτότητα, το ηλεκτρονιόφιλο, το αλογονίδιο, η σταθερότητα του προϊόντος, στερεοχημικοί παράγοντες -στην περίπτωση ενδομοριακής αλκυλίωσης προς το σχηματισμό δακτυλίων- και να κατευθύνουν την αντίδραση προς το σχηματισμό του C- ή του O-αλκυλιωμένου προϊόντος (Σχήμα 3.15.).



Σχήμα 3.15. C- και O-αλκυλίωση.



Η ταχύτητα της αλκυλίωσης ενολικών ανιόντων εξαρτάται από το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται στην αντίδραση και έχει άμεση συνάρτηση με τη διηλεκτρική σταθερά του. Πολικοί απρωτικοί διαλύτες όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), η N-μέθυλο πυρρολιδόνη και το εξαμέθυλο φωσφορικό τριαμίδιο (HMPA) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αύξηση της δραστηριότητας των ενολικών ανιόντων. Η δραστηριότητα ενός ενολικού ανιόντος με αλκαλικό αντισταθμιστικό κατιόν ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) επηρεάζεται αρκετά από το βαθμό συσσωμάτωσης, ο οποίος με τη σειρά του εξαρτάται από το διαλύτη της αντίδρασης. Το ζητούμενο για ένα ζεύγος ενολικού ανιόντος-μετάλλου είναι ο διαλύτης να διαλυτοποιεί ισχυρά το κατιόν αλλά όχι το ανιόν. Οι πολικοί απρωτικοί διαλύτες έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Περιέχουν αρνητικά φορτισμένα άτομα (οξυγόνο, άζωτο) που επιτρέπουν τη συναρμογή με το μέταλλο, ενώ παράλληλα τα θετικά φορτισμένα άτομά τους δεν είναι τόσο διαθέσιμα, ώστε να συμπλοκοποιηθούν με το ενολικό ανιόν. Έτσι παρέχουν ένα μέσο στο οποίο το ζεύγος ανιόντος-μετάλλου είναι διασπασμένο οπότε το ανιόν είναι λιγότερο περιπεπλεγμένο άρα και περισσότερο δραστικό. Οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες έχουν και αυτοί τη δυνατότητα να επιδιαλυτώνουν το κατιόν, όμως μέσω δεσμών υδρογόνου είναι δυνατόν να συμπλεχθούν με το ανιόν και να μειώσουν τη δραστηριότητά του. Έτσι, σε πολικούς απρωτικούς διαλύτες (HMPA, DMF) το O-αλκυλιωμένο είναι το κύριο προϊόν, καθιστώντας το ανιόν περισσότερο διαθέσιμο, διαχωρίζοντας το ένα από το άλλο και τον δεσμό περισσότερο πολικό, αυξάνοντας το φορτίο του οξυγόνου. Μέσω διαλυτών με αιθερικό δεσμό όπως το τετραϋδροφουράνιο (THF), ένας πολικός απρωτικός διαλύτης και το 1,2 διμεθοξυαιθάνιο (DME), ένας μη πολικός απρωτικός διαλύτης, προάγεται η σύνθεση του C-αλκυλιωμένου προϊόντος. Η χρήση πρωτικών διαλυτών ευνοεί τον σχηματισμό C-αλκυλιωμένων προϊόντων καθώς η δραστηριότητα για αλκυλίωση στη θέση του οξυγόνου εξασθενεί, λόγω των σχηματιζόμενων δεσμών υδρογόνου με τον διαλύτη.

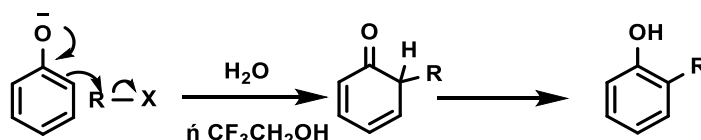
Το είδος της αποχωρούσας ομάδας του ηλεκτρονιόφιλου παίζει σημαντικό ρόλο για την πορεία της αντίδρασης προς το C- ή το O-αλκυλιωμένο προϊόν και η εξήγηση της συμπεριφοράς της αποχωρούσας ομάδας παραδοσιακά γίνεται μέσω της θεωρίας HSAB (Hard and Soft (Lewis) acids and bases) για τα “σκληρά-μαλακά” οξέα και βάσεις. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή που προτάθηκε από τον Pearson τα οξέα και οι βάσεις χωρίζονται σε σκληρά και μαλακά και οι σκληρές βάσεις αντιδρούν με τα σκληρά οξέα και οι μαλακές βάσεις με τα μαλακά οξέα. Ο όρος “σκληρό” αναφέρεται σε είδη μικρά, με υψηλής έντασης φορτίο (κυρίως για οξέα) και μικρή πολωσιμότητα ενώ τα “μαλακά” σε είδη μεγάλου μεγέθους, με χαμηλής έντασης φορτίο και μεγάλη

πολωσιμότητα. Τα ενολικά ιόντα έχουν δύο πυρηνόφιλες θέσεις, τον άνθρακα και το οξυγόνο. Το οξυγόνο είναι ένα σκληρό πυρηνόφιλο κέντρο με εντοπισμένο φορτίο και μικρά σε όγκο τροχιακά. Ένα τέτοιο κέντρο συνδυάζεται ευνοϊκά με όμοιας φύσης κέντρα, δηλαδή σκληρά ηλεκτρονιόφιλα, όπως π.χ. τα αλκυλιωτικά που έχουν οξυγονούχες αποχωρούσες ομάδες όπως π.χ. οι τοσυλικοί εστέρες. Έτσι λοιπόν αλκυλίωση μέσω σουλφονικού εστέρα τείνει κυρίως προς αλκυλίωση στο οξυγόνο. Αντίθετα ο α-άνθρακας του ενολικού συνιστά ένα μαλακό πυρηνόφιλο κέντρο με μικρής έντασης φορτίο, ογκώδη τροχιακά (π σύστημα δ.δ) και συνδυάζεται ευνοϊκά με μαλακά ηλεκτρονιόφιλα όπως τα αλκυλαλογονίδια ( $I > Br > Cl$ ), π.χ. τα ιωδιδία έχουν μεγάλα τροχιακά και διάχυτο ηλεκτρονιακό νέφος (μεγάλη πολωσιμότητα).

Πέραν όμως της αποχωρούσας ομάδας ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την πορεία είναι το είδος του αντισταθμιστικού κατιόντος. Όσο πιο “γυμνό” είναι το ενολικό ιόν τόσο πιο εύκολα γίνεται Ο-αλκυλίωση. Η δραστηριότητα για τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα κατιόντα αυξάνεται με τη σειρά  $Mg^{2+} < Li^+ < Na^+ < K^+ < Cs^+$ . Τα μικρά, σκληρότερα  $Mg^{2+}$  και  $Li^+$  συνδέονται ισχυρότερα με το οξυγόνο προάγοντας την C-αλκυλίωση σε σχέση με τα μαλακότερα που ευνοούν την Ο-αλκυλίωση.

Συνοψίζοντας, η αλκυλίωση στο οξυγόνο αυξάνεται με τη χρήση άλυτο σουλφιδίων ή σουλφοξειδίων σε πολικούς απρωτικούς διαλύτες με μαλακά αντισταθμιστικά κατιόντα ενώ η C-αλκυλίωση προάγεται με χρήση αλκυλαλογονιδίων (κυρίως ιωδιδίου) σε λιγότερο πολικούς ή και σε πρωτικούς διαλύτες με σκληρά αντισταθμιστικά κατιόντα.

Στην περίπτωση των φαινολικών ανιόντων, η αλκυλίωση λαμβάνει χώρα σχεδόν αποκλειστικά στο οξυγόνο διότι στην περίπτωση αλκυλίωσης στον άνθρακα καταστρέφεται η αρωματικότητα του μορίου. Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιηθεί νερό ή τριφθοροαιθανόλη ως ο διαλύτης της αντίδρασης, το ποσοστό του C-αλκυλιωμένου προϊόντος μπορεί να αυξηθεί σημαντικά εξαιτίας των ισχυρών δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ του διαλύτη και του φαινολικού ανιόντος (Σχήμα 3.16.) (Clayden et al., 2000; Smith and March, 2007).

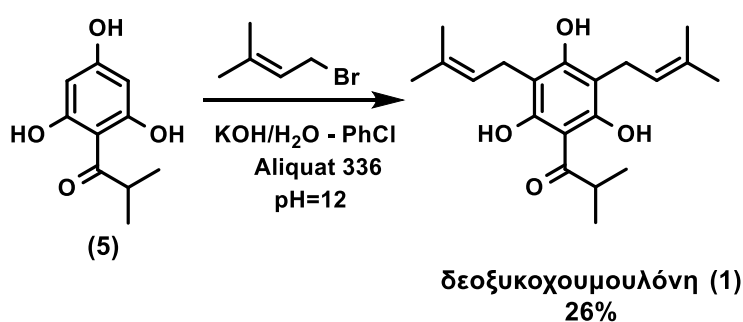


Σχήμα 3.16. C-αλκυλίωση φαινολικού ανιόντος.

### Γ.2.3. Σύνθεση των φυσικών προϊόντων δεοξυκοχουμουλόνη (1), κολουπουλόνη (3) και κολουπόνη (14)

Η διερεύνηση της δυνατότητας αλκυλίωσης της 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) αποτελούσε πρωταρχικό στόχο της εργασίας αυτής. Η σύνθεση των ΜΠΑ μπορεί να πραγματοποιηθεί από την 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (5), μεταβάλλοντας το pH της αντίδρασης. Ανάλογα με το pH καταλήγουμε στο δι-, τρι-, ή και τετρα-υποκατεστημένο παράγωγο και η αύξηση του οδηγεί στην προσθήκη περισσότερων πρενυλικών αλυσίδων στο μόριο (Πίνακας 3.3).

Η σύνθεση της **δεοξυκοχουμουλόνης (1)** βασίστηκε σε βιβλιογραφική μέθοδο (Burckhardt et al., 1978). Πραγματοποιήθηκε σε διφασικό σύστημα νερού-χλωροβενζολίου, χρησιμοποιώντας καυστικό κάλιο (KOH) ως βάση και διατήρηση του pH σε τιμή 12. Ως καταλύτης μεταφοφοράς φάσης χρησιμοποιήθηκε το Aliquat 336 (Starks' catalyst) (Σχήμα 3.17.). Η αδυναμία ελέγχου του pH οδήγησε σε χαμηλή απόδοση. Μετά την προσθήκη του πρενυλοβρωμιδίου και όσο η αντίδραση προχωρούσε προς τη σύνθεση της (1), το pH της αντίδρασης μειωνόταν με αποτέλεσμα τη συνεχή διόρθωση του pH στο 12 με προσθήκη βάσης. Κατά την προσθήκη του διαλύματος KOH, ακόμα και τυχόν τοπική αύξηση του pH πάνω από το 12, οδηγούσε στη σύνθεση της κολουπουλόνης (3) και κολουπόνης (14), ελαττώνοντας την απόδοση της επιθυμητής (1). Παρά την αδυναμία ελέγχου του pH σε σταθερή τιμή, η πολύ αργή προσθήκη του KOH είναι βοηθητική και συνάμα απαραίτητη για τη σύνθεση της (1). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 26%.

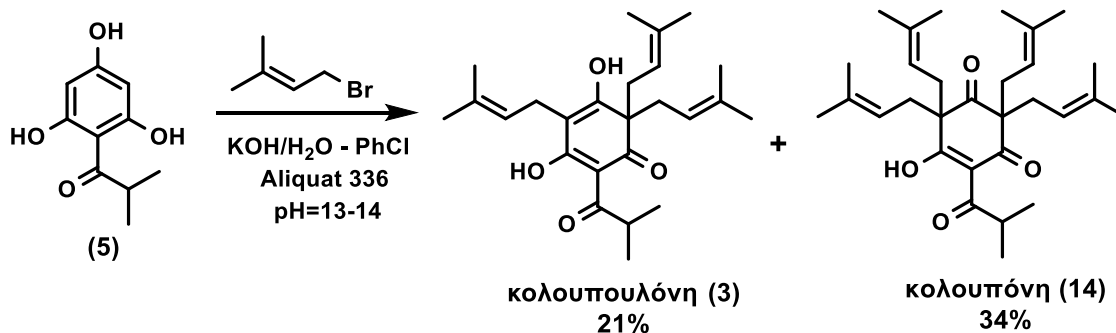


Σχήμα 3.17. Σύνθεση της δεοξυκοχουμουλόνης (45).

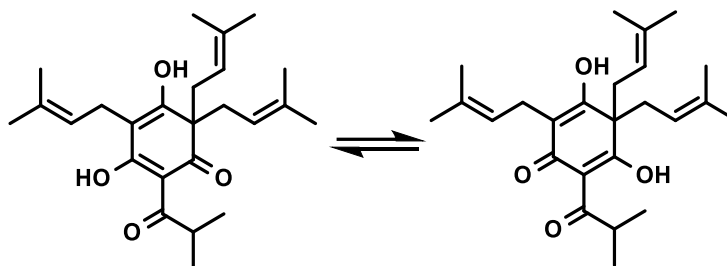
Η σύνθεση των φυσικών προϊόντων **κολουπουλόνη (3)** και **κολουπόνη (14)**, η οποία ανήκει στην κατηγορία των m-βενζοκινονών (Πηγή 29), πραγματοποιήθηκε, όπως και η δεοξυκοχουμουλόνη (1) σε διφασικό σύστημα νερού-χλωροβενζολίου, με KOH ως βάση (Σχήμα 3.18.). Ως καταλύτης μεταφοφοράς φάσης χρησιμοποιήθηκε

επίσης το Aliquat 336 (Starks' catalyst). Για την αντίδραση σύνθεσης των δύο αυτών ενώσεων το pH κυμαινόταν σε τιμές 13-14 και ήταν αναγκαία η συνεχής προσθήκη KOH, καθώς η μείωση του pH σε τιμές <13 οδηγούσε στον σχηματισμό της δεοξυκοχουμουλόνης (1) (Πίνακας 3.3.). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 21% για την κολουπουλόνη (3) και 34% για την κολουπόνη (14).

Η κολουπουλόνη (3), αποτελεί μίγμα δύο ταυτομερών μορφών, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.19.



Σχήμα 3.18. Σύνθεση της κολουπουλόνης (3) και κολουπόνης (14).



Σχήμα 3.19. Ταυτομερείς μορφές κολουπουλόνης (3).

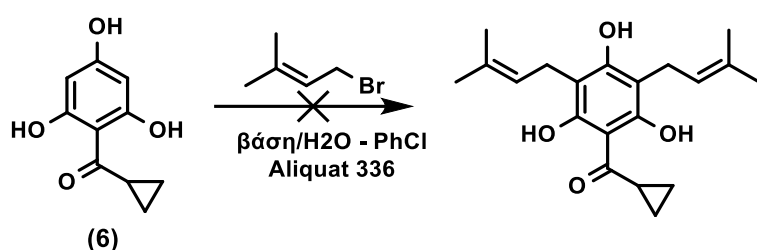
Πίνακας 3.3. Συσχέτιση των πρενυλιωμένων παραγώγων της (5) με το pH της αντίδρασης.

Φυσικό Προϊόν	pH
Δεοξυκοχουμουλόνη (1)	12
Κολουπουλόνη (3)	13
Κολουπόνη (14)	14

#### Γ.2.4. Προσπάθεια σύνθεσης δι-αλκυλιωμένων παραγώγων ακυλοφλωρογλυκινολών

Για τη σύνθεση της 2,4-διπρενυλο-2-σ-προπανοΐλο-φλωρογλυκινόλης (12) από την 2-σ-προπανοΐλο-φλωρογλυκινόλη (6), ακολουθήθηκε η πορεία σύνθεσης της δεοξυκοχουμουλόνης (1), παρ' όλα αυτά δεν μπόρεσε να απομονωθεί κάποιο προϊόν.

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διαφορετικές τιμές pH, με τη χρήση διαφορετικών συστημάτων βάσης/διαλύτη για την εξακρίβωση των συνθηκών σχηματισμού της επιθυμητής (12) (Πίνακας 3.4.). Σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε διφασικό σύστημα νερού-χλωροβενζολίου, με καταλύτη μεταφοράς φάσης Aliquat 336 και 2 ισοδύναμα βρωμιδίου (Σχήμα 3.20.). Ανεξαρτήτως του συνδυασμού βάσης-διαλύτη και τις διαφορετικές συνθήκες pH, δε σχηματίστηκε η (12). Σε διαφορετικές συνθήκες από την κολουπόνη (14), με χρήση όξινου ανθρακικού νατρίου ( $\text{NaHCO}_3$ ), τιμή  $\text{pH}=9$  και 2 ισοδύναμα βρωμιδίου, σχηματίστηκε το **τετραπρενυλιωμένο παράγωγο της 2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλης (23)** (Σχήμα 3.21.). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 13%.

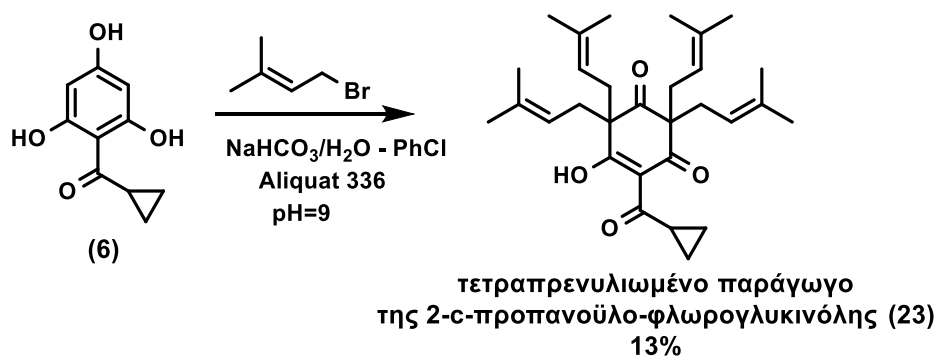


4,6-δι-πρενυλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη (12)

Σχήμα 3.20. Αδυναμία σύνθεσης της 4,6-δι-πρενυλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλης (12).

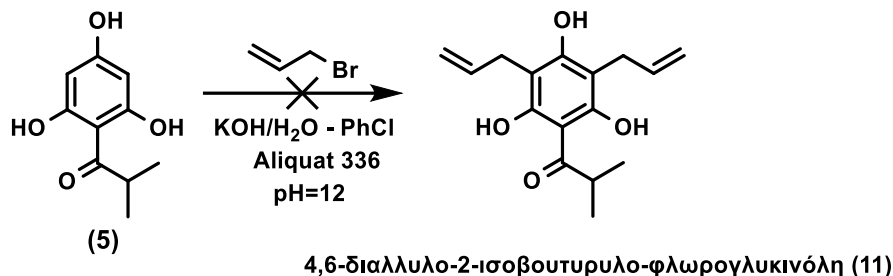
Πίνακας 3.4. Δοκιμές πρενυλίωσης της (6).

Βάση/Διαλύτης	Προϊόν
$\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$	-
$\text{K}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}$	-
$\text{H}_2\text{O}$	-
$\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$	(23)



Σχήμα 3.21. Σύνθεση του τετραπρενυλιωμένου παραγώγου (23).

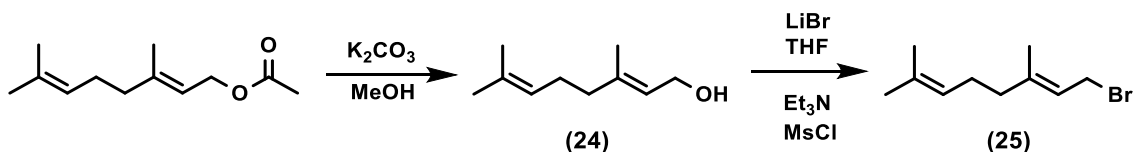
Η σύνθεση της **4,6-διαλλυλο-δεοξυκοχουμουλόνης (11)** πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της δεοξυκοχουμουλόνης (1) (Σχήμα 3.22.). Η εικόνα της αντίδρασης ήταν πολύπλοκη και δεν ήταν δυνατή η απομόνωση της (11).



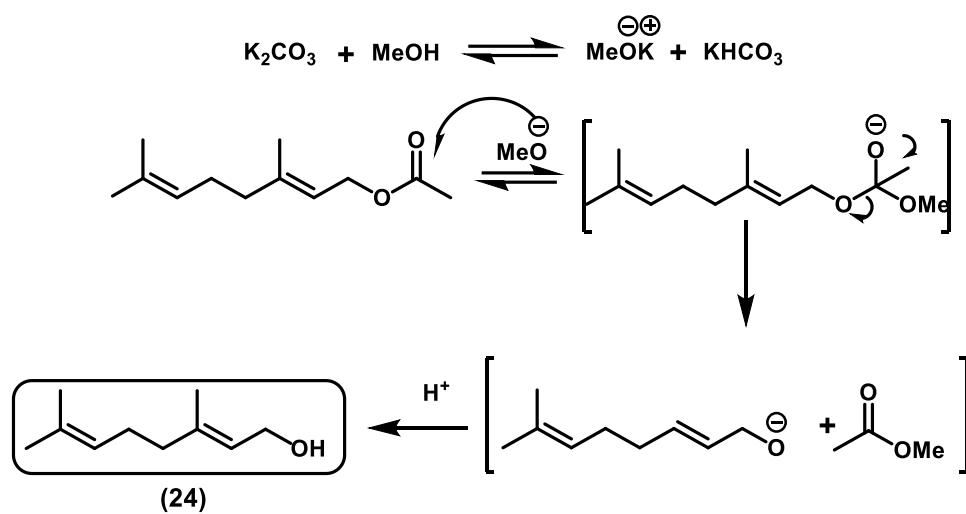
**Σχήμα 3.22.** Αδυναμία σύνθεσης της 4,6-διαλλυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (11).

### Γ.2.5. C-γερανυλίωση ακυλοφλωρογλυκινολών

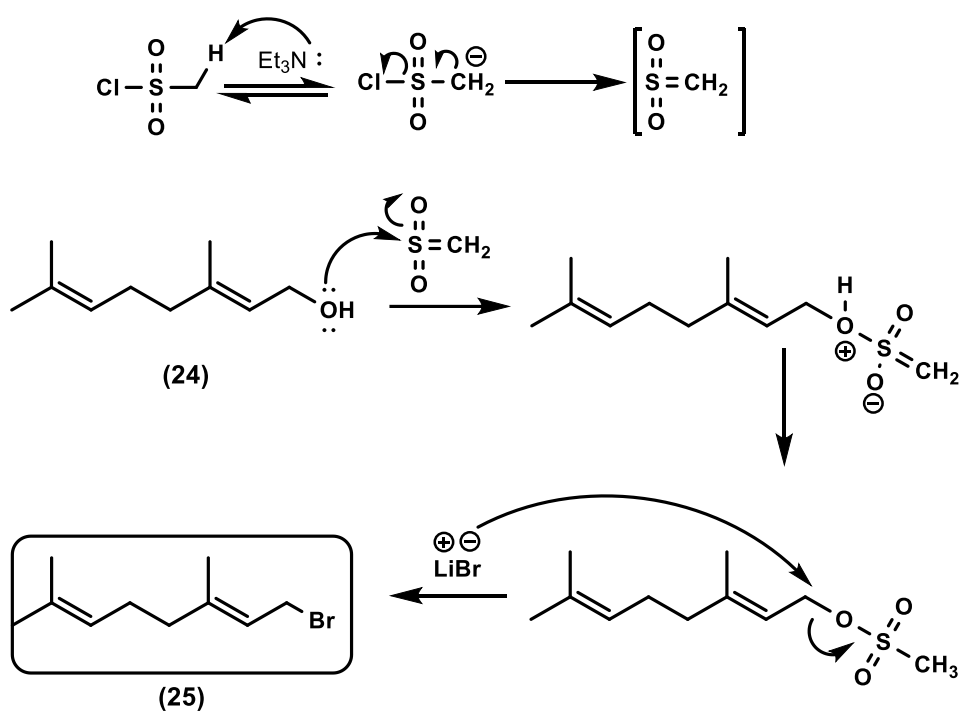
Η γερανιόλη (24) είναι ένα εγκεκριμένο εντομοαπωθητικό που χρησιμοποιείται ευρέως. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2017, η τιμή  $LC_{50}$  του φυσικού αυτού προϊόντος έναντι προνυμφών του είδους *Culex ripiens* ήταν 6.86 mg/L (Tabari et al., 2017). Έτσι, ακολούθησε η σύνθεση C-αλκυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών με τη χρήση γερανυλοβρωμιδίου (25). Η σύνθεση του γερανυλοβρωμιδίου (25) (Σχήμα 3.23.) ξεκίνησε από τον οξικό εστέρα της γερανιόλης, ένα φυσικό προϊόν, μονοτερπένιο, άχρωμο υγρό με ευχάριστη οσμή. Η μετεστεροποίηση (Σχήμα 3.24.) πραγματοποιήθηκε μέσω μιας τυπικής διαδικασίας πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης, στην οποία το ιόν  $MeO^-$  αποτελεί το πυρηνόφιλο που προστίθεται στην καρβονυλο ομάδα του εστέρα προς σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Μετά την απομόνωση της γερανιόλης (24), ένα φυσικό προϊόν, άχρωμο έλαιο, πραγματοποιείται αντίδραση βρωμίωσης (Σχήμα 3.25.) για την παραλαβή του γερανυλοβρωμιδίου (25) για την μετέπειτα αλκυλίωση των ακυλοφλωρογλυκινολών. Η αντίδραση βρωμίωσης της πρωτοταγούς αλκοόλης γίνεται με το αντιδραστήριο  $MsCl$ , ώστε να μετατραπεί η υδροξυλομάδα (ισχυρή βάση) σε καλύτερη αποχωρούσα ομάδα και να λάβει χώρα υποκατάσταση από το πυρηνόφιλο, μέσω  $S_N2$  υποκατάστασης. Το αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο της C-αλκυλίωσης χωρίς επεξεργασία.



**Σχήμα 3.23.** Σύνθεση του γερανυλοβρωμιδίου (25).

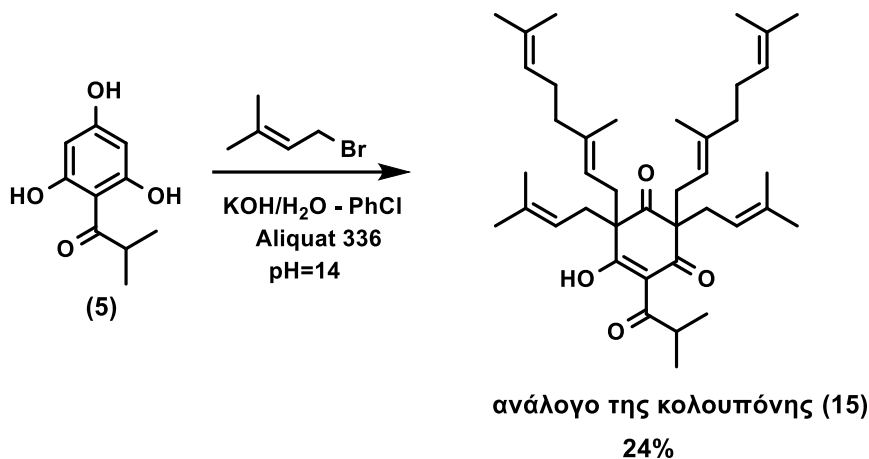


Σχήμα 3.24. Μηχανισμός Μετεστεροποίησης.



Σχήμα 3.25. Μηχανισμός βρωμίωσης της αλκοόλης (24).

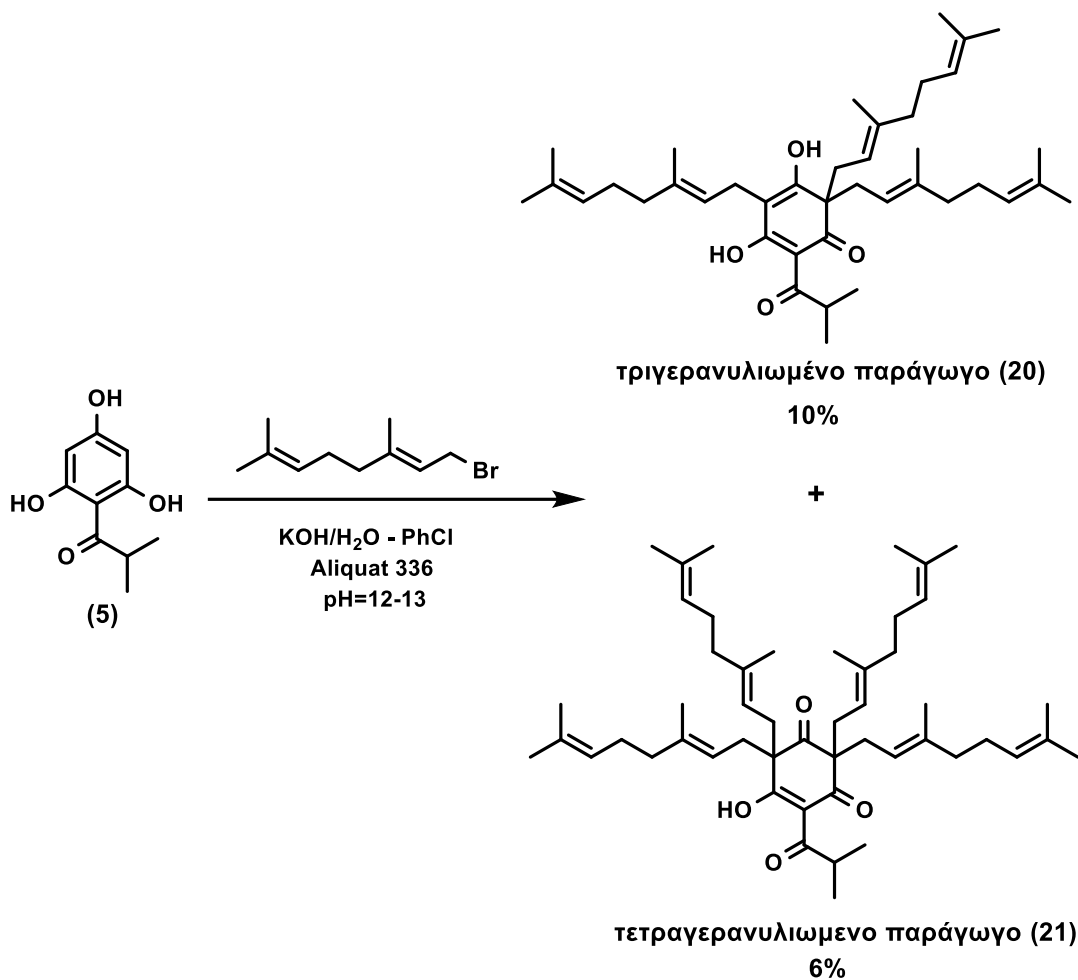
Για τη σύνθεση του **αναλόγου της κολουπόνης (15)** χρησιμοποιήθηκε διφασικό σύστημα νερού-χλωροβενζολίου, με καταλύτη μεταφοράς φάσης Aliquat 336 και ως βάση το KOH (pH=14). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 24% (Σχήμα 3.26.).



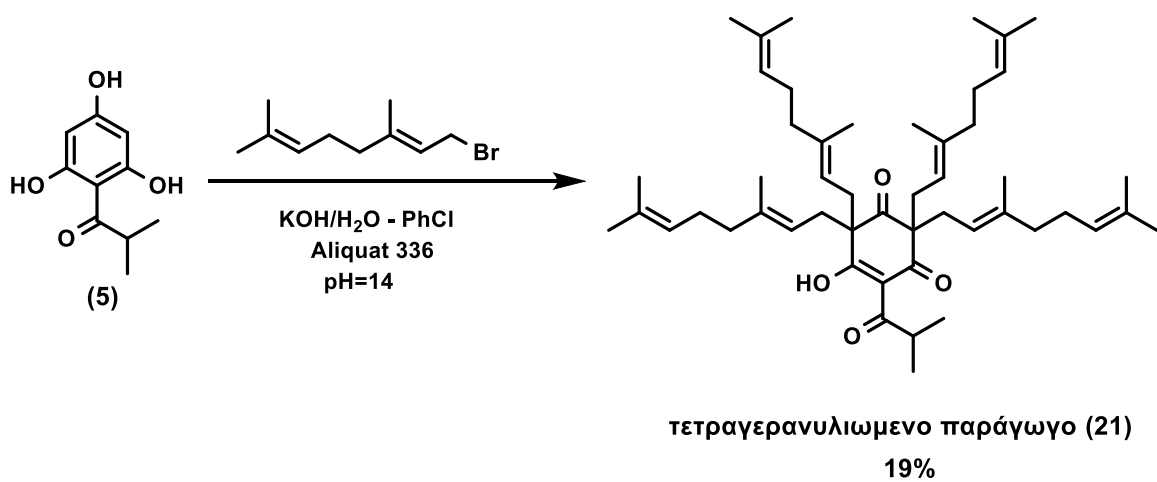
**Σχήμα 3.26.** Σύνθεση του αναλόγου της κολουπόνης (15).

Οι συνθήκες C-γερανυλίωσης της 2-ισοβουτυρυλοφλωρογλυκινόλης (5) διαφέρουν από εκείνες τις C-πρενυλίωσης. Σε διφασικό σύστημα νερού-χλωροβενζολίου με καταλύτη μεταφοράς φάσης Aliquat 336 και βάση KOH, με 2 ισοδύναμα βρωμιδίου σε pH 12-13, αντί να σχηματιστεί η δι- και τριγερανυλιωμένη 2-ισοβουτυρυλοφλωρογλυκινόλη, σχηματίστηκε το **τριγερανυλιωμένο (20)** και **τετραγερανυλιωμένο παράγωγο (21)** (Σχήμα 3.27.). Η απόδοση της αντίδρασης για την (20) ήταν 10% και για την (21) 6%. Η απόδοση, για την περίπτωση του τετραγερανυλιωμένου παραγώγου (21), αυξήθηκε σε 19% με τη χρήση 3.1 ισοδυνάμων βρωμιδίου και βάση το KOH σε pH=14, σε διφασικό σύστημα νερού-χλωροβενζολίου με καταλύτη μεταφοράς φάσης Aliquat 336 (Σχήμα 3.28.). Μετά την προσθήκη του γερανυλοβρωμιδίου και όσο η αντίδραση προχωρούσε προς τη σύνθεση της (21), το pH της αντίδρασης μειωνόταν με αποτέλεσμα την ανάγκη συνεχούς διόρθωσης του pH με τη προσθήκη βάσης. Κατά την προσθήκη του διαλύματος KOH, ακόμα και τυχόν τοπική μείωση του pH κάτω από το 13, οδηγούσε στο σχηματισμό του τριγερανυλιωμένου (20) και του διγερανυλιωμένου παραγώγου (19), ελαττώνοντας την απόδοση της επιθυμητής ένωσης (21). Παρά την αδυναμία ελέγχου του pH σε σταθερή τιμή, η πολύ αργή προσθήκη του KOH είναι βοηθητική και απαραίτητη για τη σύνθεση της (21).



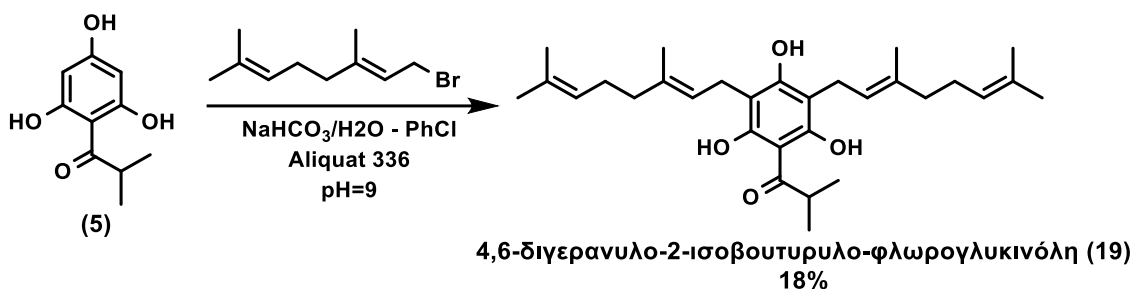


Σχήμα 3.27. Σύνθεση του τριγερανυλιωμένου (20) και τετραγερανυλιωμένου παραγώγου (21).



Σχήμα 3.28. Σύνθεση του τετραγερανυλιωμένου παραγώγου (21).

Η σύνθεση του διγερανυλιωμένου αναλόγου τη δεοξυκοχουμουλόνης (1), **4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19)**, πραγματοποιήθηκε σε χαμηλότερη τιμή pH (pH=9), σε διφασικό σύστημα χλωροβενζολίου-νερού, χρησιμοποιώντας καταλύτη μεταφοράς φάσης Aliquat 336, με βάση NaHCO<sub>3</sub> και 1.5 ισοδύναμο βρωμιδίου (Σχήμα 3.29.). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 18%.



**Σχήμα 3.29.** Σύνθεση της 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (19).

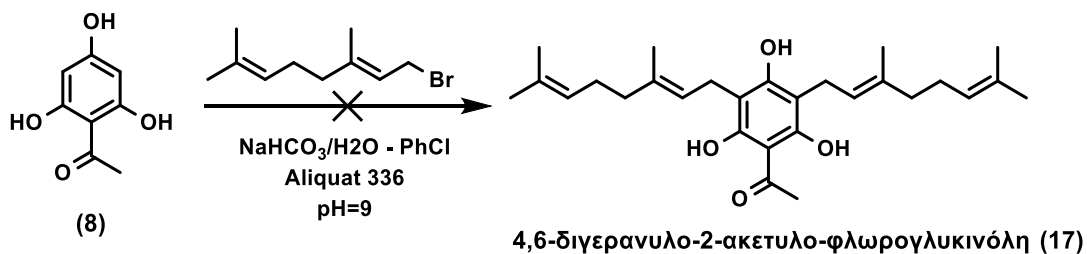
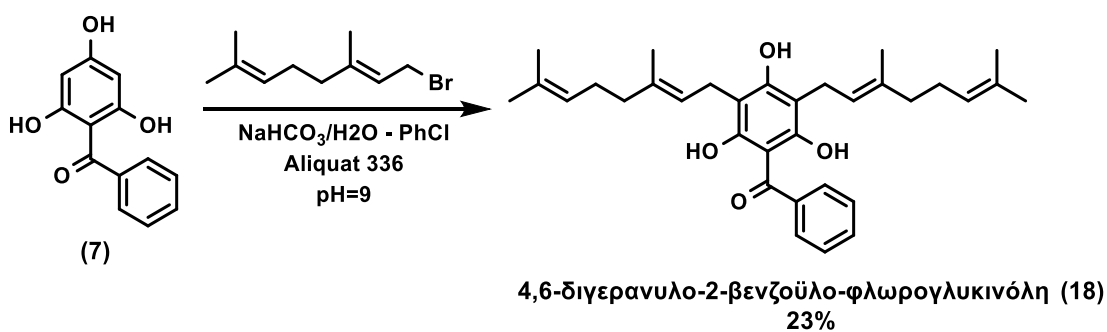
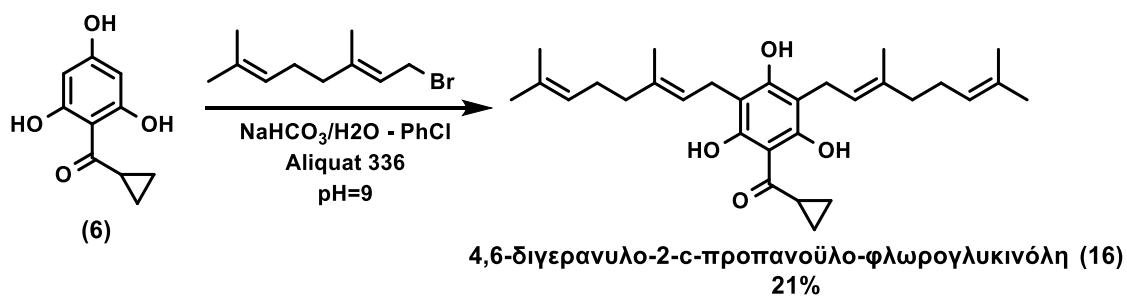
Σε αντιστοιχία με τα πρενυλιωμένα παράγωγα της (5), με τη χρήση γερανυλοβρωμιδίου, ανάλογα με τα ισοδύναμά του, το σύστημα διαλύτη/βάσης και τις τιμές pH, παρατηρήθηκε διαφορετικός βαθμός υποκατάστασης. Στον Πίνακα 3.5. συσχετίζεται το pH των αντιδράσεων σύνθεσης των γερανυλιωμένων παραγώγων με το βαθμό υποκατάστασης της (5).

**Πίνακας 3.5.** Συσχέτιση των γερανυλιωμένων παραγώγων της (5) με το pH της αντίδρασης.

Γερανυλιωμένο παράγωγο	pH
(19) δι-	9
(20) τρι-	12
(21) τέτρα-	13-14

Για τη σύνθεση της **4,6-διγερανυλο-2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (16)** και της **4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλης (18)** εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης με αυτές για την παρασκευή της ένωσης (19), χρησιμοποιώντας την 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6) και 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (7) αντίστοιχα. Η απόδοση της αντίδρασης για τη (16) ήταν 21% και για τη (18) 23%. Σε κάθε περίπτωση η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διφασικό σύστημα χλωροβενζολίου-νερού, με καταλύτη μεταφοράς φάσης Aliquat 336, βάση NaHCO<sub>3</sub> (pH=9) και με 1.5 ισοδύναμο γερανυλοβρωμιδίου. Εντούτοις, η σύνθεση της 4,6-

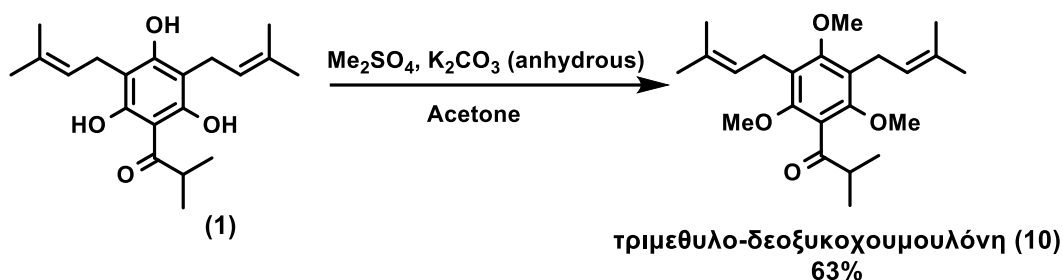
διγερανυλο-2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλης (17) δεν επιτεύχθηκε στις ίδιες συνθήκες (Σχήμα 3.30.).



Σχήμα 3.30. Σύνθεση διγερανυλιωμένων παραγώγων ακυλοφλωρογλυκινόλων.

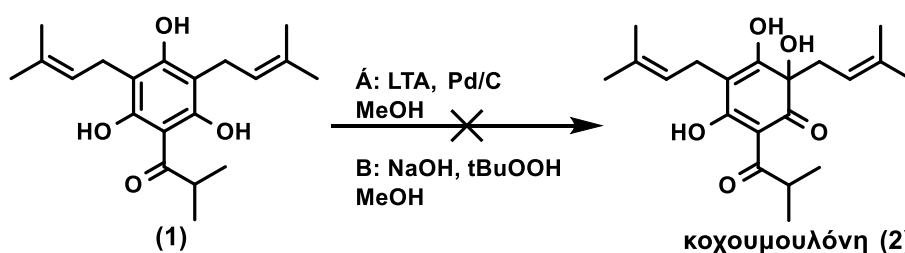
### Γ.2.6. Παραγοντοποίηση της δεοξυκοχουμουλόνης (1)

Κατά την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής, κρίθηκε απαραίτητη η εισαγωγή μεθυλομάδων στην (1) για τον έλεγχο της επίδρασης των ελεύθερων υδροξυλομάδων στην προνομφοκτόνο δράση. Ο σχηματισμός της **τριμεθυλο-δεοξυκοχουμουλόνης (10)**, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μεθυλιωτικού  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  σε διάλυμα της (1) σε ακετόνη με  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (Σχήμα 3.31.). Η απόδοση της μεθυλίωσης ήταν 63%.



Σχήμα 3.31. Σύνθεση της τριμεθυλο-δεοξυκοχουμουλόνης (10).

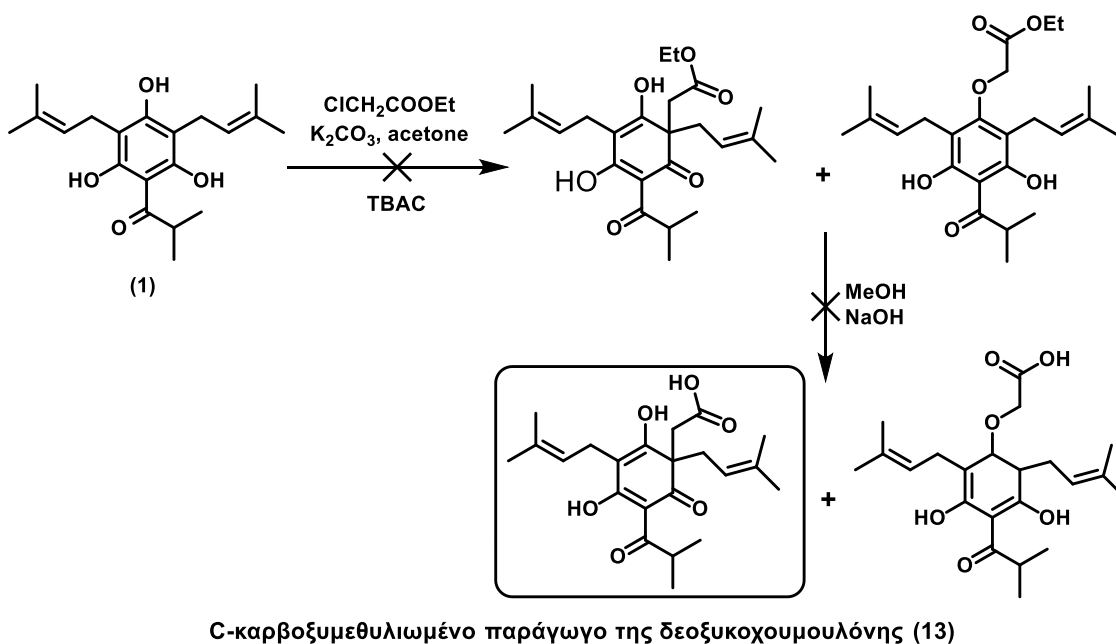
Παράλληλα, η παραγοντοποίηση της δεοξυκοχουμουλόνης (1) με σκοπό της αύξηση της πολικότητας της, οδήγησε σε αντιδράσεις για τη σύνθεση του ρακεμικού μίγματος της **κοχουμουλόνης (2)**. Πραγματοποιήθηκαν δύο μέθοδοι της βιβλιογραφίας, (Α) με διάλυση της (1) σε μεθανόλη ( $\text{MeOH}$ ), προσθήκη οξικού μολύβδου (IV) (LTA) και καταλυτική ποσότητα 10% Pd/C και (Β) με διάλυση της (1) σε  $\text{MeOH}$ , προσθήκη  $\text{NaOH}$  και  $t\text{BuOOH}$  (*tert*-Butyl hydroperoxide) (Σχήμα 3.32). Καμία μέθοδος δεν έδωσε την επιθυμητή (2).



Σχήμα 3.32. Αδυναμία σύνθεσης της κοχουμουλόνης (2).

Στα πλαίσια σύνθεσης πιο πολικών μορίων από τη δεοξυκοχουμουλόνη (1), έγινε η προσπάθεια σύνθεσης του **C-καρβοξυμεθυλιωμένου παραγώγου της δεοξυκοχουμουλόνης (13)**, βάσει της μελέτης των Gartner et al., 2004 σχετικά με την αύξηση της πολικότητας της υπερφορίνης. Στη μελέτη αυτή, η προσθήκη της καρβοξυμεθυλομάδας, οδήγησε στη σύνθεση της αριστοφορίνης. Το μόριο αυτό είναι

πολικότερο από την υπερφορίνη, με μεγαλύτερη διαλυτότητα και σταθερότητα σε υδατικά διαλύματα και εξίσου αποτελεσματικό όσον αφορά την αντικαρκινική δράση. Έτσι λοιπόν, έγινε η προσπάθεια σύνθεσης του C-καρβοξυμεθυλιωμένου παραγώγου (13), με διάλυση της (1) σε ακετόνη και προσθήκη  $K_2CO_3$  και  $ClCH_2COOEt$  (ethylchloroacetate). Λόγω της αδυναμίας σχηματισμού προϊόντων, προστέθηκε TBAC. Μετά την επεξεργασία του μίγματος, η εικόνα της αντίδρασης άλλαξε, χωρίς τη δυνατότητα απομόνωσης των εστέρων, τη σαπωνοποίησή τους και την παραλαβή της επιθυμητής (13) (Σχήμα 3.33).



**Σχήμα 3.33.** Αδυναμία σύνθεσης του C-καρβοξυμεθυλιωμένου παραγώγου της δεοξυκοχουμουλόνης (13).

### Γ.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΚΥΛΟΦΛΩΡΟΓΛΥΚΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΡΟΝΥΜΦΕΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Culex pipiens*

#### Γ.3.1. Σταστική Ανάλυση

Με την Probit ανάλυση πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία των δεδομένων της θνησιμότητας των προνυμφών στις 24 ώρες για κάθε ένωση που δοκιμάστηκε η δράση της έναντι των προνυμφών, δηλαδή η συνολική θνησιμότητα για κάθε δοκιμαζόμενη συγκέντρωση στο υδατικό διάλυμα (δόση) εκφρασμένη σε mg ουσίας ανά 1 λίτρο υδατικού διαλύματος (ή ppm). Με την Probit ανάλυση, η σιγμοειδής καμπύλη της θνησιμότητας μετατρέπεται σε ευθεία μετά από μετατροπή των ποσοστών θνησιμότητας σε Probit μονάδες και των δόσεων σε  $\log_{10}$ . Από την Probit ανάλυση υπολογίστηκαν οι τιμές των  $LC_{50}$  (Lethal Concentration<sub>50</sub>, συγκέντρωση ένωσης η οποία θανατώνει το 50% του πληθυσμού των προνυμφών) και  $LC_{90}$  (Lethal Concentration<sub>90</sub>, συγκέντρωση ένωσης η οποία θανατώνει το 90% του πληθυσμού των προνυμφών), τα όρια εμπιστοσύνης (Confidential Limits-CL) για κάθε τιμή  $LC_{50}$  ή  $LC_{90}$  για επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$ , καθώς επίσης και οι κλίσεις των ευθειών (slopes) (Finney, 1971). Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS version 14.0 (SPSS 2004).

#### Γ.3.2. Τοξική Δράση

Στον Πίνακα 3.6. παρουσιάζονται οι τιμές  $LC_{50}$  και  $LC_{90}$  για τη φλωρογλυκινόλη (4), τις ακυλιωμένες φλωρογλυκινόλες (5), (6), (7) και (8) και τα παράγωγα αυτών (1), (3), (10), (14), (15), (16), (18), (19), τα όρια εμπιστοσύνης, για κάθε τιμή  $LC_{50}$  και  $LC_{90}$  για επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$ , καθώς επίσης και οι κλίσεις των ευθειών (slopes), για προνύμφες 3<sup>ης</sup>-4<sup>ης</sup> ηλικίας του είδους *Culex pipiens*. Στατιστική διαφορά μεταξύ δύο διαφορετικών ενώσεων υπάρχει όταν τα όρια εμπιστοσύνης των αντίστοιχων τιμών  $LC_{50}$  και  $LC_{90}$  δεν επικαλύπτονται μεταξύ τους. Από τις ενώσεις των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα, η φλωρογλυκινόλη (4) και τα ακυλιωμένα παράγωγά της, 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (5), 2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6), 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (7), 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8) δεν είχαν τοξική δράση, καθώς για τη θνησιμότητα του 50% των προνυμφών απαιτήθηκαν δόσεις μεγαλύτερες από 150 mg/L.

**Πίνακας 3.6.** Τιμές των δεικτών LC<sub>50</sub> και LC<sub>90</sub> για τις ενώσεις των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα σε προνύμφες 3<sup>ης</sup>-4<sup>ης</sup> ηλικίας του είδους *Culex pipiens*.

Ένωση	LC <sub>50</sub> (95% CL) <sup>α</sup>	LC <sub>90</sub> (95% CL) <sup>α</sup>	Κλίση ευθείας (±Τ.Σ.)	χ <sup>2β</sup>	Β.Ε.	P
(4)	>150	-	-	-	-	-
(5)	>150	-	-	-	-	-
(6)	>150	-	-	-	-	-
(7)	>150	-	-	-	-	-
(8)	>150	-	-	-	-	-
(1)	43.7 (35.9-49.4)	77.4 (65.6-113.1)	5.2±0.8	41.82	21	0.004
(3)	19.7 (17.1-22.5)	34.5 (28.9-46.7)	5.2±0.4	113.187	26	0.00001
(10)	>150	-	-	-	-	-
(14)	>150	-	-	-	-	-
(15)	139.9 (119.1-215.5)	311.6 (206.9-1450.9)	3.7±1.1	15.505	17	0.559
(16)	17.1 (12.3-21)	35.9 (28.6-56.8)	3.9±0.4	125.459	25	0.00001
(18)	22.9 (20.9-24.9)	44.8 (39.1-54.6)	4.4±0.5	21.584	18	0.251
(19)	28.4 (25.6-31.4)	74.1 (63.3-91)	3.1±0.3	22.108	22	0.453

<sup>α</sup> Οι τιμές LC εκφράζονται σε mg/L και υπάρχει μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν τα όρια εμπιστοσύνης (CL) για το επίπεδο σημαντικότητας α=0.05 (95%) δεν επικαλύπτονται.

<sup>β</sup> Από την στιγμή που η καλή προσαρμογή των δοκιμών είναι σημαντική (P<0.05), ένας παράγοντας ετερογένειας χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης (CL).

Η προνυμφοκτόνος δράση της δεοξυκοχουμουλόνης (1) αξιολογήθηκε για πρώτη φορά (Mitsoroulou et al., 2014) σε προνύμφες του *Culex ripiens*, 3<sup>ns</sup>-4<sup>ns</sup> ηλικίας, στο Εργαστήριο Γεωργική Εντομολογίας του Μπεννακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου το 2014 και η τιμή LC<sub>50</sub> 51.03 mg/L (95% CL 40.95–60.73) συμφωνεί με την τιμή LC<sub>50</sub> 43.7 mg/L που βρέθηκε στο ίδιο εργαστήριο, με τις ίδιες συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων στην εργασία αυτή με την τοξικότητα να είναι παρόμοια. Το τριμεθυλιωμένο παράγωγο της δεοξυκοχουμουλόνης (10), με τιμή LC<sub>50</sub>>150, δεν έδειξε προνυμφοκτόνο δράση. Μεταξύ των ενώσεων που δοκιμάστηκαν η κολουπουλόνη (3) βρέθηκε ότι ήταν τοξική με τιμή LC<sub>50</sub> ίση με 19.7 mg/L και LC<sub>90</sub> 34.5 mg/L, εν αντιθέσει με την κολουπόνη (14), η οποία δεν είχε τοξική δράση (LC<sub>50</sub>>150). Το ανάλογο της κολουπόνης (15) εμφάνισε τοξική δράση στις προνύμφες με τιμή LC<sub>50</sub> 139.9 mg/L και LC<sub>90</sub> 311.6 mg/L. Η 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19), είχε πολύ υψηλότερη τοξικότητα σε σχέση με την δεοξυκοχουμουλόνη με τιμή LC<sub>50</sub> 28.4 mg/L και LC<sub>90</sub> 74.1 mg/L. Οι 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (16) και 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (18) είναι οι πλέον τοξικές μαζί με την κολουπουλόνη (3). Η τιμή LC<sub>50</sub> της 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (16) είναι 17.1 mg/L και η LC<sub>90</sub> 35.9 mg/L και στην περίπτωση της 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλης (18) η τιμή LC<sub>50</sub> είναι 22.9 mg/L και LC<sub>90</sub> 44.8 mg/L.

### Γ.3.3. Συμπεράσματα Βιοδοκιμών

Η βιολογική δράση του συνόλου των ενώσεων επί των προνυμφών του είδους *Culex ripiens*, με την εφαρμογή τους στο νερό, ήταν δοσο-εξαρτημένη, δηλαδή η αύξηση των δόσεων προκαλούσε αυξημένη θνησιμότητα στις προνύμφες των κουνουπιών.

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης προέκυψε ότι το φυσικό προϊόν κολουπουλόνη (3), η 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (16) και η 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (18) εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση μετά από 24 ώρες έκθεσης, με τιμές LC<sub>50</sub> 19.7 mg/L, 17.1 mg/L και 22.9 mg/L, αντίστοιχα. Οι τιμές LC<sub>50</sub> δεν έχουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντική διαφορά καθώς τα όρια εμπιστοσύνης (CL) για επίπεδο σημαντικότητας α=0.05 (95%) επικαλύπτονται. Η προνυμφοκτόνος δράση των ενώσεων αυτών είναι διπλάσια σε σχέση με εκείνη της δεοξυκοχουμουλόνης (1) με LC<sub>50</sub> 43.7 mg/L βάσει της οποίας έγινε η μελέτη.

Σημαντική προνυμφοκτόνο δράση σημείωσε επίσης η 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19) με LC<sub>50</sub> 28.4 mg/L, με πολύ υψηλότερη τοξικότητα σε σχέση με την δεοξυκοχουμουλόνη (1). Η δράση του αναλόγου της κολουπόνης (15)



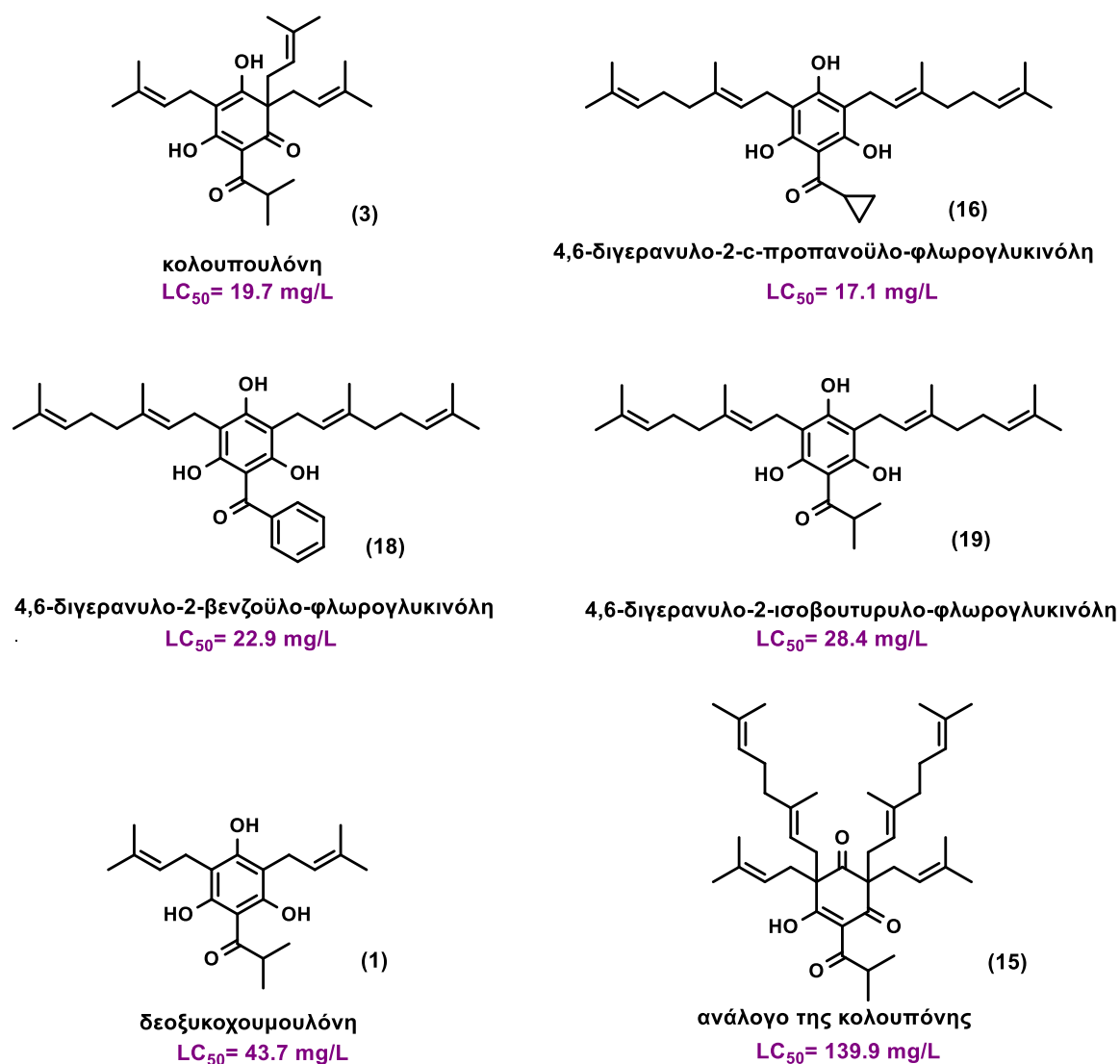
ήταν ασθενέστερη από την δεοξυκοχομουλόνη (1) αλλά ικανοποιητική, με τιμή  $LC_{50}$  139.9 mg/L. Η τριμεθυλο-δεοξυκοχομουλόνη (10) και η κολουπόνη (14) δεν εμφάνισαν τοξική δράση σε προνύμφες. Ομοίως η φλωρογλυκινόλη (4) και τα ακυλιωμένα παράγωγά της.

Η ακυλίωση της φλωρογλυκινόλης (4) δεν επηρεάζει τη τοξικότητά της, καθώς για τη θνησιμότητα του 50% των προνυμφών απαιτήθηκαν δόσεις μεγαλύτερες από 150 mg/L. Σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των C-ακυλιωμένων ακυλοφλωρογλυκινολών παίζει η ύπαρξη ελεύθερης υδροξυλομάδας. Το τριμεθυλιωμένο παράγωγο της δεοξυκοχομουλόνης, με τιμή  $LC_{50} > 150$ , δεν έδειξε προνυμφοκτόνο δράση, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η ύπαρξη ελεύθερης υδροξυλικής ομάδας ενισχύει την προνυμφοκτόνο δράση των μορίων αυτών έναντι προνυμφών του είδους *Culex riparius*. Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να είναι σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες, οι οποίες αφορούν άλλα φυσικά προϊόντα όπως η αλκαννίνη, η σικονίνη, η υπερφορίνη και η κουρκουμίνη, όπου ομοίως η δράση επηρεάζεται από την απουσία του υδροξυλίου (Michaelakis et al., 2009b; Sagnou et al., 2012; Mitsopoulou et al., 2014).

Η κολουπουλόνη (3) με την ισχυρή προνυμφοκτόνο δράση της, συγκριτικά με την δεοξυκοχομουλόνη (1), έχει μεγαλύτερη πολικότητα και διαθέτει μία επιπλέον πρενυλομάδα και κατ' επέκταση το μόριο δεν είναι αρωματικό. Είναι ένα β-πικρό οξύ, συστατικό του λυκίσκου (*Humulus lupulus*), που εκκρίνεται από τους λουπουλινικούς αδένες του και ως φυσικό προϊόν αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση για την αντιμετώπιση των κουνουπιών, πιο φιλική στο περιβάλλον μιας και συχνά έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής από τα συνθετικά εντομοκτόνα, βιοαποικοδομούνται, οδηγώντας σε μικρότερο περιβαλλοντικό αντίκτυπο.

Το ανάλογο της κολουπόνης (15) εμφάνισε τοξική δράση σε αντίθεση με την κολουπόνη (14), επομένως η τοξικότητα οφείλεται στην αντικατάσταση των δύο πρενυλομάδων από δύο γερανυλομάδες. Η C-γερανυλίωση λοιπόν, αυξάνει την τοξικότητα και γι' αυτό το λόγο συντέθηκαν διγερανυλιωμένα παράγωγα ακυλοφλωρογλυκινολών και δοκιμάστηκε η προνυμφοκτόνος δράση τους. Όντως, τα τρία διγερανυλιωμένα παράγωγα εμφάνισαν υψηλή προνυμφοκτόνο δράση. Η 4,6-διγερανυλο-2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (16) και η 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη εμφάνισαν την υψηλότερη τοξική δράση μαζί την κολουπουλόνη (3) και ακολούθησε η 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυροϋλο-φλωρογλυκινόλη (19) όσον αφορά τη δραστηριότητα. Η ακυλομάδα όπως φαίνεται διαδραματίζει ρόλο στην τοξικότητα αλλά όχι καθοριστικό.

Στην Εικόνα 3.5. απεικονίζονται οι δομές με την υψηλότερη τοξική δράση από τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν σε προνύμφες, με τις ενώσεις (3), (16), και (18) να είναι οι πιο τοξικές και ακολουθεί η (19), έπειτα η (1) και τέλος η (15).



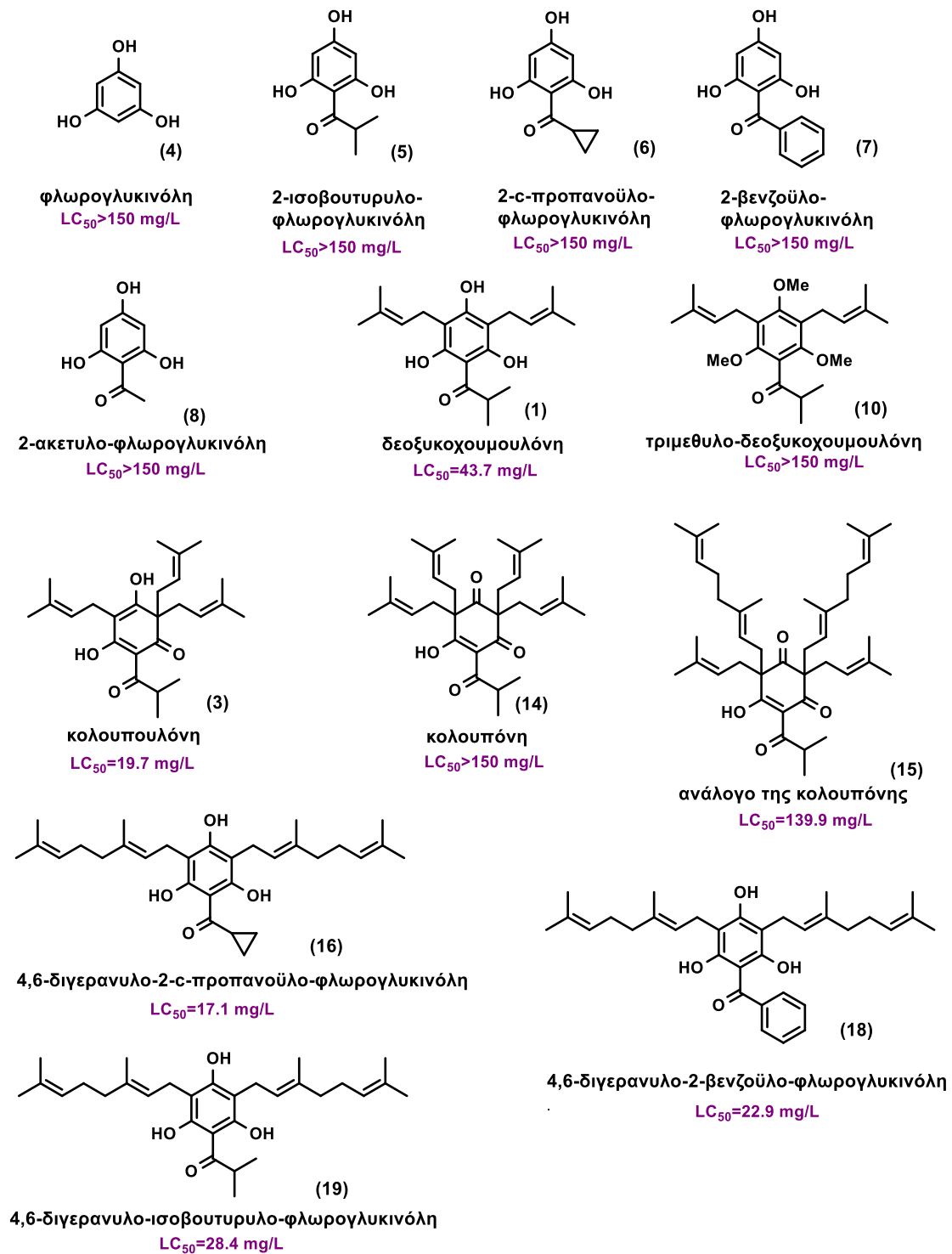
**Εικόνα 3.5.** Δομές ενώσεων με τις τιμές LC<sub>50</sub> που επέδειξαν τοξική δράση σε προνύμφες του είδους *Culex ripiens*.

#### Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η επιστημονική κοινότητα οφείλει να εστιάσει στην ανάπτυξη νέων μεθόδων και νέων, ασφαλέστερων εντομοκτόνων πιο φιλικών στον πλανήτη. Η ανάγκη για νέα εντομοκτόνα, λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας, οικοτοξικότητας και ασφάλειας για την ανθρώπινη υγεία, οδηγεί την έρευνα στη σύνθεση εντομοκτόνων φυσικής προέλευσης. Έτσι, η σύνθεση, η μελέτη και η αξιοποίηση φυσικών προϊόντων με εντομοκτόνο δράση αποτελεί πρωταρχικό στόχο και η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε βάσει αυτής της προσέγγισης. Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση παραγώγων ακυλοφλωρογλυκινολών για τη διερεύνηση της τοξικότητας τους έναντι των προνυμφών του είδους *Culex ripiens* και τη συσχέτιση της δομής με τη δράση τους.

Όσον αφορά τη σύνθεση των ακυλιωμένων φλωρογλυκινολών παρατηρήθηκε πως η σταθερότητα των μορίων επηρεάζεται σε ισχυρά αλκαλικές συνθήκες, για να εξαχθούν όμως ασφαλή συμπεράσματα είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη. Σχετικά με την σύνθεση των πρενυλιωμένων και γερανυλιωμένων παραγώγων της 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5), οι αλλαγές στο pH οδηγούν σε διαφορετικό βαθμό υποκατάστασης, με την αύξηση του pH να οδηγεί στην προσθήκη περισσότερων αλυσίδων στο μόριο. Οι ενώσεις που συντέθηκαν στο Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα στο Εργαστήριο Γεωργικής Εντομολογίας του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 4.1.).

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης προέκυψε ότι η κολουπουλόνη (3) καθώς και τα διγερανυλιωμένα παράγωγα (16) και (18) εμφάνισαν την ισχυρότερη δράση μετά από 24 ώρες έκθεσης σε προνύμφες του είδους *Culex ripiens* με τιμές  $LC_{50}$  19.7 mg/L, 17.1 mg/L και 22.9 mg/L, αντίστοιχα. Σημειώνεται πως το φυσικό προϊόν κολουπουλόνη (3) χαρακτηρίζεται από απώλεια της αρωματικότητας σε σχέση με τη δεοξυκοχουμουλόνη (1), είναι πιο πολικό και διαθέτει μία επιπλέον πρενυλική αλυσίδα. Επιπλέον, είναι η πρώτη φορά που διαπιστώνεται η προνυμφοκτόνος δράση της ένωσης σε οποιοδήποτε είδος κουνουπιού. Σημαντική προνυμφοκτόνο δράση σημείωσε επίσης, η 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19) με  $LC_{50}$  28.4mg/L. Η ύπαρξη υδροξυλικής ομάδας φαίνεται να ενισχύει την προνυμφοκτόνο δράση των μορίων αυτών έναντι των προνυμφών του είδους *Culex ripiens*. Επιπλέον, η ύπαρξη πρενυλικών ή γερανυλικών αλυσίδων είναι απαραίτητη, καθώς τα ακυλιωμένα παράγωγα δεν είναι τοξικά. Στις ακυλιωμένες ακυλοφλωρογλυκινόλες οι ακυλομάδες δεν παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προνυμφοκτόνο δράση, εν αντιθέσει με τη C-γερανυλίωση η οποία αυξάνει δραματικά τη δραστηριότητα των ενώσεων.



Εικόνα 4.1. Χημικές δομές ενώσεων των οποίων διερευνήθηκε η τοξικότητα με τις τιμές  $LC_{50}$ .

## Ε. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Οι ενώσεις κολουπουλόνη (3), 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (16), 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (18) και 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19) έδειξαν αποτελεσματικότητα εναντίον των προνυμφών του είδους *Culex ripiens* και η διερεύνηση της τοξικότητας αυτών σε συνδυασμό με PBO για την περαιτέρω αύξηση της δράσης τους, καθώς και η εκτέλεση βιοδοκιμών έναντι των προνυμφών του *Aedes albopictus*, ενός κύριου διαβιβαστή αρμποιών που κυκλοφορεί στην Ελλάδα, αποτελεί μελλοντική επιδίωξη.

Στα πλαίσια της οικολογικής και αποτελεσματικής αντιμετώπισης του είδους *Culex ripiens*, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η προνυμφοκτόνος δράση εκχυλισμάτων του λυκίσκου (*Humulus lupulus*), ο οποίος είναι αυτοφυής στην Ελλάδα αλλά και των συστατικών του και να συγκριθούν με αυτήν της κολουπουλόνης (3).

Η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης, που εμπλέκονται στην προνυμφοκτόνο ικανότητα των ενώσεων αυτών, καθώς και η πραγματοποίηση μελετών του τοξικολογικού τους προφίλ στον άνθρωπο, αλλά και η ανάπτυξη μεθόδων που θα βελτιώσουν την αποτελεσματικότητά τους είναι απαραίτητα, όπως ο εγκλεισμός τους σε μικροκάψουλες για βραδεία αποδέσμευση, λόγω της ευαισθησίας τους.

Η διερεύνηση της τοξικότητας της κοχουμουλόνης (2), των δι-/τρι-πρενυλιωμένων και τριγερανυλιωμένων παραγώγων των ακυλοφλωρογλυκινολών και της 4,6-διγερανυλο-2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλης (17), ύστερα από τη διευκρίνιση των συνθηκών σύνθεσής τους, αποτελεί μελλοντικό στόχο.

Τέλος, επιδίωξη του Εργαστηρίου Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας αποτελεί η σύνθεση ακυλοφλωρογλυκινολών με διαφορετικούς ακυλο-υποκαταστάτες και η περαιτέρω πρενυλίωση και γερανυλίωση αυτών για τον σχηματισμό των δι-/τρι-γερανυλιωμένων και δι-/τρι-πρενυλιωμένων παραγώγων τους, αλλά και η C-αλκυλίωση αυτών με φαρνεσυλομάδες ή άλλες ομάδες για τον έλεγχο της προνυμφοκτόνου δράσης τους.

## ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bartlow, A. W., Manore, C., Xu, C., Kaufeld, K. A., Del Valle, S., Ziemann, A., Fairchild, G., & Fair, J. M. (2019). Forecasting Zoonotic Infectious Disease Response to Climate Change: Mosquito Vectors and a Changing Environment. *Veterinary Sciences*, 6(2), 40. doi:10.3390/vetsci6020040

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control*, 2<sup>nd</sup> ed. Berlin; Heidelberg: Springer.

Beleri, S., Chatzinikolaou, S., Nearchou, A., & Patsoula, E. (2017). Entomological study of the mosquito fauna in the regional unit of Drama, Region of East Macedonia-Thrace, Greece (2015 to 2016). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(9), 665-671. doi:10.1089/vbz.2017.2113

Bellini, R., Veronesi, R., Rizzoli, M. (1994). Efficacy of various fish species (*Carassius auratus* [L], *Cyprinus carpio* [L], *Gambusia affinis* [Baird and Girard]) in the control of rice field mosquitoes in Northern Italy. *Bull Soc Vet Ecol* ,19(2), 87–99.

Bentley, M. D., & Day, J. F. (1989). Chemical Ecology and Behavioral Aspects of Mosquito Oviposition. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 401–421. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.002153

Berenger, J. M., & Parola, P. (2017). Arthropod vectors of medical importance. In C. Jonathan, W. G. Powderly, & S. M. Opal (Eds.), *Infectious diseases*, 4<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier.

Bonds, J. A. S. (2012). Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: A critical review. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(2), 121-130. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00992.x

Boubakir, Z., Beuerle, T., Liu B., & Beerhues, L. (2005). The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry*, 66(1), 51–57. doi:10.1016/j.phytochem.2004.10.020

Brugman, V. A., Hernandez-Triana, L. M., Medlock, J. M., Fooks, A. R., Carpenter, S., & Johnson, N. (2018). The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus

transmission in Europe. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(2). doi:10.3390/ijerph15020389

Burrows, A., Holman, J., Parsons, A., Pilling, G., & Price, G. (2013). *Chemistry<sup>3</sup>: Introducing Inorganic, Organic and Physical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press.

Buszewski, B., Bukowska, M., Ligor, M., & Staneczko-Baranowska, I. (2019). A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides-properties, applications, occurrence, and analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), 34723-34740. doi:10.1007/s11356-019-06114-w

Carson, R. (1997). Rachel Carson. Witness for nature - Lear, L. *Science*, 278(5345), 1897-1897.

Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S. N., & Ghosh, A. (2008). Mosquito control by larvivorous fish. *Indian Journal of Medical Research*, 127(1), 13-27.

Chapman, R. F. (1998). *The insects: Structure and function*, 4<sup>th</sup> ed. Cambridge; New York: Cambridge University Press.

Chastel, C. (2009). Lessons from the Greek Dengue epidemic of 1927-1928. *Bulletin De L Academie Nationale De Medecine*, 193(2), 485-493. doi:10.1016/s0001-4079(19)32598-1

Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., & Wothers, P. (2000). *Organic Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed. New York: Oxford University Press.

Coats, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity-relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 255-262. doi:10.2307/3431033

Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., & Vermandere, J. P. (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(3), 387-395. doi:10.1007/s00244-004-3052-y

Crans, W. J. (1989). Resting boxes as mosquito surveillance tools. In *Proceedings presented at the Eighty-Second Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association*.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: John Wiley and Sons.

Dieme, C., Bechah, Y., Socolovschi, C., Audoly, G., Berenger, J. M., Faye, O., Raoult, D., & Parola, P. (2015). Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8088-8093. doi:10.1073/pnas.1413835112

Duke, S. O., Cantrell, C. L., Meepagala, K. M., Wedge, D. E., Tabanca, N., & Schrader, K. K. (2010). Natural toxins for use in pest management. *Toxins*, 2(8), 1943-1962. doi:10.3390/toxins2081943

Dyck, V. A., Hendrichs, J., & Robinson, A. S. (2005). *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Dordrecht: Springer.

Fang, J. (2010). A world without mosquitoes. *Nature*, 466(7305), 432-434. doi:10.1038/466432a

Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D., & Kilpatrick, A. M. (2011). "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in Epidemiology. *Infection Genetics and Evolution*, 11(7), 1577-1585. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.013

Finney, D. (1971). *Probit Analysis*, 3<sup>rd</sup> ed. London: Cambridge University Press.

Foster, W. A., & Walker, E. D. (2019). Mosquitoes (Culicidae). In G.R. Mullen, L.A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*, 3<sup>rd</sup> ed. (pp. 261-325). Burlington: Academic Press. doi:10.1016/b978-0-12-814043-7.00015-7

Gartner, M., Müller, T., Simon, J. C., Giannis, A., & Sleeman, J. P. (2004). Aristoforin, a Novel Stable Derivative of Hyperforin, Is a Potent Anticancer Agent. *ChemBioChem*, 6(1), 171–177. doi:10.1002/cbic.200400195

Goese, M., Kammhuber, K., Bacher, A., Zenk, M. H., & Eisenreich, W. (1999). Biosynthesis of bitter acids in hops. A 13C-NMR and 2H-NMR study on the building



blocks of humulone. *European Journal of Biochemistry*, 263(2), 447–454. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00518.x

Gomes, B., Kioulos, E., Papa, A., Almeida, A. P. G., Vontas, J., & Pinto, J. (2013). Distribution and hybridization of *Culex pipiens* forms in Greece during the West Nile virus outbreak of 2010. *Infection Genetics and Evolution*, 16, 218-225. doi:10.1016/j.meegid.2013.02.006

Gould, E. A., & Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, 371(9611), 500-509. doi:10.1016/s0140-6736(08)60238-x

Hallem, E. A., Fox, A. N., Zwiebel, L. J., & Carlson, J. R. (2004). Olfaction - Mosquito receptor for human-sweat odorant. *Nature*, 427(6971), 212-213. doi:10.1038/427212a

Harbach, R. E. (2008). Family Culicidae Meigen, 1818. In *Mosquito Taxonomic Inventory*. Retrieved from <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/family-culicidae-meigen-1818>

Hoddle, M. S. (2004). Restoring balance: Using exotic species to control invasive exotic species. *Conservation Biology*, 18(1), 38-49. doi:10.1111/j.1523-1739.2004.00249.x

Jeschke & Nauen. (2010). Neonicotinoid insecticides. In L. I. Gilbert, & S. Gill (Eds.), *Insect control: Biological and synthetic agents*, 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press.

Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2016). Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 542-567. doi:10.1111/1541-4337.12201

Kent, R. J., Harrington, L. C., & Norris, D. E. (2007). Genetic differences between *Culex pipiens* f. *molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 50-59. doi:10.1603/0022-2585(2007)44[50:gdbcpf]2.0.co;2

Kishore, N., Mishra, B. B., Tiwari, V. K., Tripathi, V., & Lall, N. (2014). Natural products as leads to potential mosquitocides. *Phytochemistry Reviews*, 13(3), 587-627. doi:10.1007/s11101-013-9316-2

Kling, L. J., Juliano, S. A., & Yee, D. A. (2007). Larval mosquito communities in discarded vehicle tires in a forested and unforested site: Detritus type, amount, and water nutrient differences. *Journal of Vector Ecology*, 32(2), 207-217. doi:10.3376/1081-1710(2007)32[207:lmcidv]2.0.co;2

Kumar, R., & Hwang, J. S. (2006). Larvicidal efficiency of aquatic predators: A perspective for mosquito biocontrol. *Zoological Studies*, 45(4), 447-466.

Liu, W. L., Zhang, J. F., Hashim, J. H., Jalaludin, J., Hashim, Z., & Goldstein, B. D. (2003). Mosquito coil emissions and health implications. *Environmental Health Perspectives*, 111(12), 1454-1460. doi:10.1289/ehp.6286

Loomis, D., Guyton, K., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., & Int Agcy Res Canc Monograph, W. (2015). Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncology*, 16(8), 891-892. doi:10.1016/s1470-2045(15)00081-9

Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., & Petersen, L. R. (2004). Emerging flaviviruses: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and Dengue viruses. *Nature Medicine*, 10(12), S98-S109. doi:10.1038/nm1144

McMurry, J. E. (1995). *Organic chemistry*, 4<sup>th</sup> ed. Pacific Grove: Brooks-Cole.

Michaelakis, A., Mihou, A. P., Couladouros, E. A., Zounos, A. K., & Koliopoulos, G. (2005). Oviposition responses of *Culex pipiens* to a synthetic racemic *Culex quinquefasciatus* oviposition aggregation pheromone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5225-5229. doi:10.1021/jf0504871

Michaelakis, A., Mihou, A. P., Koliopoulos, G., & Couladouros, E. A. (2007). Attract-and-kill strategy. Laboratory studies on hatched larvae of *Culex pipiens*. *Pest Management Science*, 63(10), 954-959. doi:10.1002/ps.1418

Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A., & Polissiou, M. G. (2009a). Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 105(3), 769-773. doi:10.1007/s00436-009-1452-7

Michaelakis, A., Strongilos, A. T., Bouzas, E. A., Koliopoulos, G., & Couladouros, E. A. (2009b). Larvicidal activity of naturally occurring naphthoquinones and derivatives

against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 104(3), 657-662. doi:10.1007/s00436-008-1242-7

Mitsopoulou, K. P., Vidali, V. P., Koliopoulos, G., Couladouros, E. A., & Michaelakis, A. (2014). Hyperforin and deoxycohumulone as a larvicidal agent against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Chemosphere*, 100, 124–129. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.11.073

Mizobuchi, S., & Sato, Y. (1985). Antifungal activities of hop bitter resins and related-compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(2), 399-403. doi:10.1080/00021369.1985.10866749

Mongelli, E., Coussio, J., & Ciccia, G. (2002). Investigation of the larvicidal activity of *Pothomorphe peltata* and isolation of the active constituent. *Phytotherapy Research*, 16, S71-S72. doi:10.1002/ptr.753

Mori, K. (2000). Organic Synthesis and Chemical Ecology. *Accounts of Chemical Research*, 33(2), 102-110. doi:10.1021/ar990006x

Nolan, T., Papathanos, P., Windbichler, N., Magnusson, K., Benton, J., Catteruccia, F., & Crisanti, A. (2011). Developing transgenic *Anopheles* mosquitoes for the Sterile Insect Technique. *Genetica*, 139(1), 33-39. doi:10.1007/s10709-010-9482-8

Novak, R. J., & Lampman, R. L. (2010). Public health pesticides. In R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, 3<sup>rd</sup> ed. (pp. 231-256). San Diego: Academic Press/Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-374367-1.00004-5

Paixao, E. S., Teixeira, M. G., & Rodrigues, L. C. (2018). Zika, Chikungunya and Dengue: The causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. *Bmj Global Health*, 3. doi:10.1136/bmjgh-2017-000530

Palmer, W. E., Bromley, P. T., & Brandenburg, R. L. (2007). *Wildlife & pesticides - Peanuts*. North Carolina Cooperative Extension Service.

Papachristos, D. P., Karamanoli, K. I., Stamopoulos, D. C., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2004). The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Management Science*, 60(5), 514-520. doi:10.1002/ps.798

- Perlovskaya, O. R., Shilina, M. I., & Smirnov, V. V. (2001). Aluminium Chloride Complexes with Nitrobenzene: Low-Temperature Synthesis, Structure, and Stability. *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 27(7), 469–475. doi:10.1023/a:1011381330763
- Poopathi, S., & Abidha, S. (2010). Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 1(3), 22-38.
- Raghavendra, K., Sharma, P., & Dash, A. P. (2008). Biological control of mosquito populations through frogs: Opportunities & constrains. *Indian Journal of Medical Research*, 128(1), 22-25.
- Rappoport, Z. (2003). *The chemistry of phenols*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Ratnayake, R., Karunaratne, V., Bandara, B. M. R., Kumar, V., MacLeod, J. K., & Simmonds, P. (2001). Two new lactones with mosquito larvicidal activity from three *Hortonia* species. *Journal of Natural Products*, 64(3), 376-378. doi:10.1021/np000371t
- Ravichandra, N. G. (2018). *Agrochemicals in plant disease management*. India: Scientific Publishers.
- Reichardt, C., & Welton, T. (2010). *Solvents and solvent effects in Organic Chemistry*, 4<sup>th</sup> ed. Weinheim: Wiley-VCH.
- Reidenbach, K. R., Cook, S., Bertone, M. A., Harbach, R. E., Wiegmann, B. M., & Besansky, N. J. (2009). Phylogenetic analysis and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on nuclear genes and morphology. *BMC Evolutionary Biology*, 9. doi:10.1186/1471-2148-9-298
- Rozendaal, J. A. (1997). *Vector control: Methods for use by individuals and communities*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resources/vectoritoxiii.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vectoritoxiii.pdf)
- Sagnou, M., Mitsopoulou, K.P., Koliopoulos, G., Pelecanou, M., Couladouros, E.A. & Michaelakis, A. (2012). Evaluation of naturally occurring curcuminoids and related compounds against mosquito larvae. *Acta Tropica*, 123, 190-195. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.05.006.

- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G., & Vakalis, N.C. (2005). Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin*, 19, 10-12.
- Schaffner, F., & Mathis, A. (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European Region: Past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infectious Diseases*, 14(12), 1271-1280. doi:10.1016/s1473-3099(14)70834-5
- Severini, C., Romi, R., Marinucci, M., & Raymond, M. (1993). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9(2), 164-168.
- Shalan, E. A. S., & Canyon, D. V. (2009). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical Biomedicine*, 26(3), 223-261.
- Smith, M. B., & March, J. (2007). *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, mechanisms, and structure*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Interscience.
- Spanoudis, C. G., Andreadis, S. S., Tsaknis, N. K., Petrou, A. P., Gkeka, C. D., & Savopoulou-Soultani, M. (2019). Effect of temperature on biological parameters of the West Nile virus vector *Culex pipiens* form '*molestus*' (Diptera: Culicidae) in Greece: Constant vs fluctuating temperatures. *Journal of Medical Entomology*, 56(3), 641-650. doi:10.1093/jme/tjy224
- Spielman, A., & D'Antonio, M. (2001). *Mosquito: A natural history of our most persistent and deadly foe*. New York: Hyperion.
- Sriwichai, P., Karl, S., Samung, Y., Sumruayphol, S., Kiattibutr, K., Payakkapol, A., Mueller, I., Yan, G. Y., Cui, L. W., & Sattabongkot, J. (2015). Evaluation of CDC light traps for mosquito surveillance in a malaria endemic area on the Thai-Myanmar border. *Parasites & Vectors*, 8. doi:10.1186/s13071-015-1225-3
- Stahl, A. (2002). *The Health Effects of Pesticides Used for Mosquito Control*. A Report By Citizens Campaign for the Environment And Citizens Environmental Research Institute, New York. Retrieved from <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/mosquito/documents/citizensHealthEffectsMosqP.pdf>
- Stanforth, S. P. (2006). *Natural Product Chemistry at a glance*, Oxford: Blackwell.

Sukkanon, C., Yaicharoen, R., & Ngrenngamlert W. (2016). Comparative effectiveness of monomolecular surface film on *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles minimus* (Theobald) (Diptera: Culicidae). *Agriculture and Natural Resources*, 50(6), 465-469. doi:10.1016/j.anres.2016.07.003

Sukumaran, D. (2016). A review on use of attractants and traps for host seeking *Aedes aegypti* mosquitoes. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 7(3), 207-214.

Tabari, M. A., Youssefi, M. R., Esfandiari, A., & Benelli, G. (2017). Toxicity of  $\beta$ -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Research in Veterinary Science*, 114, 36–40. doi:10.1016/j.rvsc.2017.03.001

Takken, W., & van den Berg, H. (2019). *Manual on prevention of establishment and control of mosquitoes of public health importance in the WHO European Region (with special reference to invasive mosquitoes)*. Copenhagen: World Health Organization. Retrieved from [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0004/392998/mosquito-manual-eng.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/392998/mosquito-manual-eng.pdf?ua=1)

Tandina, F., Doumbo, O., Yaro, A. S., Traore, S. F., Parola, P., & Robert, V. (2018). Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and mosquito-borne diseases in Mali, West Africa. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-018-3045-8

Tetreau, G., Alessi, M., Veyrenc, S., Perigon, S., David, J. P., Reynaud, S., & Despres, L. (2012). Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* in the field: Evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8362-8367. doi:10.1128/aem.02088-12

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247–268., doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930

Tunaz H., & Uygun N., 2004. Insect Growth Regulators for insect pest control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 337-387.

Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., & Heyerick, A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products*, 72(6), 1220–1230. doi:10.1021/np800740m

Varmus, H., Klausner, R., Zerhouni, E., Acharya, T., Daar, A. S., & Singer, P. A. (2003). Grand challenges in Global Health. *Science*, 302(5644), 398-399. doi:10.1126/science.1091769

Vinogradova, E. B. (2000). *Culex pipiens pipiens mosquitoes: Taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control*. Sofia: Pensoft.

Walton, W. E. (2007). Larvivorous fish including *Gambusia*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(2), 184-220. doi:10.2987/8756-971x(2007)23[184:lfig]2.0.co;2

Wany A., Jha S., Nigam V., & Pandey D. M. (2013). Chemical analysis and therapeutic uses of citronella oil from *Cymbopogon Winterianus*: A short review. *International Journal of Advanced Research*, 1(6), 504-521.

Ware, G. W., & Whitacre, D. M. (2004). An introduction to insecticides, 4<sup>th</sup> ed. In *The pesticide book*, 6<sup>th</sup> ed. Ohio: MeisterPro Information Resources. Retrieved from <https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>

WHO. (1989). *DDT and its derivatives: Environmental aspects*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40018>

WHO. (2005). *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Retrieved from [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69101/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

WHO. (2015). *Indoor residual spraying: An operational manual for Indoor Residual Spraying (IRS) for Malaria transmission control and elimination*, 2<sup>nd</sup> ed. Retrieved from [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177242/9789241508940\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/177242/9789241508940_eng.pdf?sequence=1)

WHO. (2017). *Global Vector Control response 2017–2030: A strategic approach to tackle vector-borne diseases*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259205/9789241512978-eng.pdf?sequence=1>

WHO. (2018). *World malaria report 2018*. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>

WHO. (2019a). *Demonstrating cost effectiveness and sustainability of environmentally sound and locally appropriate alternatives to DDT for Malaria vector control in Africa 2009–2017 Final project report*. Retrieved from <https://www.afro.who.int/sites/default/files/2019-03/AlternativeDDT-eng.pdf>

WHO. (2019b). *Dengue and severe Dengue: Fact sheet*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., Jeffrey, A. M., & Duan, J. D. (2013). Methyleugenol hepatocellular cancer initiating effects in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 187-196. doi:10.1016/j.fct.2012.11.050

Woodring, J., & Davidson, E. W. (1996). Biological control of mosquitoes. In: B.J. Beaty, & W.C. Marquardt (Eds.), *The Biology of Disease Vectors* (pp. 530–548). Niwot: University Press of Colorado.

Zeidler, O. (1874). I. Verbindungen von Chloral mit Brom- und Chlorbenzol. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 7(2), 1180–1181. doi:10.1002/cber.18740070278

Zhang, L., Jiang, Z., Tong, J., Wang, Z., Han, Z., & Zhang, J. (2010). Using charcoal as base material reduces mosquito coil emissions of toxins. *Indoor Air*, 20(2), 176-184. doi:10.1111/j.1600-0668.2009.00639.x

Zhao, F., Watanabe, Y., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K., & Kitanaka, S. (2005). Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Natural Products*, 68(1), 43-49. doi:10.1021/np0499113

Zhou, W.-L., Tan, H.-B., Qiu, S.-X., Chen, G.-Y., Liu, H.-X., & Zheng, C. (2017). Biomimetic total synthesis and structure confirmation of myrtucommulone K. *Tetrahedron Letters*, 58(19), 1817–1821. doi:10.1016/j.tetlet.2017.03.059

Zuurbier, K.W.M., Fung, S.Y., Scheffer, J.J.C., & Verpoorte, R. (1998). In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 49(8), 2315-2322. doi:10.1016/s0031-9422(98)00179-4



## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αθανασίου, Λ., Βακάλης, Ν., & Βαλιάκος, Γ. (2012). *Εγχειρίδιο τεκμηριωμένης ανασκόπησης του ιού του Δυτικού Νείλου*. Ειδικό πρόγραμμα ελέγχου για τον ιό του Δυτικού Νείλου και την ελονοσία, ενίσχυση της επιτήρησης στην Ελληνική επικράτεια.

Βογιατζόγλου-Σαμανίδου, Α. (2011). *Τα Κουνούπια της Ελλάδας: Μορφολογία, Βιολογία, Δημόσια υγεία, Κλείδες προσδιορισμού, Αντιμετώπιση*. Αθήνα: ΑγροΤύπος.

Βόντας, Ι., Ροδιτάκης, Ε., & Τσαγκαράκου, Α. (2007). Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα: Παραδείγματα εντόμων και ακάρεων ελληνικού ενδιαφέροντος. *Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα*, 18(1), 60-68.

Εμμανουήλ, Ν. Γ. (1999). *Δίπτερα Υγειονομικής Σημασίας: Αναγνώριση, Βιολογία, Οικονομική σημασία, Αντιμετώπιση*. Αθήνα: Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ζιώγας, Β. Ν. & Μαρκόγλου, Α. Ν. (2007). *Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*. Αθήνα.

Σαββοπούλου-Σουλτάνη, Μ., Ανδρεάδης, Σ., & Σουλτανή-Ζουρουλίδη, Χ. (2011). *Εντομα & Άλλα Αρθρόποδα Υγειονομικής Σημασίας*. Θεσσαλονίκη: City Publish.

Τζανακάκης, Μ. Ε. (1995). *Εντομολογία*. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.

Τσιάμης, Κ., Βρυώνη, Γ., Θεοδωρίδου, Κ., Πουλάκου-Ρεμπελάκου, Ε., Τσακρής, Α. (2017). Η εισαγωγή του DDT (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane, δίχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο) στον ελληνικό ανθελονοσιακό αγώνα κατά την περίοδο 1945-1949. *Acta Microbiol. Hellenica*, 62(3), 173-175.

## ΔΙΑΔΥΚΤΙΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

1. LIFE CONOPS. «Βιολογικός κύκλος.» 2013  
<<http://www.conops.gr/bilogikos-kyklos/>>
2. AMCA. "BIOLOGY."  
<<https://www.mosquito.org/page/biology>>
3. LIFE CONOPS. «Οι πιο συχνές ερωτήσεις για τα κουνούπια.»  
<<http://www.conops.gr/syxnes-erwthseis/>>
4. Forbes. «What Would Happen If We Eliminated The World's Mosquitoes?»  
2017  
<<https://www.forbes.com/sites/quora/2017/09/13/what-would-happen-if-we-eliminated-the-worlds-mosquitoes/#2a23512b11f6>>
5. MOSQUITO REVIEWS. "Do mosquitoes pollinate?"  
<<https://mosquitoreviews.com/learn/mosquitoes-pollination/>>
6. LIFE CONOPS. "*Culex (Culex) pipiens* Linnaeus 1758." 2014  
<<https://www.conops.gr/culex-culex-pipiens-linnaeus-1758/>>
7. LIFE CONOPS. «Εννοιολογικοί προσδιορισμοί-Ορισμοί.»  
<<https://www.conops.gr/management-plans/ennoiologikoi-orismoι/>>
8. World Health Organization. "Neglected tropical diseases."  
<[https://www.who.int/neglected\\_diseases/vector\\_ecology/mosquito-borne-diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/)>
9. ISGlobal. Barcelona Institute for Global Health. "Mosquitoes: World's Deadliest Animal." Research, Malaria Elimination, 2017  
<<https://www.isglobal.org/en/-/mosquito-el-animal-mas-letal-del-mundo>>
10. CDC. "West Nile virus"  
<<https://www.cdc.gov/westnile/index.html>>
11. ISGlobal. Barcelona Institute for Global Health. "The Common House Mosquito: An Unwanted Companion in Our Lives." 2017  
<<https://www.isglobal.org/en/healthisglobal/-/custom-blog-portlet/el-mosquito-comun-un-companero-indeseable-en-nuestras-vidas/5083982/8301>>
12. ΕΟΔΥ. «Ιός του Δυτικού Νείλου.»  
<<https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/>>
13. ECDC. "Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018."  
<<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>>

14. Αθανασιάδης, Θ. Μ., «Εντομοκτόνα-Μηχανισμοί Δράσης.»  
<<https://slideplayer.gr/slide/13796737/>>
15. Εγκύκλιος. Υπουργείο Υγείας. «Προγράμματα καταπολέμησης των κουνουπιών, σχέδιο δράσης, σχετική ενημέρωση και προφύλαξη του κοινού για το έτος 2019.» Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων «Εγκεκριμένα βιοκτόνα σκευάσματα για την αντιμετώπιση των κουνουπιών.» 2019  
<<http://www.isth.gr/images/uploads/files/mohgovgr08022019.pdf>>
16. CHEMEUROPE.COM.“Rotenone.”  
<<https://www.chemeurope.com/en/encyclopedia/Rotenone.html>>
17. The Nobel Prize. “The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1948.”  
<<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/summary/>>
18. Καπετανάκης, Ε., «Μεθόδοι αντιμετώπισης φυτοπαράσιτων.», Ηλεκτρονικές Σημειώσεις, Τ.Ε.Ι. Κρήτης  
<[http://www.lib.teiher.gr/webnotes/steg/Methodoi\\_Antimetopisis\\_Fytoparasiton/kef5.pdf](http://www.lib.teiher.gr/webnotes/steg/Methodoi_Antimetopisis_Fytoparasiton/kef5.pdf)>
19. EFSA. “Neonicotinoids: risks to bees confirmed.” 2018  
<<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180228>>
20. ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. “Insecticide.”  
<<https://www.britannica.com/technology/insecticide>>
21. melissokomia.com «Επικοινωνία»  
<<http://www.melissokomia.com/pollination/index.html>>
22. EUROPEAN COMMISSION. “Neonicotinoids.”  
<[https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances/approval\\_renewal/neonicotinoids\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/approval_renewal/neonicotinoids_en)>
23. LIFE CONOPS. «Αντιμετώπιση του Ασιατικού κουνουπιού τίγρης.» 2013  
<<http://www.conops.gr/control-asian-tiger/>>
24. EUROPEAN CENTRE FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICALS “Linear Polydimethylsiloxanes CAS No. 63148-62-9, 2<sup>nd</sup> ed.”, JACC No. 55, 2011  
<<http://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/JACC-055-Linear-Polydimethylsiloxanes-CAS-No.-63148-62-9-Second-Edition.pdf>>
25. LIFE CONOPS. «Η τεχνική της εξαπόλυσης στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique – SIT) έναντι του *Aedes albopictus* (κν. Ασιατικό κουνούπι τίγρης).»  
<<http://www.conops.gr/sit-technique/>>

26. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. «Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 528/2012 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 22/5/2012 σχετικά με τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση βιοκτόνων.» 2012  
<<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:el:PDF>>
27. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. «Κατάλογος φυτοπροστατευτικών προϊόντων και βιοκτόνων κατά κατηγορία ή δραστικό.»  
<[http://www.minagric.gr/syspest/syspest\\_bycat\\_byactive.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx)>
28. Master Organic Chemistry. "Keto-Enol Tautomerism: Key Points." 2010  
<<https://www.masterorganicchemistry.com/2010/04/12/keto-enol-tautomerism-key-points/>>
29. FOODB. "Showing Compound Colupone (FDB019243)." 2010  
<<https://foodb.ca/compounds/FDB019243>>

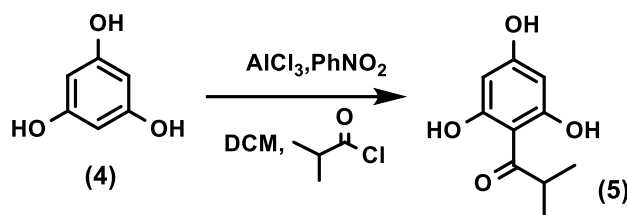
## Ζ. ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ

### Ζ.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, 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. 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<sub>2</sub>O) αποστάχθηκαν από μεταλλικό νάτριο και βενζοφαινόνη, ενώ το διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) από υδρίδιο του ασβεστίου (CaH<sub>2</sub>). Η πορεία των αντιδράσεων παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (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. Για τη χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε silica gel από τη Merck ή την SDS μεγέθους 0.040-0.063 mm. Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ελήφθησαν σε όργανο Bruker DRX – 500 και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα 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), τριπλή (t), πολλαπλή (m). Όπου κρίθηκε απαραίτητο, το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο διηθήθηκε από άνυδρο ανθρακικό κάλιο για την απομάκρυνση τυχόν όξινων υπολειμμάτων.

## Z.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

### 2-ισοβουτυρο-φλωρογλυκινόλη (5)



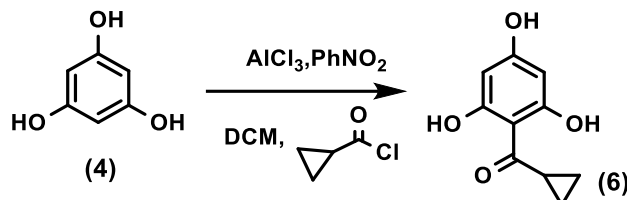
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
57%	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	196.20	196.07	R <sub>f</sub> = 0.39 Εξάνιο/AcOEt 6:4

#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα της φλωρογλυκινόλης (4) (10 g, 80 mmol) σε 80 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου (DCM), προστίθεται AlCl<sub>3</sub> (42.7 g, 320 mmol) υπό ανάδευση και ευθύς αμέσως γίνεται στάγδην προσθήκη 29.6 mL νιτροβενζολίου (PhNO<sub>2</sub>) σε διάρκεια 30 λεπτών. Η θερμοκρασία αυξάνεται από 30°C σε 35°C και το μίγμα της αντίδρασης γίνεται ομογενές. Διάλυμα ισοβουτυροχλωριδίου (8.4 mL, 80 mmol) σε 2 mL PhNO<sub>2</sub> προστίθεται στάγδην με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας από 35°C σε 40°C σε διάστημα 30 λεπτών. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση πραγματοποιείται στους 35°C για 1 ώρα ακόμα και έπειτα το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τους 30°C. Το μίγμα αποχύνεται σε 16 mL πυκνού HCl και 160 mg πάγου. Γίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (3x100 mL DCM), παραλαμβάνονται οι οργανικές φάσεις και εκχυλίζονται με πυκνό NaOH (3x100 mL). Παραλαμβάνουμε την υδατική φάση, οξινίζεται και ακολουθεί εκχύλιση με Et<sub>2</sub>O (3x200 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τη 2-ισοβουτυρο-φλωρογλυκινόλη (5) ως κίτρινες νιφάδες (9 g).

<sup>1</sup> H NMR (500 MHz) 25 °C, CDCl <sub>3</sub>	δ 9.84 (s, 1H; -OH), 5.90 (s, 2H; Ar-H), 5.53 (s, 1H; -OH), 3.88 (hept, J=6.7 Hz, 1H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.21 (d, J=6.7 Hz, 6H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) ppm.
---	--

### 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6)

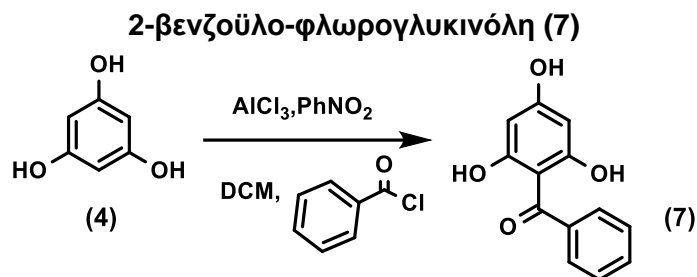


Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
65%	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.19	194.06	R <sub>f</sub> = 0.30 Εξάνιο/AcOEt 6:4

#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα της φλωρογλυκινόλης (4) (500 mg, 3.965 mmol) σε 4 mL άνυδρου DCM, προστίθεται AlCl<sub>3</sub> (1.588g, 11.9 mmol) υπό ανάδευση και ευθύς αμέσως γίνεται στάγδην προσθήκη 1.48 mL PhNO<sub>2</sub> σε διάρκεια 30 λεπτών. Η θερμοκρασία αυξάνεται από 30°C σε 35°C και το μίγμα της αντίδρασης γίνεται ομογενές. Διάλυμα c-προπανοϋλοχλωριδίου (0.432 mL, 4.758 mmol) σε 143 μL PhNO<sub>2</sub> προστίθεται στάγδην με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας από 35°C σε 40°C σε διάστημα 30 λεπτών. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση πραγματοποιείται στους 35°C για 1 ώρα ακόμα και έπειτα το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τους 30°C. Το μίγμα αποχύνεται σε 1 mL πυκνού HCl και 8 mg πάγου. Γίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (3x50 mL DCM), παραλαμβάνονται οι οργανικές φάσεις και εκχυλίζονται με πυκνό NaOH (3x50 mL). Παραλαμβάνουμε την υδατική φάση, οξινίζεται και ακολουθεί εκχύλιση με Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τη 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6) ως υποκίτρινες νιφάδες (503 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, DMSO-d<sub>6</sub></b>	δ 12.23 (brs, 2H; -OH), 10.33 (s, 1H; -OH), 5.82 (s, 2H; Ar-H), 3.43–3.35 (m, 1H; -COCH-), 1.05 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> - κυκλοπροπυλο-), 0.97 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> - κυκλοπροπυλο-) ppm.
---	--



Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
23%	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	230.22	230.06	R <sub>f</sub> = 0.35 Εξάνιο/AcOEt 6:4

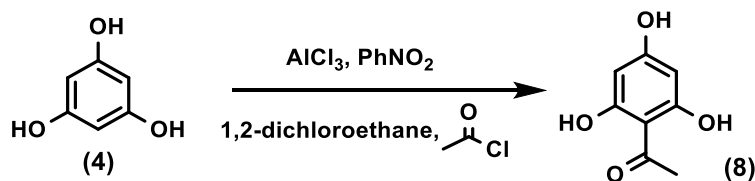
#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα της φλωρογλυκινόλης (4) (500 mg, 3.965 mmol) σε 4 mL άνυδρου DCM, προστίθεται AlCl<sub>3</sub> (1.588 g, 11.9 mmol) υπό ανάδευση και ευθύς αμέσως γίνεται στάγδην προσθήκη 1.48 mL PhNO<sub>2</sub> σε διάρκεια 30 λεπτών. Η θερμοκρασία αυξάνεται από 60°C σε 65°C και το μίγμα της αντίδρασης γίνεται ομογενές. Διάλυμα βενζοϋλοχλωριδίου (0.569 mL, 4.896 mmol) σε 143 μL PhNO<sub>2</sub> προστίθεται στάγδην με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας από 60°C σε 65°C σε διάστημα 30 λεπτών. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση πραγματοποιείται στους 60°C για 8 ώρες ακόμα και έπειτα το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τους 55°C. Το μίγμα αποχύνεται σε 1 mL πυκνού HCl και 8 mg πάγου. Γίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (3x50mL DCM), παραλαμβάνονται οι οργανικές φάσεις και εκχυλίζονται με πυκνό NaOH (3x50 mL). Παραλαμβάνουμε την υδατική φάση, οξινίζεται και ακολουθεί εκχύλιση με Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τη 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (7) ως πράσινο τσιχλώδες στερό (gummy solid) (210 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, DMSO-d<sub>6</sub></b>	δ 10.08 (s, 2H; -OH), 9.83 (s, 1H; -OH), 7.67-7.35 (m, 5H; -COAr-H), 5.85 (s, 2H; Ar'-H) ppm.
---	---



2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8)



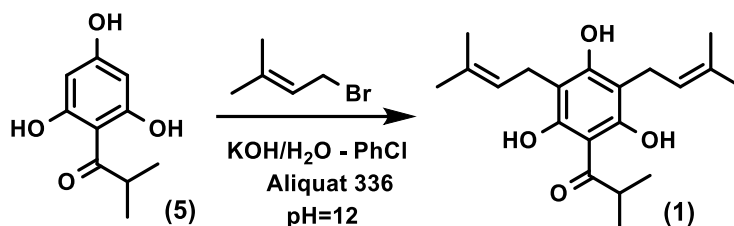
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
(A) 16% (B) 35%	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	168.15	168.04	$R_f = 0.27$ Εξάνιο/AcOEt 6:4

**Μέθοδος παρασκευής:**

Σε διάλυμα της φλωρογλυκινόλης (4) (500 mg, 3.965 mmol) σε 7.93 mL 50:50 1,2-dichloroethane/ $\text{PhNO}_2$ , προστίθεται  $\text{AlCl}_3$  (2.117 g, 15.86 mmol) υπό ανάδευση στους  $0^\circ\text{C}$  και έπειτα από δέκα λεπτά προστίθεται στάγδην ακετυλοχλωρίδιο (0.340 mL, 4.758 mmol). Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση πραγματοποιείται στους  $80^\circ\text{C}$  για 3 ώρες και έπειτα το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. **(A)** Το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε 24 mL νερού και ακολουθεί εκχύλιση με AcOEt (5 x 25 mL), παραλαμβάνονται τα οργανικά εκχυλίσματα, ξηραίνονται υπεράνω  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τη 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8) ως υποκίτρινο στερεό (104 mg). **(B)** Το μίγμα αποχύνεται σε 1 mL πυκνού HCl και 8 mg πάγου. Γίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (3x50 mL DCM), παραλαμβάνονται οι οργανικές φάσεις και εκχυλίζονται με πυκνό NaOH (3x50 mL). Παραλαμβάνουμε την υδατική φάση, οξινίζεται και ακολουθεί εκχύλιση με  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x50 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται υπεράνω  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 7:3) του ακάθαρτου μίγματος παρέχει τη 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8) ως υποκίτρινο στερεό (232 mg).

<b><math>^1\text{H}</math> NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, DMSO-<i>d</i>6</b>	$\delta$ 12.23 (s, 2H; -OH), 10.37 (s, 1H; -OH), 5.80 (s, 2H; Ar-H), 2.55 (s, 3H; -CH <sub>3</sub> ) ppm.
<b><math>^{13}\text{C}</math> NMR</b> (62.9 MHz) <b>25 °C, DMSO-<i>d</i>6</b>	$\delta$ 202.9, 165.2, 164.8, 104.5, 95, 32.8 ppm.

### Δεοξυκοχουμουλόνη (1)

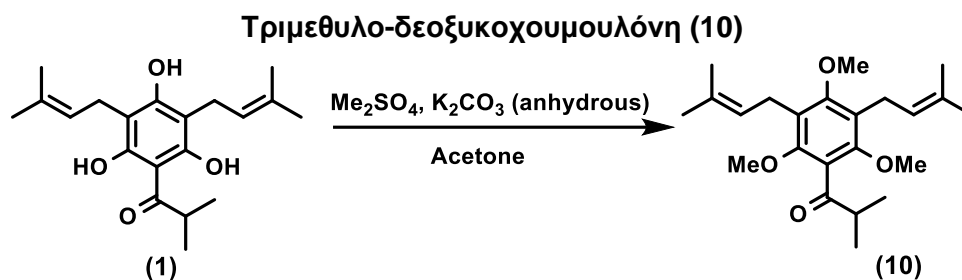


Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
26%	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	332.44	332.20	R <sub>f</sub> = 0.43 εξάνιο/AcOEt 9:1

#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (2 g, 10.2 mmol) σε 17.9 mL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas), γίνεται προσθήκη διαλύματος 10.2 mL KOH 2N και Aliquat 336 (233 μL, 0.51 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη του 3,3-διμεθυλαλλυλ-βρωμιδίου (πρενυλοβρωμίδιο) (2.4 mL, 20.4 mmol) στάγδην σε διάστημα 1 ώρας, υπό έντονη ανάδευση, με διατήρηση του pH σε τιμή 12 με προσθήκη διαλύματος KOH 2N. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 4 ώρες στους 0°C. Στο μίγμα προστίθεται διάλυμα KOH (pH=14) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x50 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται με τη φάση του PhCl και απορρίπτονται. Στο αλκαλικό υδατικό διάλυμα ρυθμίζεται το pH σε τιμή 12 ύστερα από προσθήκη HCl και ακολουθεί έκπλυση με Et<sub>2</sub>O (4x50 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 95:5) παρέχει την δεοξυκοχουμουλόνη (1) ως πορτοκαλί στερεό (871 mg).

<sup>1</sup> H NMR (500 MHz) 25 °C, CDCl <sub>3</sub>	δ 14.25 (brs, 1H; -OH), 10.11 (s, 1H; -OH), 6.30 (s, 1H; -OH), 5.25 (m, 2H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.93 (hept, J=6.9 Hz, 1H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.40 (d, J=7.2 Hz, 4H; -CH <sub>2</sub> -), 1.86 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.81 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.19 (d, J=6.7 Hz, 6H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) ppm.
<sup>13</sup> C NMR (62.9 MHz) 25 °C, CDCl <sub>3</sub>	δ 211, 159.3, 159.1, 136.5, 121.7, 104.8, 104.4, 39.3, 25.8, 21.8, 19.4, 17.9 ppm.



Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
63%	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	374.52	374.25	R <sub>f</sub> = 0.80 εξάνιο/AcOEt 9:1

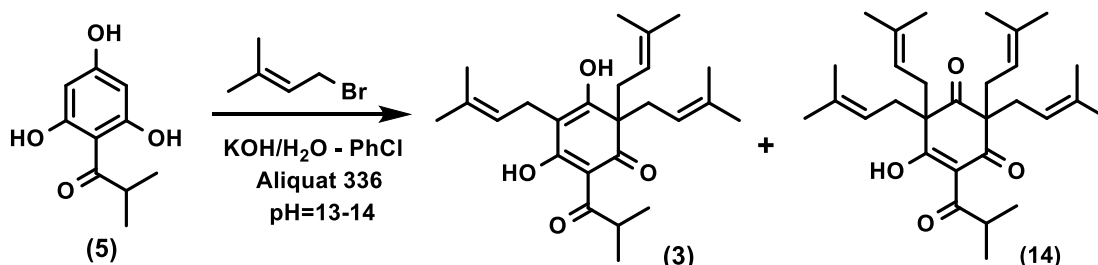
#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα δεοξυκοχουμουλόνης (1) (200 mg, 0.602 mmol) σε 10 mL ακετόνης, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas) γίνεται προσθήκη άνυδρου K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (416 mg, 3.01 mmol), στους 0°C. Στην ίδια θερμοκρασία, προστίθεται έπειτα διάλυμα Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (228 μL, 2.408 mmol) σε 10 mL ακετόνης. Μόλις γίνει η τελευταία προσθήκη, το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε μίγμα κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) και AcOEt (50 mL) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική φάση εκπλένεται με AcOEt (3x50 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης του ακάθαρτου μίγματος (silica, εξάνιο/AcOEt 99:1) παρέχει την τριμεθυλο-δεοξυκοχουμουλόνη (10) ως υποκίτρινο παχύρρευστο ελαιώδες υγρό (144 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	δ 5.21 (m, 2H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.75 (s, 3H; -OCH <sub>3</sub> ), 3.71 (s, 6H; -OCH <sub>3</sub> ), 3.34 (brd, J=5.8 Hz, 4H; -CH <sub>2</sub> -), 3.07 (m, 1H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.79 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.71 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.17 (d, J=7.0 Hz, 6H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) ppm.
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (62.9 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	δ 209.8, 158.8, 154.2, 131.4, 127.2, 125.3, 123.6, 63.1, 61.4, 42.3, 25.6, 23.4, 18.0, 17.9 ppm.

### Κολουπουλόνη (3)

### Κολουπόνη (14)



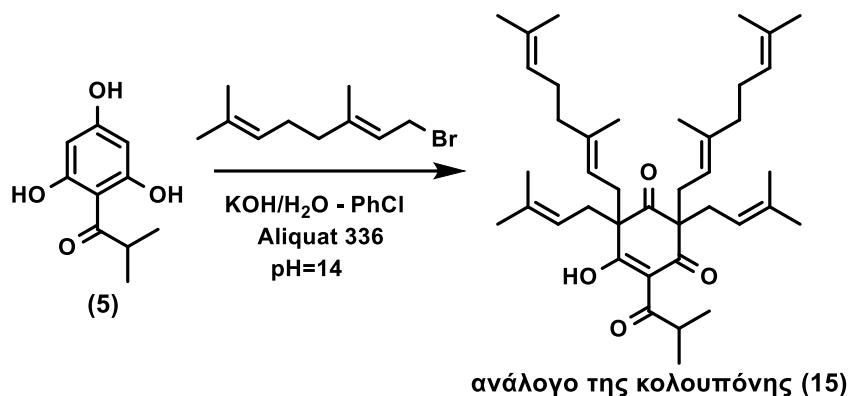
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
(3) 21%	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	400.56	400.26	R <sub>f(3)</sub> = 0.40
(14) 34%	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	468.68	468.32	R <sub>f(14)</sub> = 0.67 εξάνιο/AcOEt 9:1

#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (500 mg, 2.548 mmol) σε 4.25 mL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas), γίνεται προσθήκη διαλύματος 2.548 mL KOH 2 N και Aliquat 336 (58 μL, 0.127 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη πρενυλοβρωμιδίου (1.030 mL, 8.918 mmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, με διατήρηση του pH σε τιμή 13-14 με προσθήκη διαλύματος KOH 2N. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης η ανάδευση συνεχίζεται για 5 ώρες στους 0°C και μισή ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται διάλυμα KOH (pH=14) και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 99:1) παρέχει την κολουπουλόνη (3) (211 mg) ως υποκίτρινο στερεό και την κολουπόνη (14) ως λευκούς κρυστάλλους (408 mg).

<p><b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b></p>	<p>(3) Μίγμα ταυτομερών μορφών ~3.5:1  <math>\delta</math> 6.99 (s, 1H; -OH), 6.44 (s, 1H; -OH), 5.15 (t, <math>J=7.0</math> Hz, 2H; -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.93–4.66 (m, 4H; -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.28–4.15 (m, 1H; -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (ταυτομερούς), 4.03 (hept, <math>J=6.6</math> Hz, 1H; -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.19 (d, <math>J=6.7</math> Hz, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.72-2.41 (2 multiplets overlapping, 4H; -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.78 (s overlapping, 6H; -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.63-1.52 (s overlapping, 12H; -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.14 (d overlapping, 6H; -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.</p> <p>(14) <math>\delta</math> 5.0-4.89 (m overlapping, 4H; -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.69 (hept, <math>J=6.9</math> Hz, 1H; -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.67 (m, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.56 (m, 4H; -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.31 (m, 2H; -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.70-1.54 (4 singlets overlapping, 24H; -CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.18 (d, <math>J=6.7</math> Hz, 6H; -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.</p>
<p><b><sup>13</sup>C NMR</b> (62.9 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b></p>	<p>(14) <math>\delta</math> 208.3, 207.5, 197.8, 194.5, 136.3, 134.6, 118.9, 118.3, 112.5, 65.7, 61.1, 37, 35.5, 33.7, 26, 25.8, 19.2, 17.9, 17.8 ppm.</p>

### Ανάλογο της κολουπόνης (15)



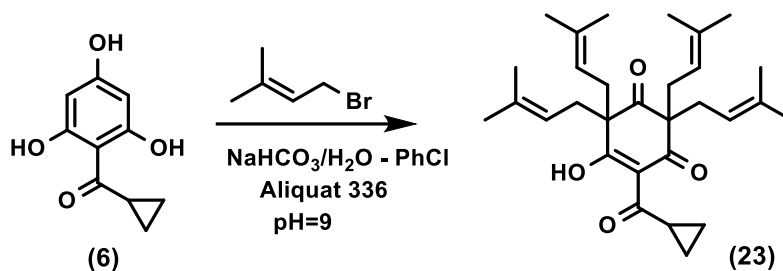
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
24%	C <sub>40</sub> H <sub>60</sub> O <sub>4</sub>	604.92	604.45	R <sub>f</sub> = 0.76 εξάνιο/AcOEt 9:1

#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (50 mg, 151 μmol) σε 0.252 mL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas), γίνεται προσθήκη διαλύματος 0.227 mL KOH 2N και Aliquat 336 (5 μL, 0.010 μmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη γερανυλοβρωμιδίου (60μL, 0.302 μmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, με διατήρηση του pH σε τιμή 14 με προσθήκη διαλύματος KOH 2N. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης η ανάδευση συνεχίζεται για 5 ώρες στους 0°C και μία ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται H<sub>2</sub>O και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται. Η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x15mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 99:1) παρέχει το ανάλογο της κολουπόνης (15) ως λευκό υγρό (22 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	δ 12.15 (brs, 1H; -OH), 5.13-5.01 (m, 2H; -CH=C(CH <sub>3</sub> -) 5.0-4.90 (m, 4H; -CH=C(CH <sub>3</sub> -), 3.71 (m, 1H; -COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.67 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> -), 2.56 (m, 4H; -CH <sub>2</sub> -), 2.31 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> -), 2.07-1.88 (m, 8H; -CH <sub>2</sub> -), 1.69-1.57 (10 brs overlapping, 30H; -CH=C(CH <sub>3</sub> -), 1.23-1.18 (2 doublets overlapping, J=6.7 Hz, 6H; -COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) ppm.
---	--

Τετραπρενυλιωμένο παράγωγο της 2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (23)



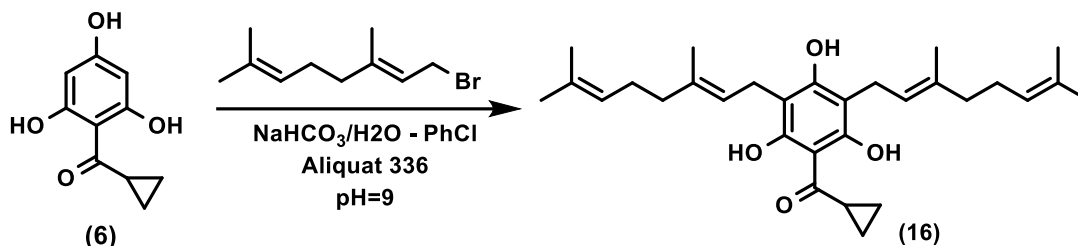
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
13%	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	466.66	466.31	R <sub>f</sub> =0.58 εξάνιο/AcOEt 9:1

**Μέθοδος παρασκευής:**

Σε διάλυμα 2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλης (6) (50 mg, 0.257 mmol) σε 428 μL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas) γίνεται προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> (215.9 mg, 2.57 mmol), H<sub>2</sub>O (50 μL) και Aliquat 336 (6 μL, 0.013 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη πρενυλοβρωμιδίου (59.8μL, 0.514 mmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, σε pH=9. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 4 ώρες στους 0°C και μία ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται νερό, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O(3 x15mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 99:1) παρέχει την (23) (15 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	δ 13 (s, 1H; -OH), 5.01-4.90 (m overlapping, 4H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.21 (m, 1H; -COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.62 (m, 4H; -CH <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.51 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 2.36 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.67-1.56 (4 singlets overlapping, 24H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 1.33 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> -κυκλοπροπυλο-), 1.14 (m, 2H; -CH <sub>2</sub> -κυκλοπροπυλο-) ppm.
---	---

4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη(16)



Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
21%	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	466.66	466.31	R <sub>f</sub> = 0.50 Εξάνιο/AcOEt 6:4

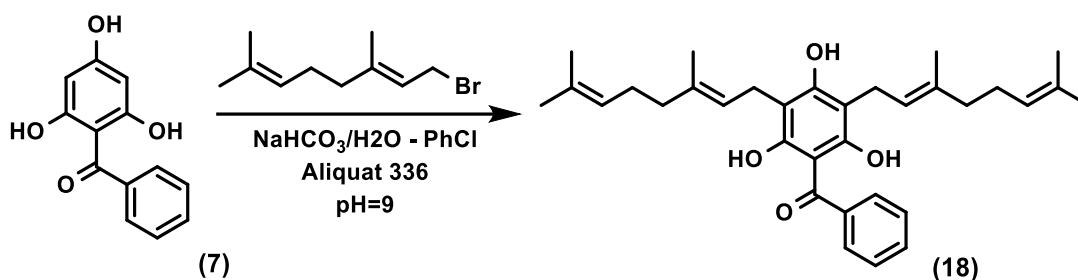
**Μέθοδος παρασκευής:**

Σε διάλυμα 2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλης (6) (50 mg, 0.258 mmol) σε 750  $\mu$ L PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas) γίνεται προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> (216 mg, 2.580 mmol), 500  $\mu$ L H<sub>2</sub>O και Aliquat 336 (6 $\mu$ L, 0.013 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη γερανυλοβρωμιδίου (76.7  $\mu$ L, 0.386 mmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, σε pH=9. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 3 ώρες στους 0°C και μισή ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται νερό, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 98:2) παρέχει την (16) (25 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	$\delta$ 13.98 (brs, 1H; <b>OH</b> ), 10.06 (s, 1H; <b>-OH</b> ), 6.32 (s, 1H; <b>-OH</b> ), 5.28 (m, 2H; <b>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-</b> ), 5.08 (m, 2H; <b>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b> ), 3.43 (d, <i>J</i> =7.1 Hz, 4H; <b>-CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-</b> ), 3.27 (m, 1H; <b>-COCH-</b> ), 2.19–2.09 (m, 8H; <b>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-</b> ), 1.85 (s, 6H; <b>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-</b> ), 1.70 (s, 6H; <b>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>a</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>b</sub></b> ), 1.62 (s, 6H; <b>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>a</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>b</sub></b> ), 1.29 (m, 2H; <b>-CH<sub>2</sub>-</b> κυκλοπροπυλο-), 0.99 (m, 2H; <b>-CH<sub>2</sub>-</b> κυκλοπροπυλο-) ppm.
<b><sup>13</sup>C NMR</b> (62.9 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	$\delta$ 205.1, 159.2, 158.8, 140, 132.2, 123.6, 121.8, 106, 105, 39.7, 26.2, 25.7, 21.8, 20.7, 17.7, 16.2, 12.2 ppm.



### 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (18)



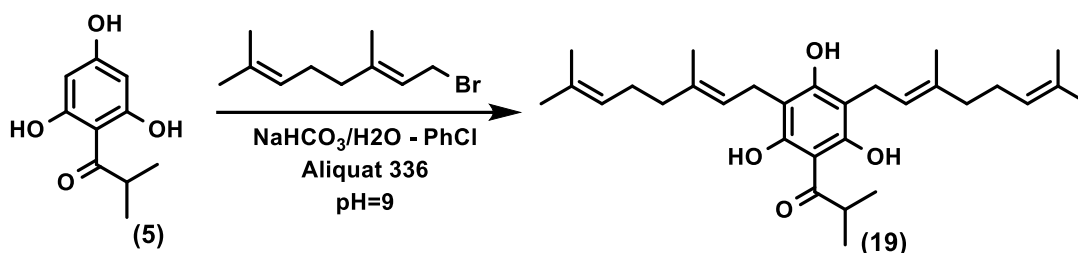
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
23%	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	502.70	502.31	R <sub>f</sub> = 0.33 Εξάνιο/AcOEt 6:4

#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα 2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλης (7) (50 mg, 0.217 mmol) σε 750 μL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas) γίνεται προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> (183 mg, 2.172 mmol), 500 μL H<sub>2</sub>O και Aliquat 336 (5 μL, 0.011 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη πρενυλοβρωμιδίου (64.7 μL, 0.326 mmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, σε pH=9. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 3 ώρες στους 0°C και μία ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται νερό, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 98:2) παρέχει την (18) (25 mg).

<b><sup>1</sup>H NMR</b> (500 MHz) <b>25 °C, CDCl<sub>3</sub></b>	δ 12.52 (brs, 1H; -OH), 8.95 (s, 1H; -OH), 7.70-7.41 (m, 5H, Ar-H), 6.41 (s, 1H, -OH), 5.30-5.04 (m, 4H; -CH=C(CH <sub>3</sub> -), 3.39 (m, 4H; -CH <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -), 2.14-2.05 (m, 8H; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -), 1.80 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -), 1.68 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.61 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ) ppm.
---	---

### 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19)



Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
18%	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	468.68	468.32	R <sub>f</sub> = 0.53 Εξάνιο/AcOEt 9:1

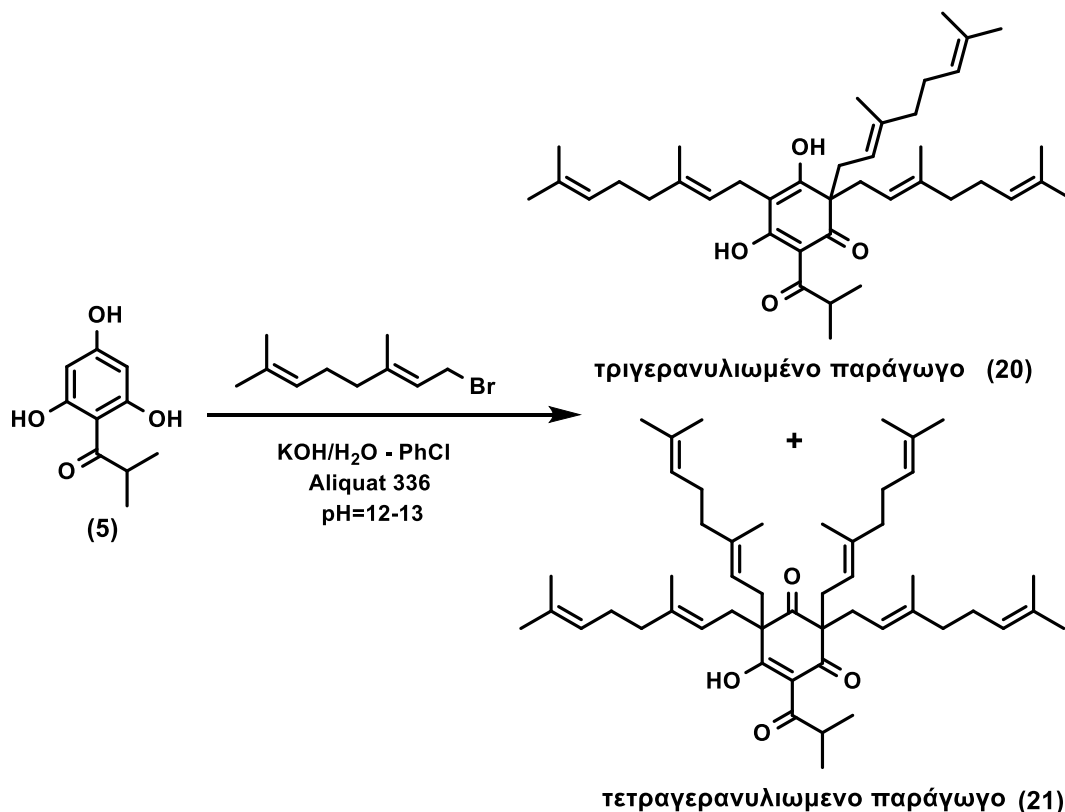
#### Μέθοδος παρασκευής:

Σε διάλυμα 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (500 mg, 2.548 mmol) σε 7 mL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas), γίνεται προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> (2.141 g, 25.48 mmol), 5 mL H<sub>2</sub>O και Aliquat 336 (58 μL, 0.128 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη γερανυλοβρωμιδίου (0.759 mL, 3.822 mmol) στάγδην σε διάστημα 1 ώρας, υπό έντονη ανάδευση, σε pH=9. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 3 ώρες στους 0°C. Προστίθεται νερό, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x15mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 98:2) παρέχει την (19) ως πορτοκαλί υγρό (213 mg).

<sup>1</sup> H NMR (500 MHz) 25 °C, CDCl <sub>3</sub>	δ 10.16 (s, 1H; -OH), 6.35 (s, 1H; -OH), 5.31–5.19 (m, 2H; -CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -), 5.13–5.02 (m, 2H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.94 (m, 1H; -COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 3.42 (d, J=7.1 Hz, 4H; -CH <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -), 2.20 – 2.08 (m, 8H; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -), 1.85 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -), 1.70 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.63 (s, 6H; -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>a</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>b</sub> ), 1.19 (d, J=6.7 Hz, 6H; -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) ppm.
<sup>13</sup> C NMR (62.9 MHz) 25 °C, CDCl <sub>3</sub>	δ 211, 159.4, 159.3, 140.3, 132.2, 123.5, 121.7, 104.9, 104.4, 39.7, 39.3, 26.2, 25.7, 21.8, 19.4, 17.7, 16.2 ppm.

Τριγερανυλιωμένο παράγωγο (20)

Τετραγερανυλιωμένο παράγωγο (21)

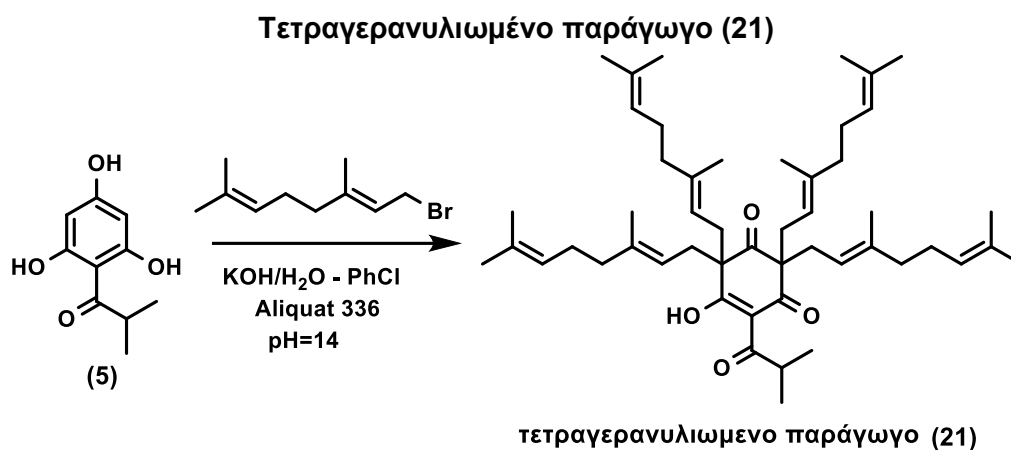


Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
(20) 10%	C <sub>40</sub> H <sub>60</sub> O <sub>4</sub>	604.92	604.45	R <sub>f(20)</sub> =0.59
(21) 6%	C <sub>50</sub> H <sub>76</sub> O <sub>4</sub>	741.15	740.57	R <sub>f(21)</sub> = 0.70 εξάνιο/AcOEt 9:1

**Μέθοδος παρασκευής:**

Σε διάλυμα 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (50 mg, 0.255 mmol) σε 0.426 mL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas), γίνεται προσθήκη διαλύματος 0.510 mL KOH 2 N και Aliquat 336 (6 μL, 0.013 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη γερανυλολοβρωμιδίου (0.101 mL, 0.510 mmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, με διατήρηση του pH σε τιμή 12-13 με προσθήκη διαλύματος KOH 2N. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 5 ώρες στους 0°C και μισή ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται H<sub>2</sub>O, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική εκπλένεται με Et<sub>2</sub>O (3x15 mL). Τα οργανικά

εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης (silica, εξάνιο/AcOEt 99:1) παρέχει το τριγερανυλιωμένο παράγωγο (20) (15 mg) και το τετραγερανυλιωμένο παράγωγο (21) (11 mg).



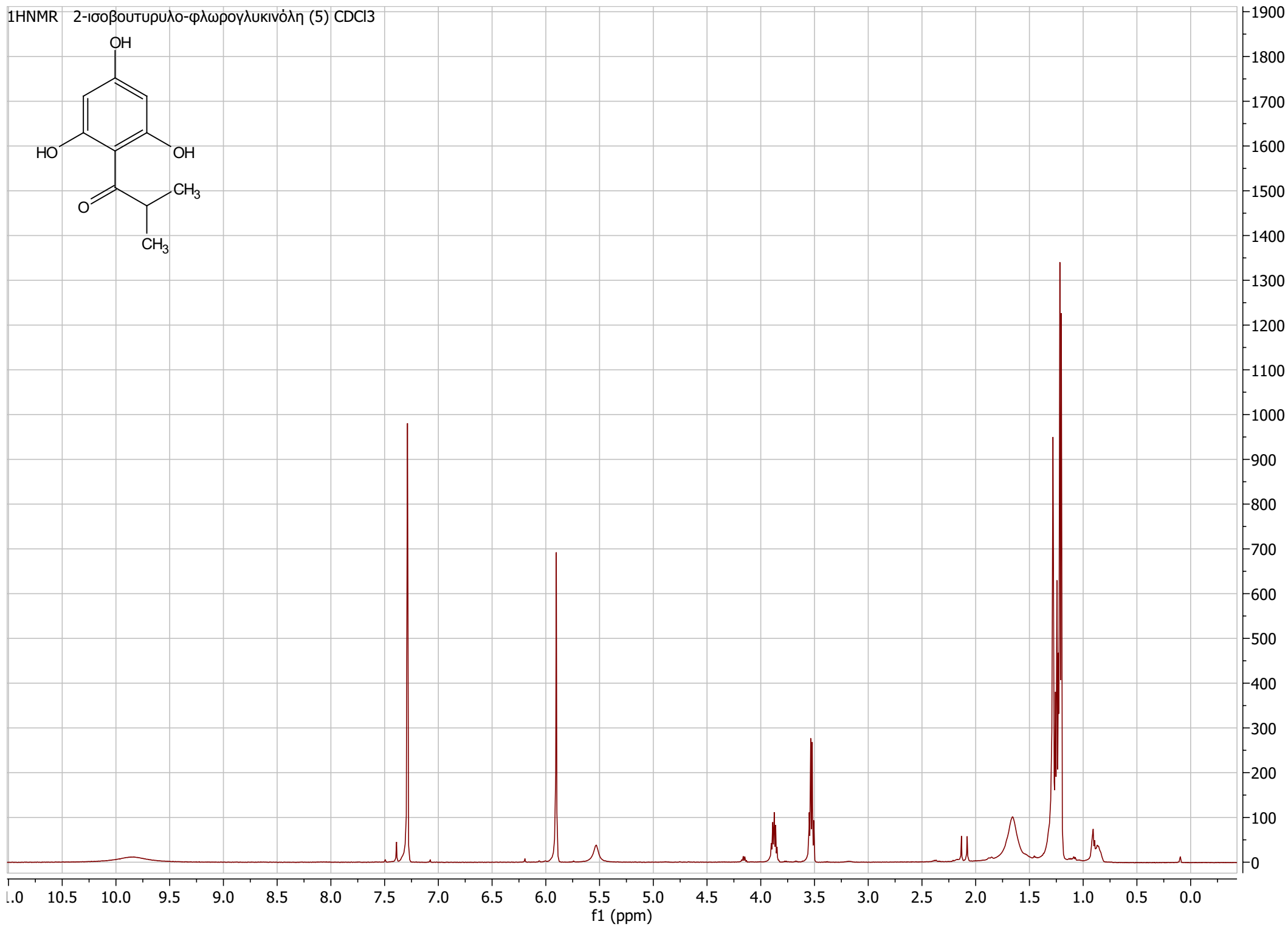
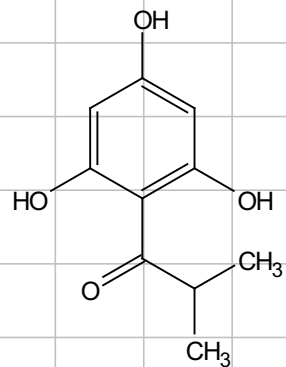
Απόδοση	M.T.	M.B.	M.B. (μονοϊσοτοπικό)	TLC
19%	$\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{O}_4$	741.15	740.57	Rf= 0.70 εξάνιο/AcOEt 9:1

**Μέθοδος παρασκευής:**

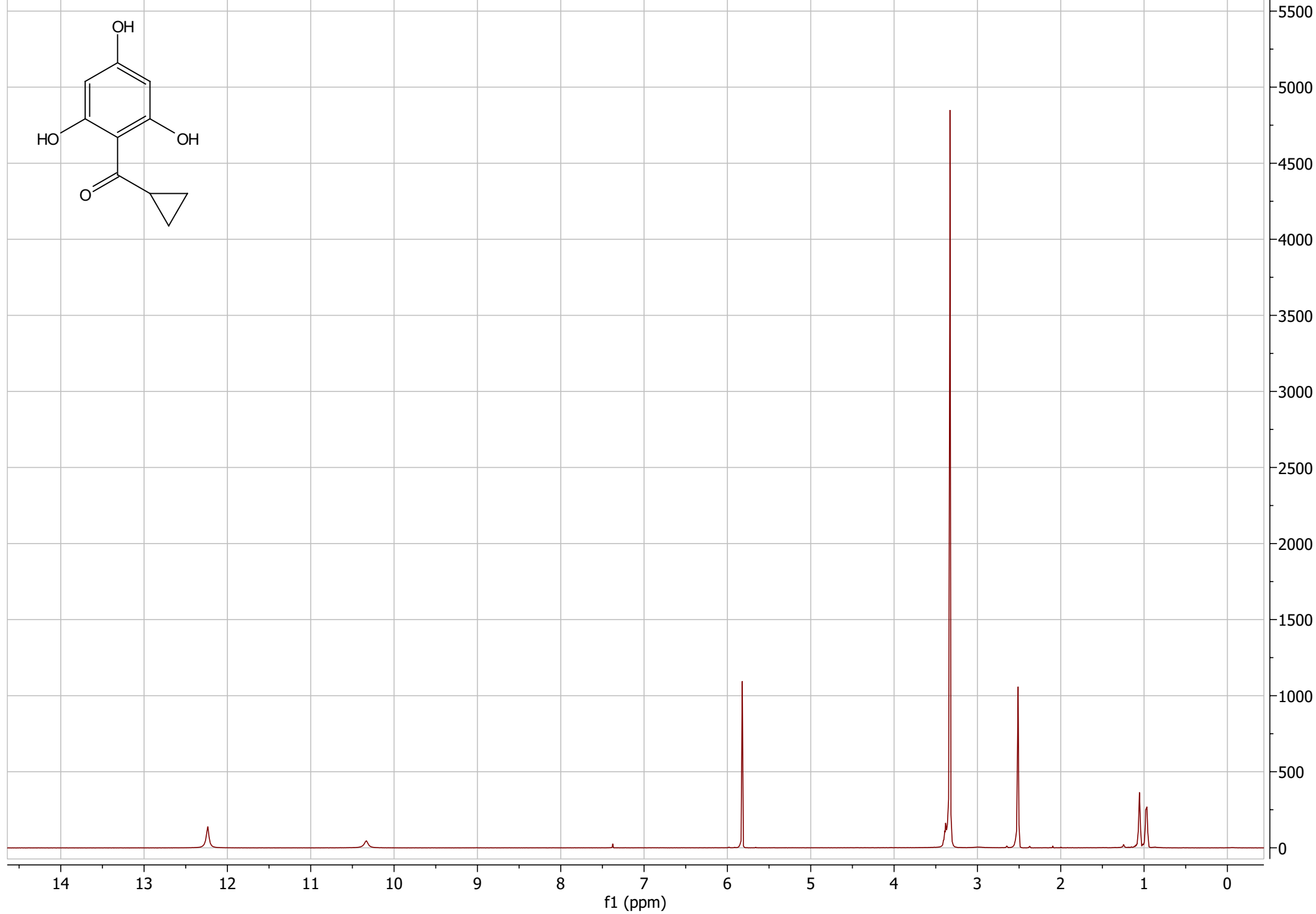
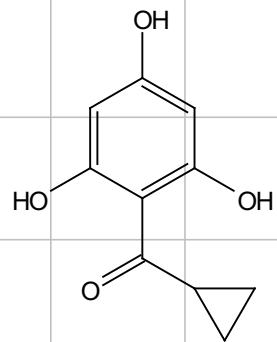
Σε διάλυμα 2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλης (5) (70mg, 0.357 mmol) σε 0.596 mL PhCl, ύστερα από τη διαδικασία της απαέρωσης (degas), γίνεται προσθήκη διαλύματος 0.714 mL KOH 2N και Aliquat 336 (8  $\mu\text{L}$ , 0.018 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και γίνεται προσθήκη γερανυλολοβρωμιδίου (0.222 mL, 1.118 mmol) στάγδην, υπό έντονη ανάδευση, με διατήρηση του pH σε τιμή 14 με προσθήκη διαλύματος KOH 2N. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ανάδευση συνεχίζεται για 4 ώρες στους 0°C. Στο μίγμα προστίθεται  $\text{H}_2\text{O}$ , οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική εκπλένεται με  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα εκπλένονται με νερό, κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl, ξηραίνονται υπεράνω  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Χρωματογραφία στήλης silica, εξάνιο/AcOEt 99:1) παρέχει το τετραγερανυλιωμένο παράγωγο (21) (51 mg).

## **Η. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

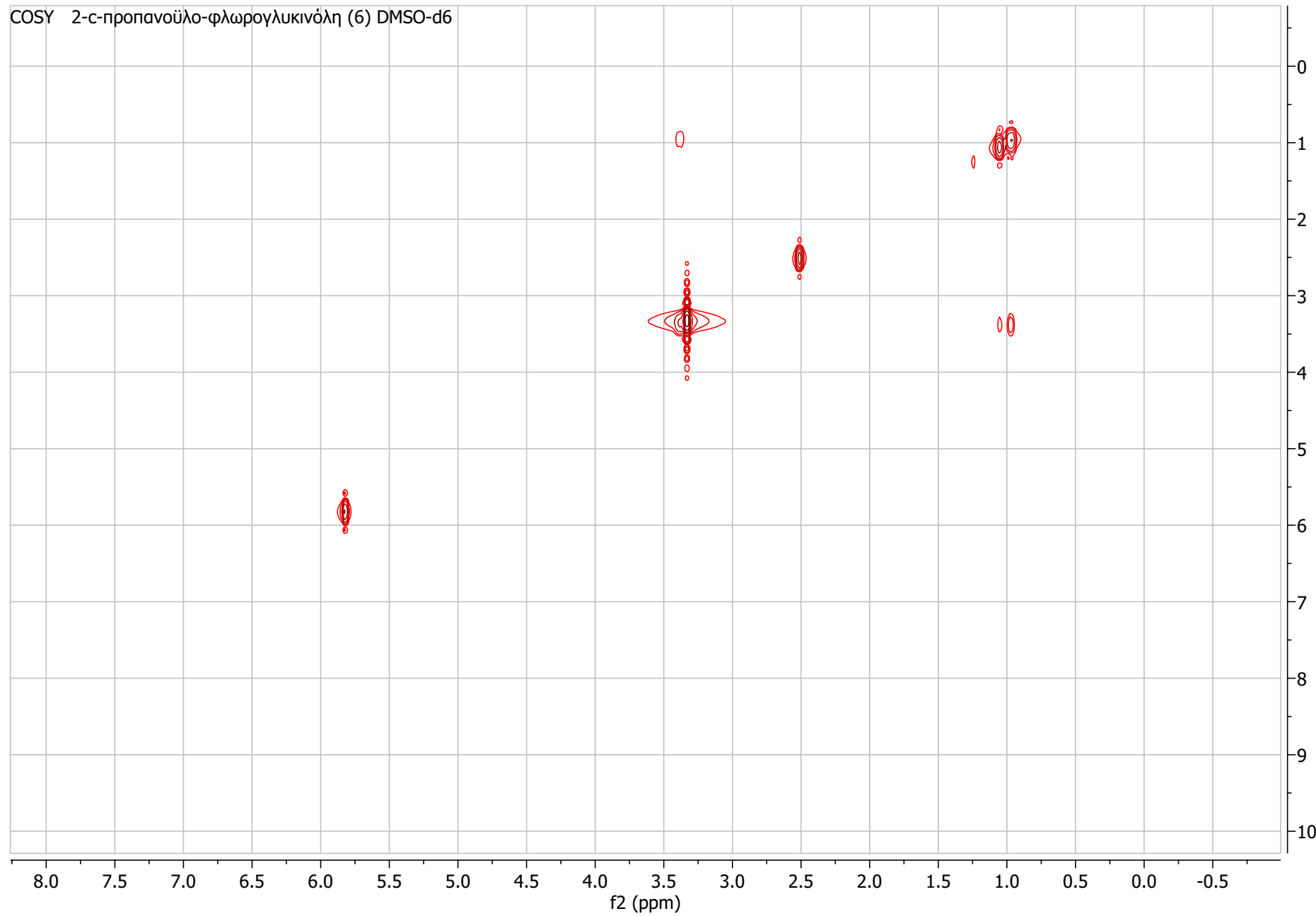
<sup>1</sup>HNMR 2-ισοβουτυριλο-φλωρογλυκινόλη (5) CDCl<sub>3</sub>



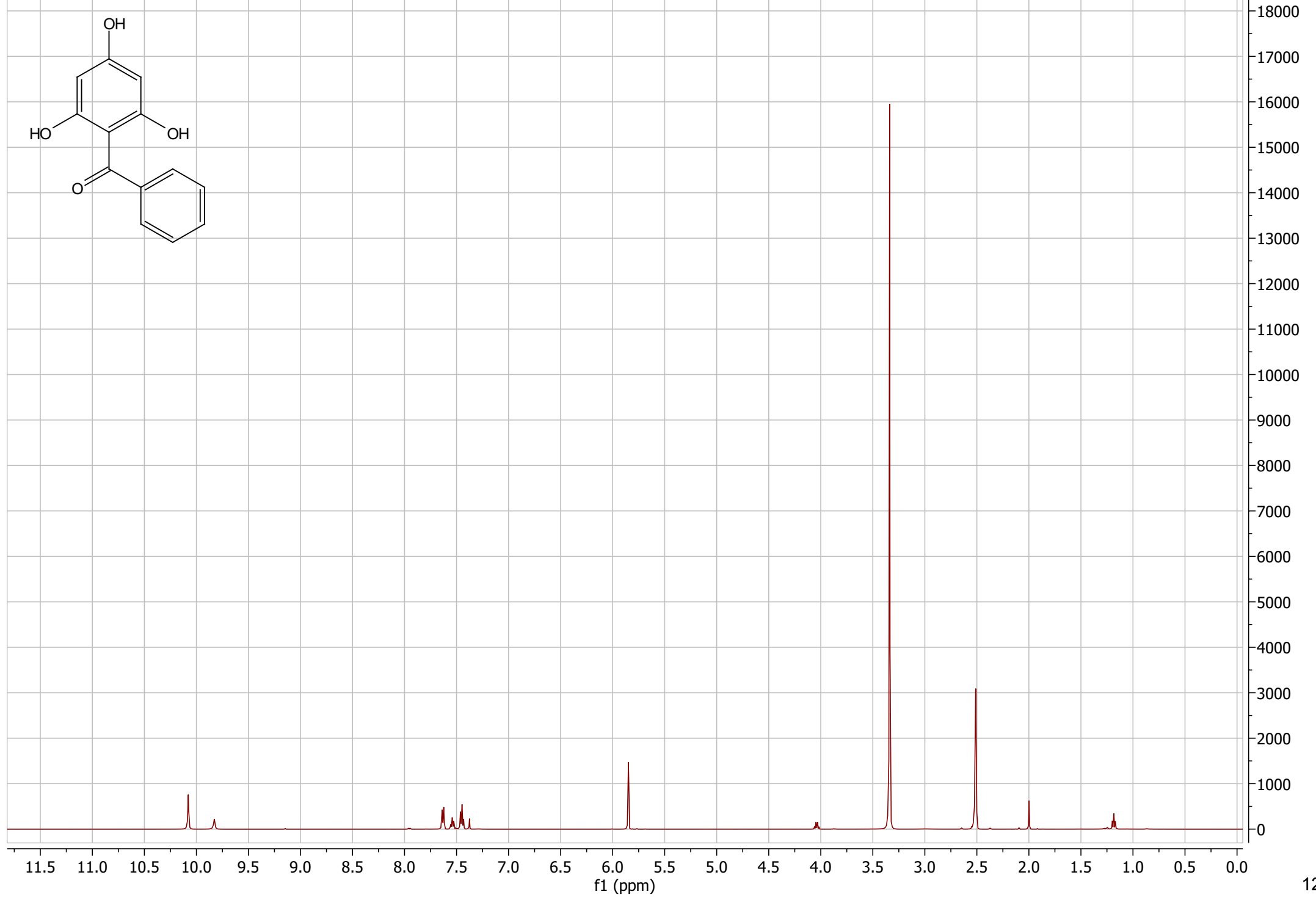
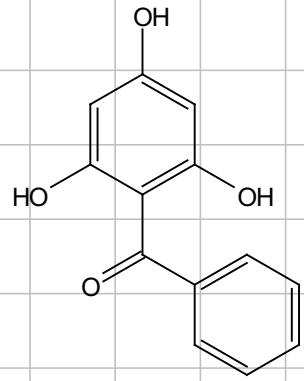
<sup>1</sup>HNMR 2-σ-προπανοϋλο-φλωρογλυκινϋλη (6) DMSO-d6



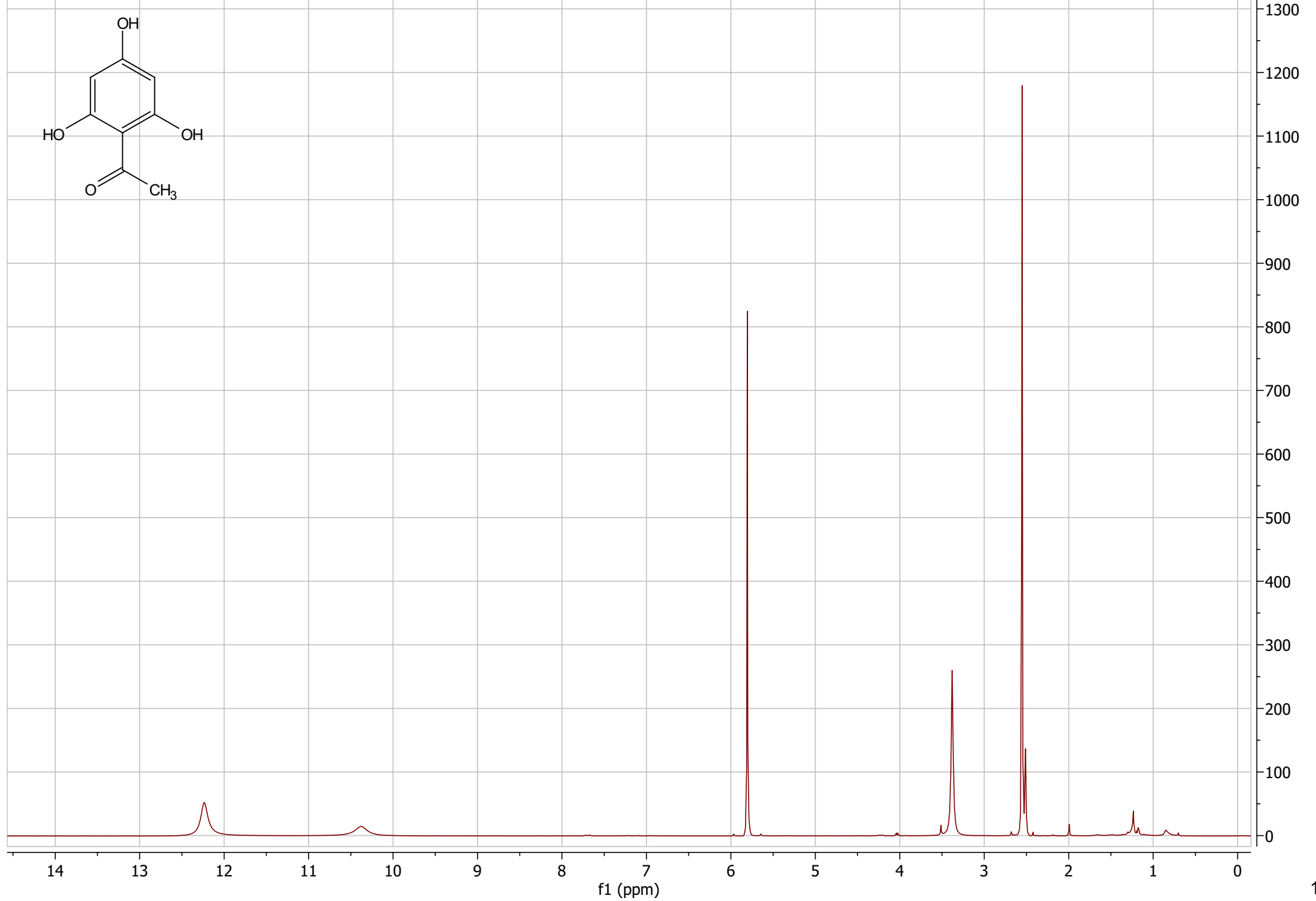
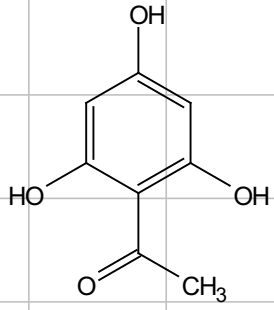
COSY 2-c-προπανοϋλο-φλωρογλυκινόλη (6) DMSO-d6

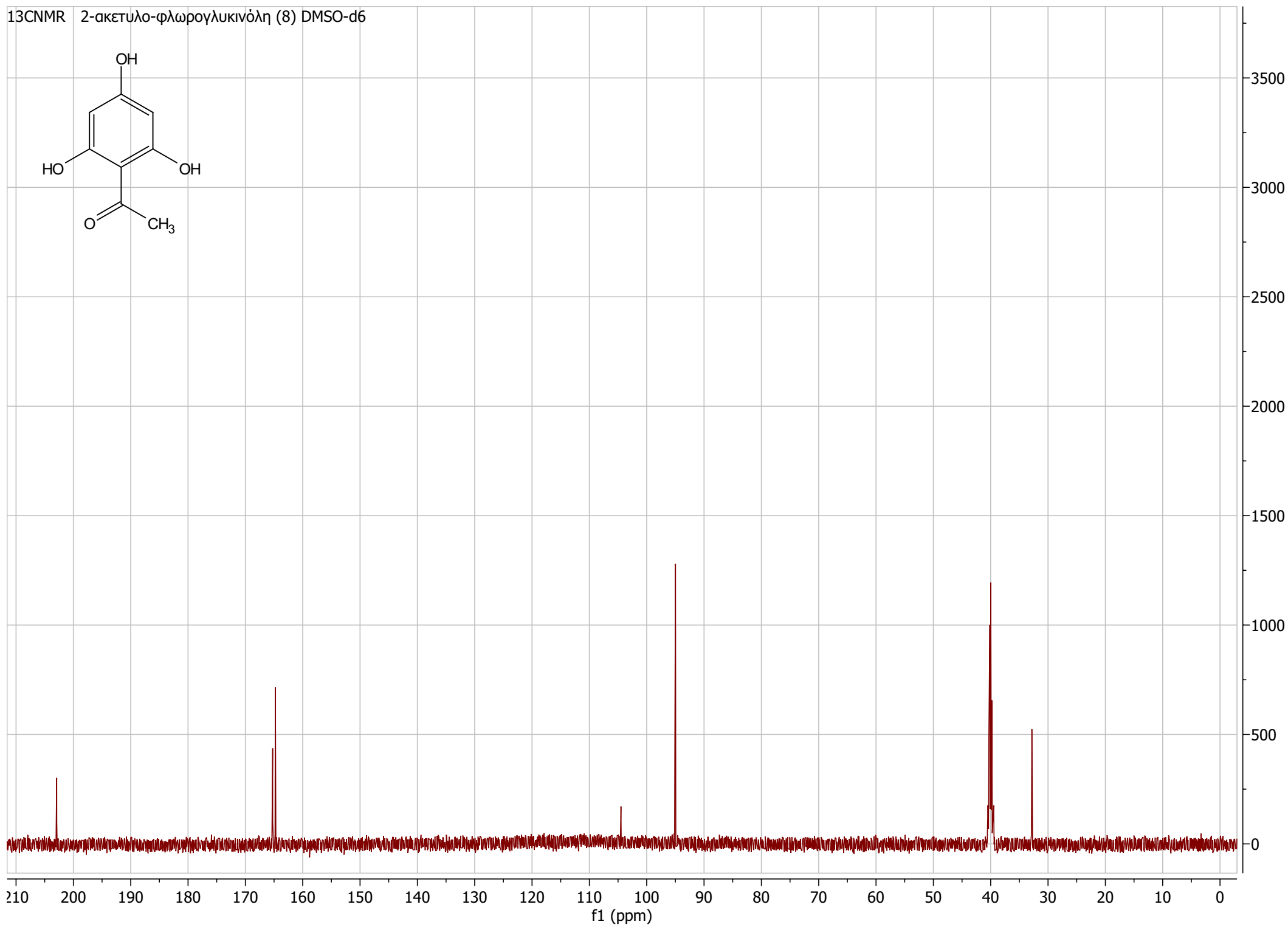
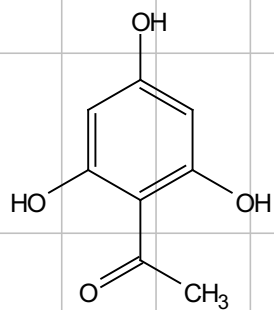




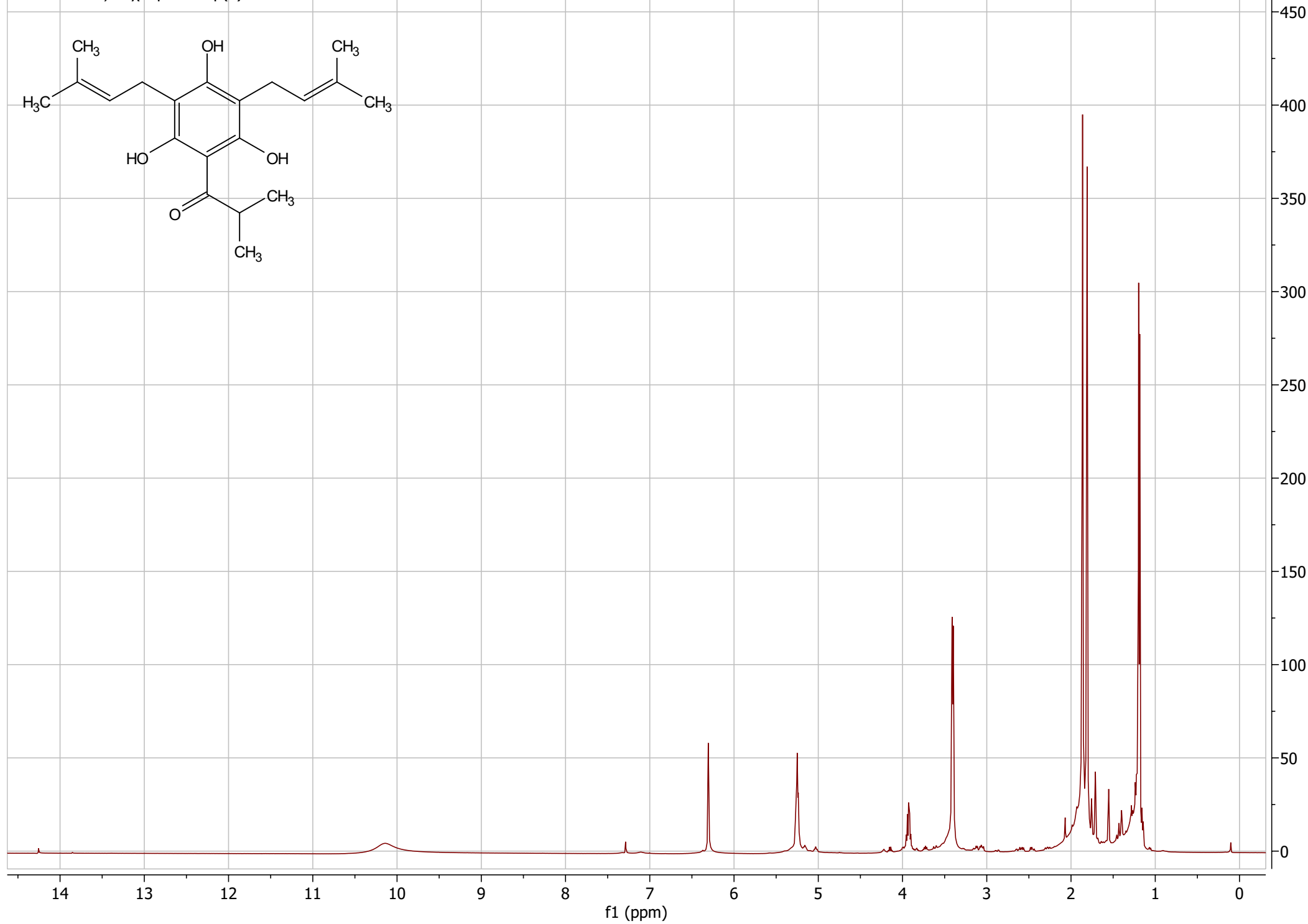
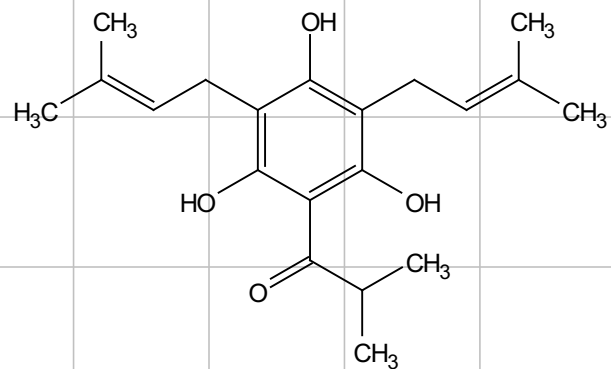


<sup>1</sup>HNMR 2-ακετυλο-φλωρογλυκινόλη (8) DMSO-d<sub>6</sub>

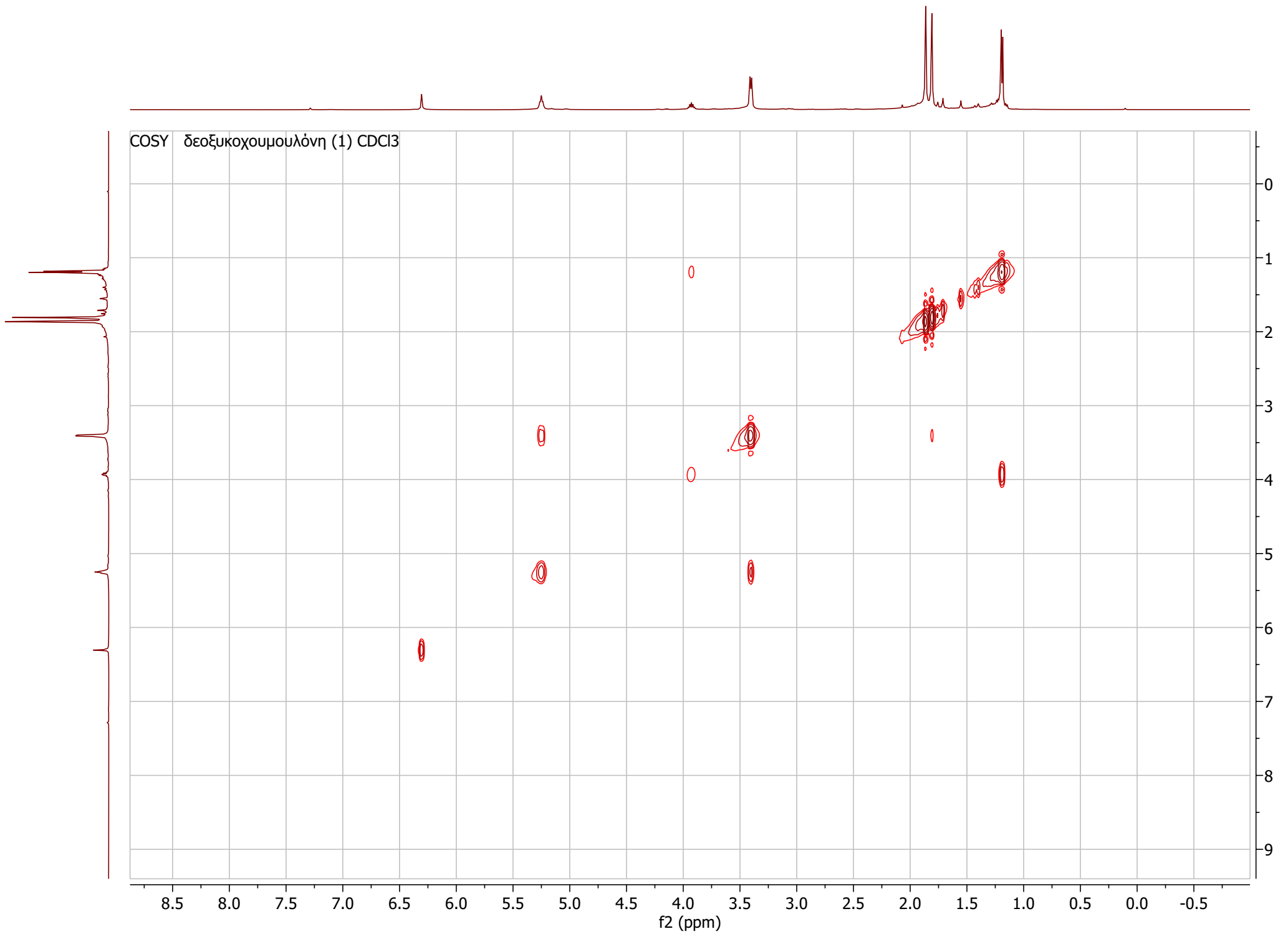




<sup>1</sup>HNMR δεοξυκοχουμολόνη (1) CDCl<sub>3</sub>

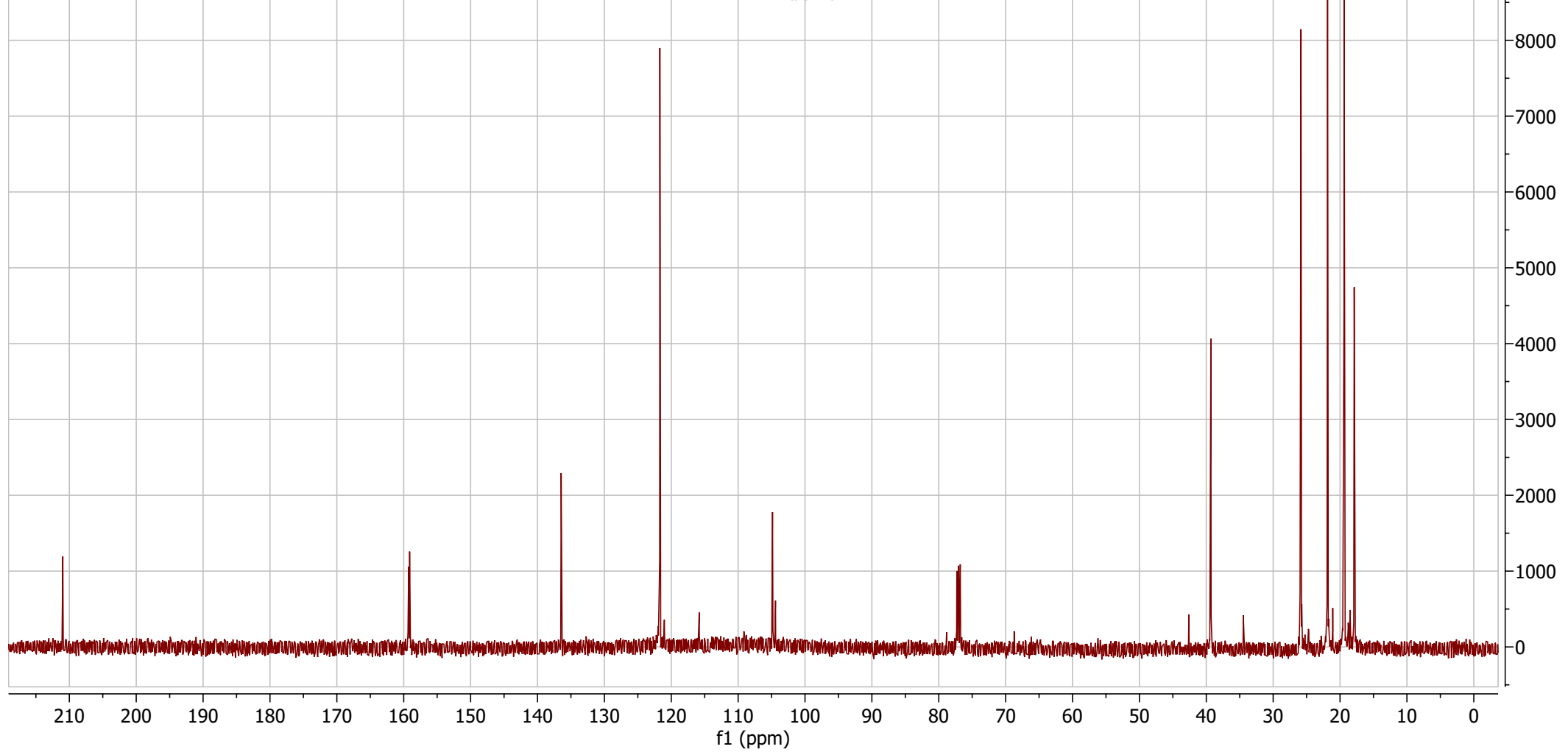
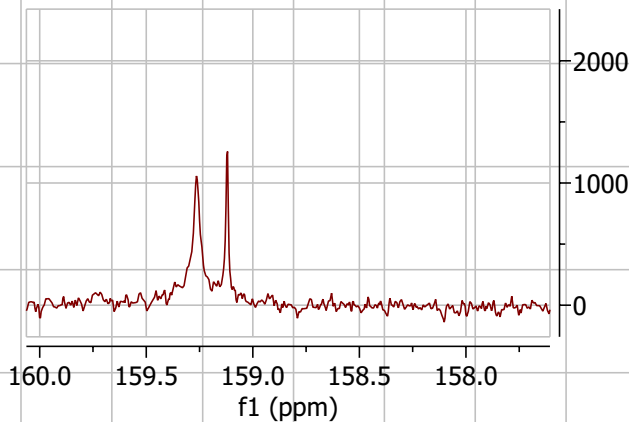
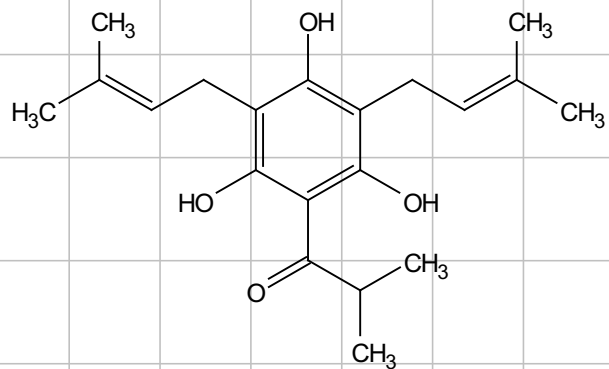


COSY δεοξυκοχουμουλόνη (1) CDCl<sub>3</sub>

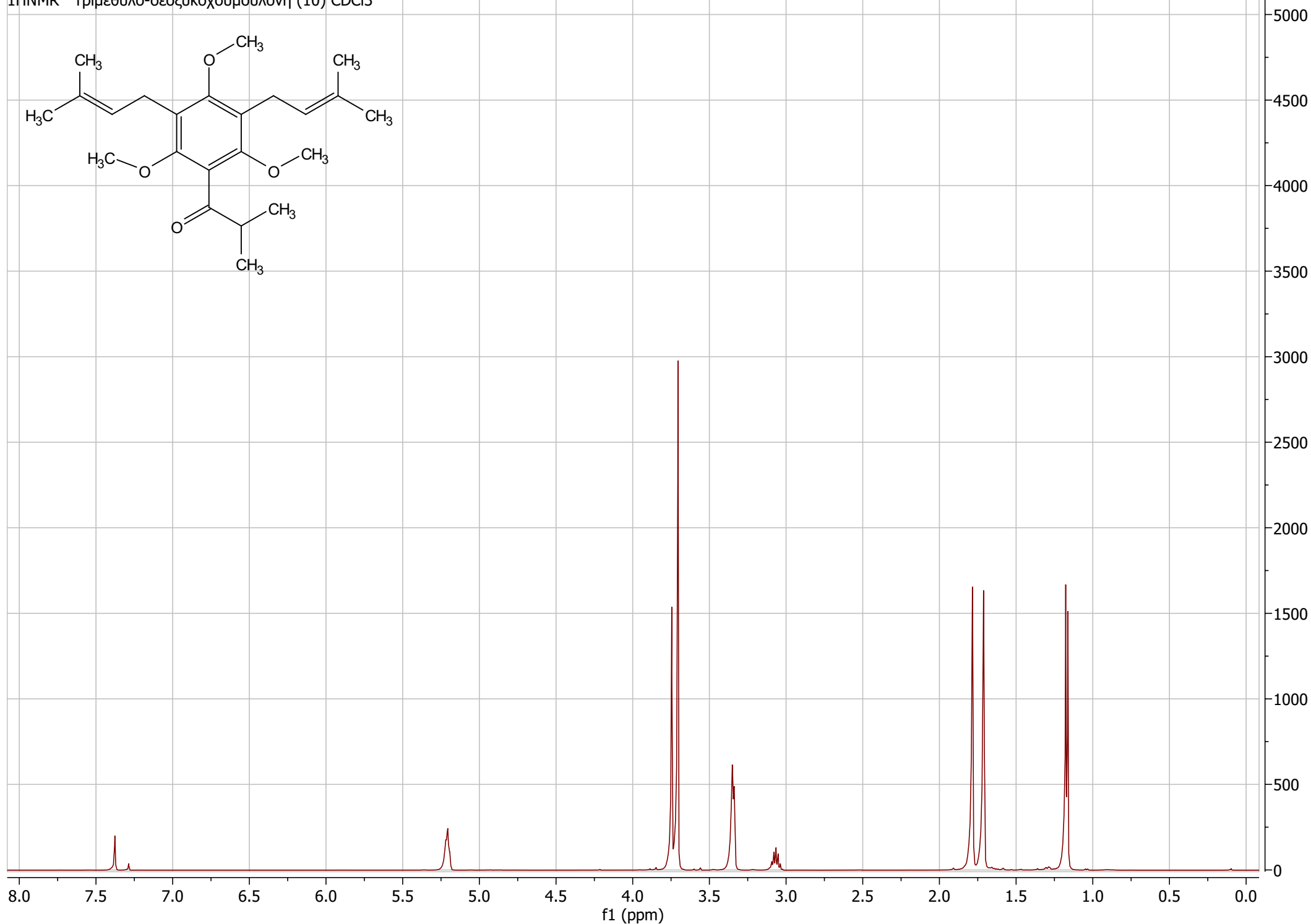
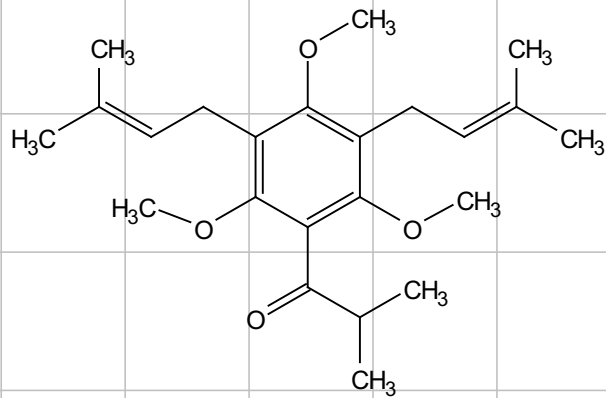


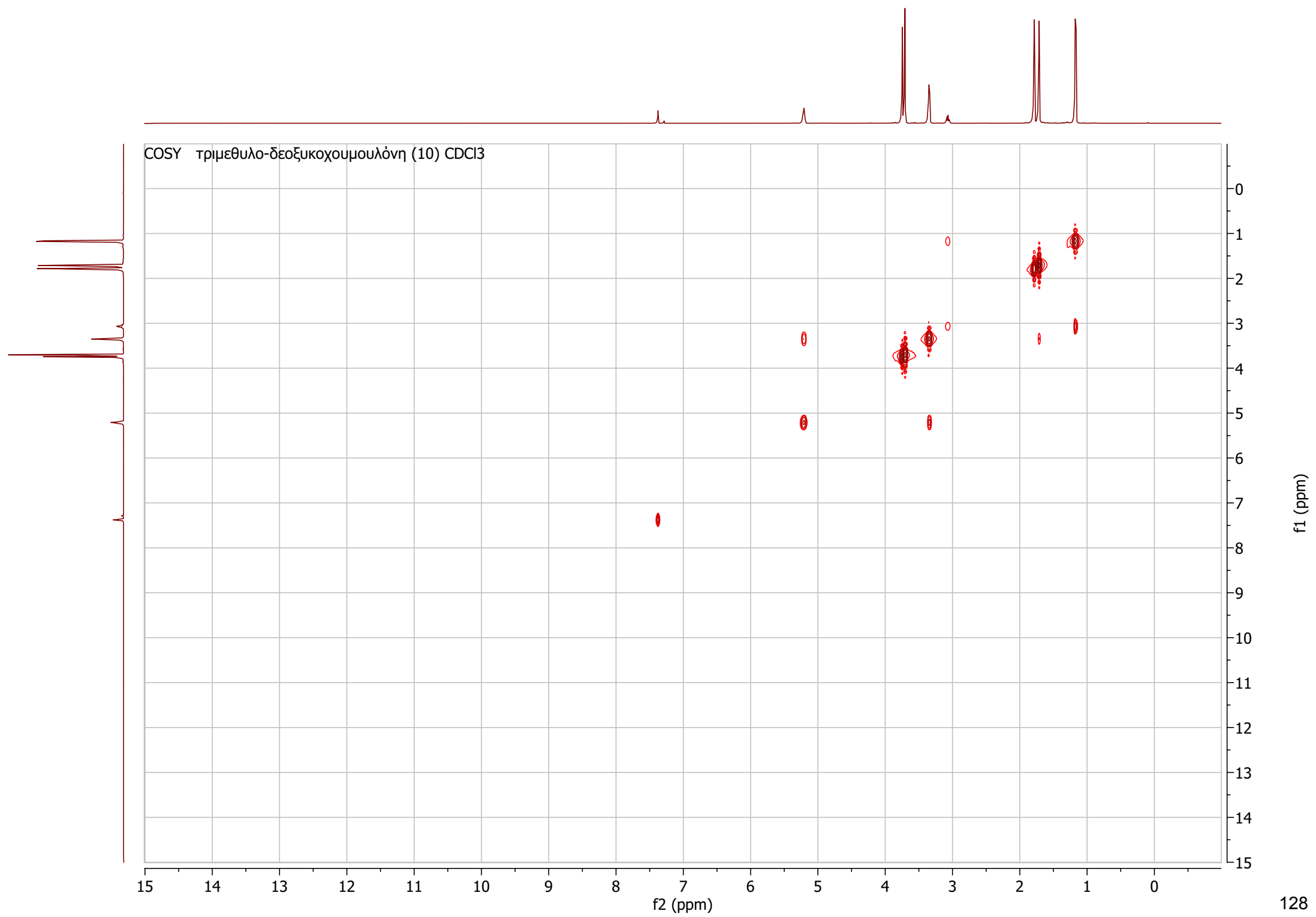
f1 (ppm)

f2 (ppm)

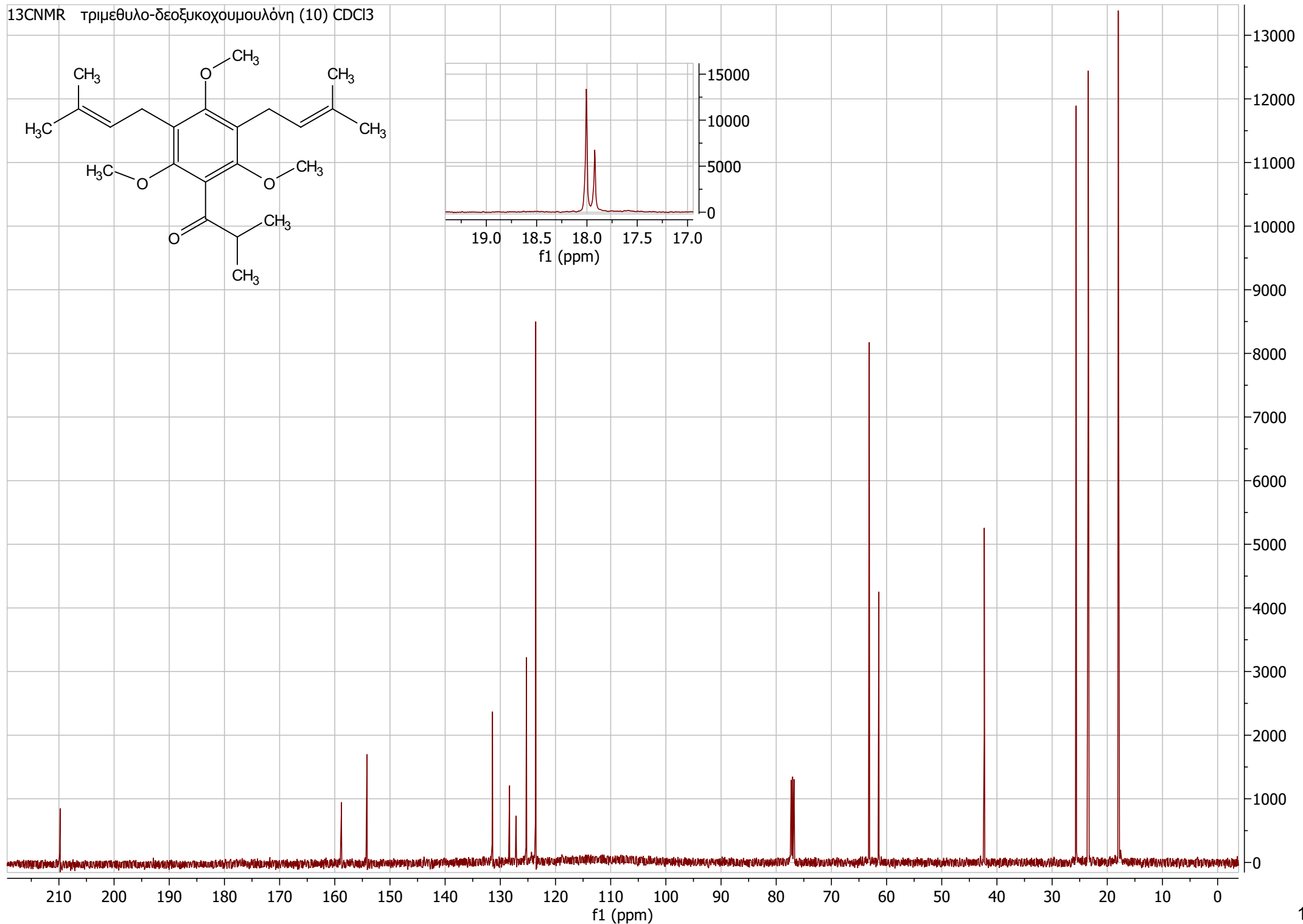
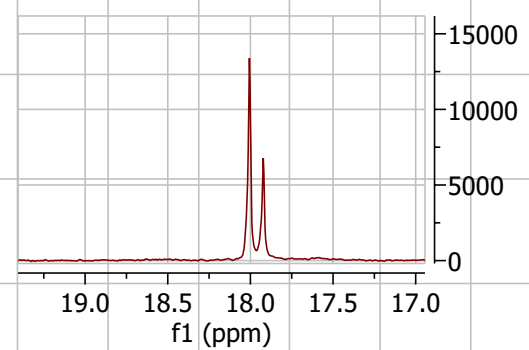
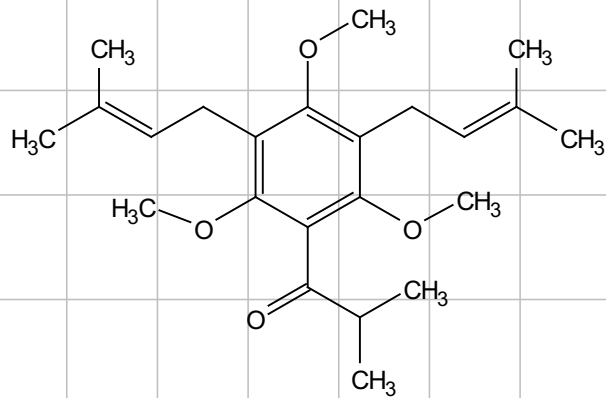


<sup>1</sup>HNMR τριμεθυλο-δεοξυκοχουμολόνη (10) CDCl<sub>3</sub>

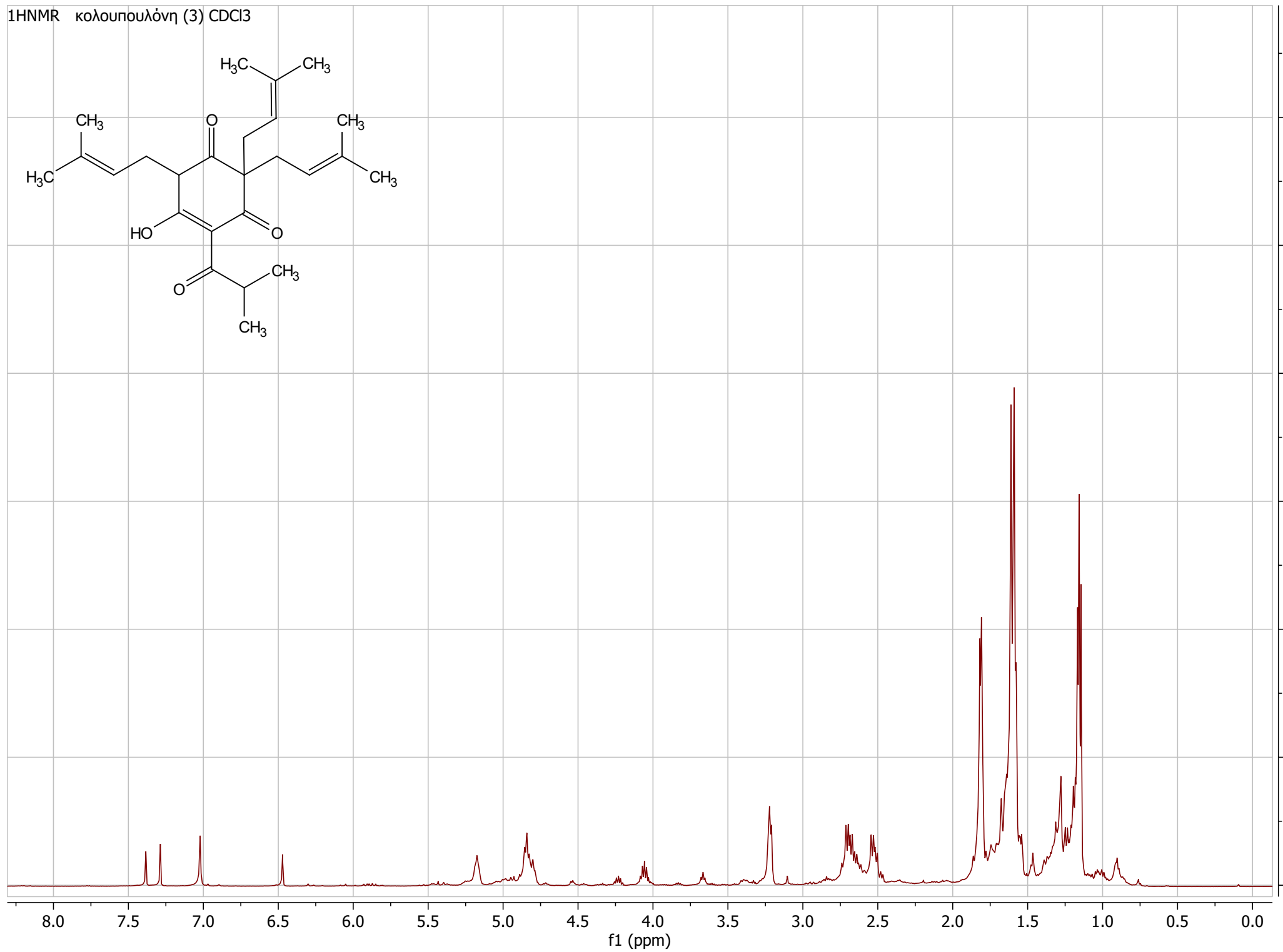
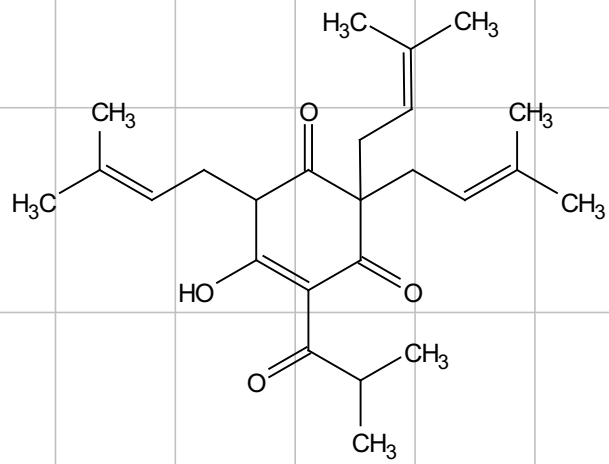




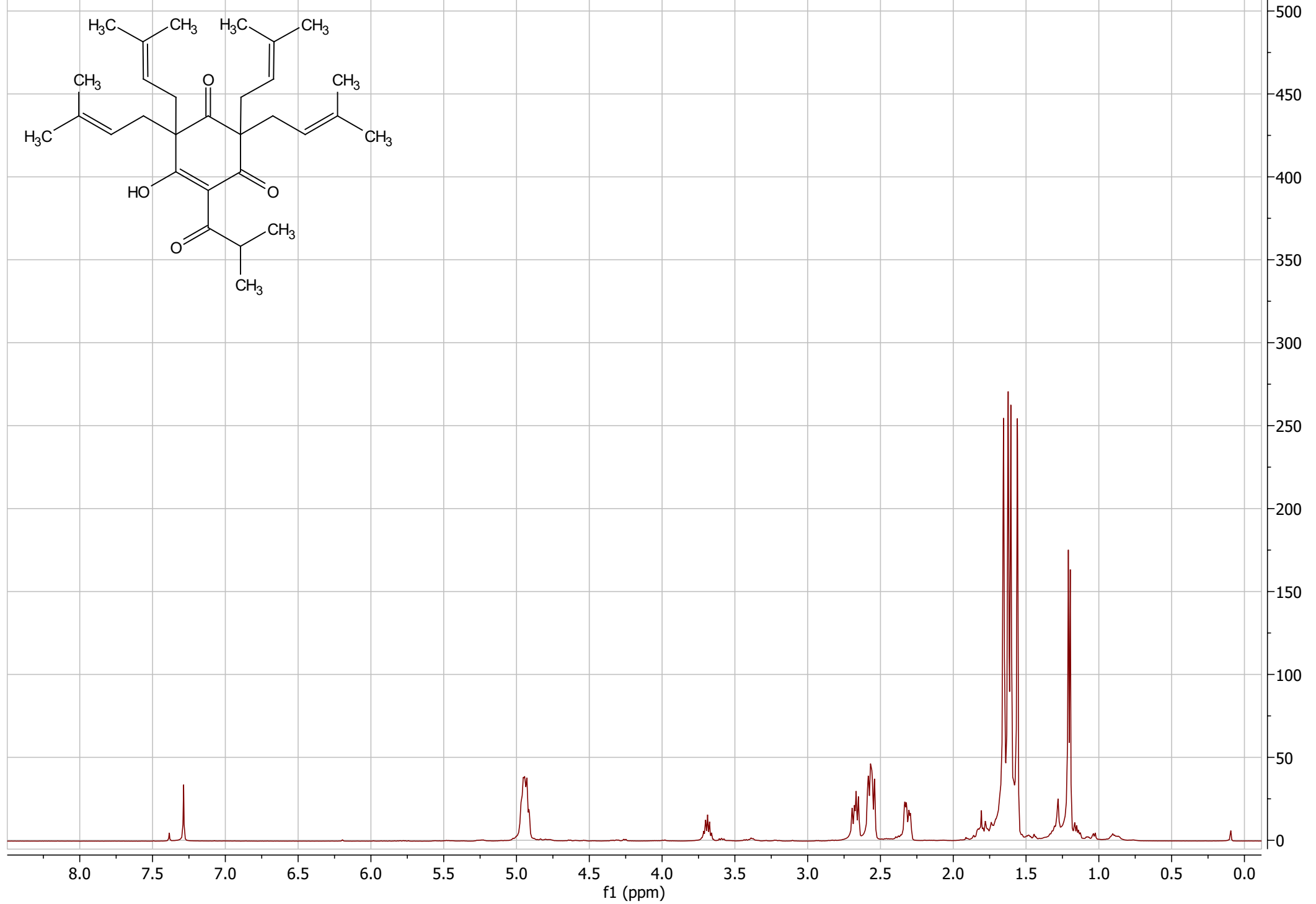
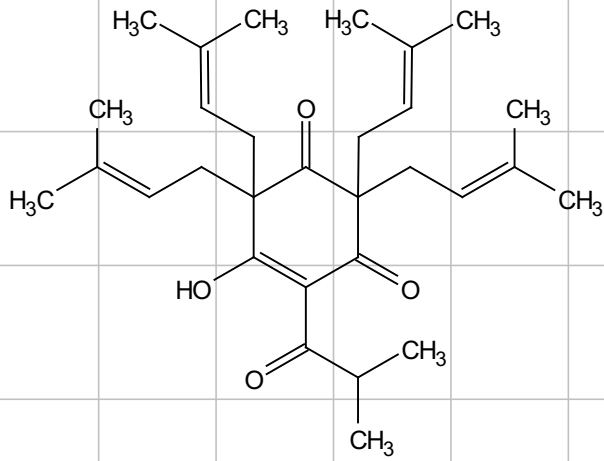




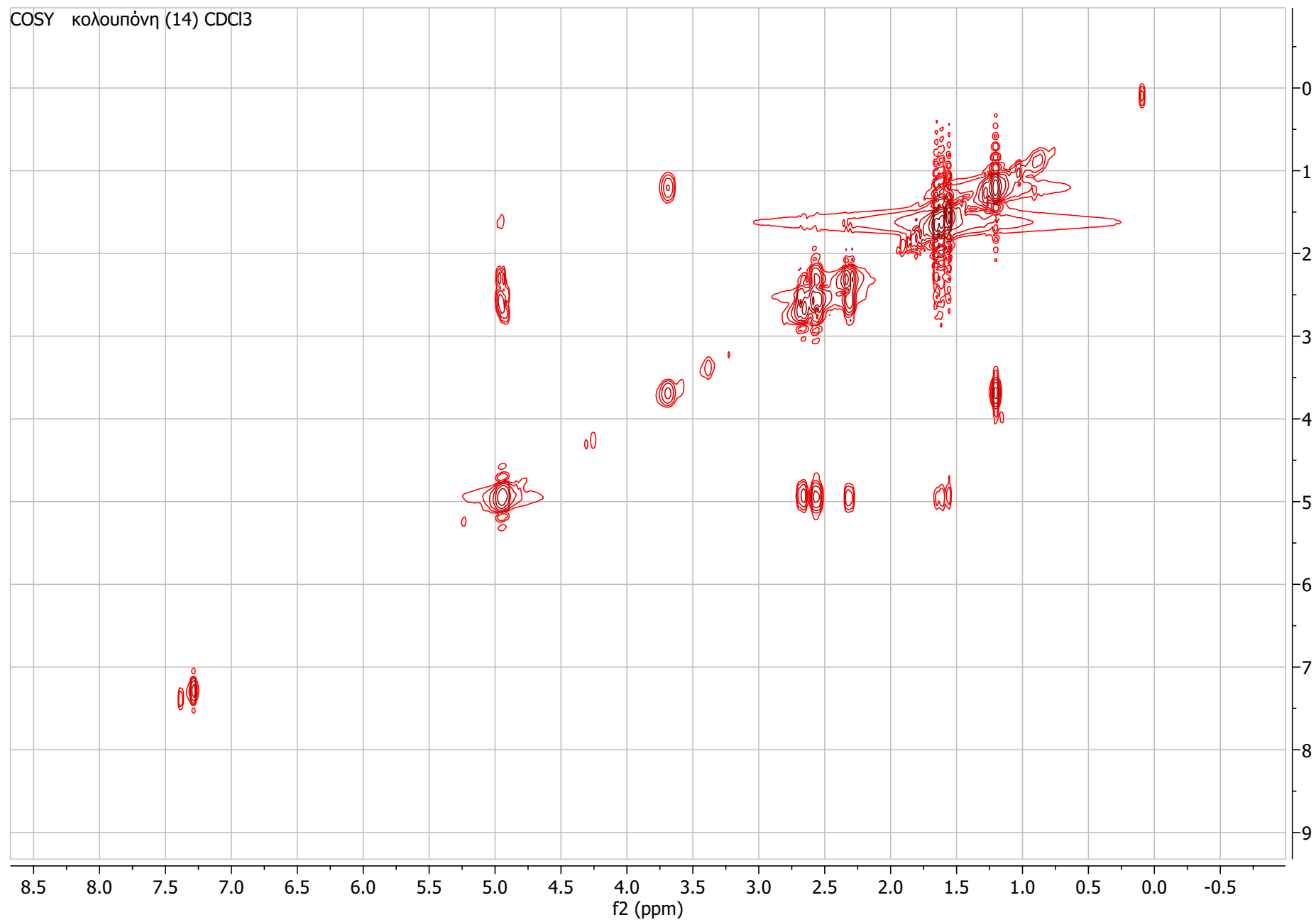
<sup>1</sup>HNMR κολουπουλόνη (3) CDCl<sub>3</sub>



<sup>1</sup>HNMR κολουπόνη (14) CDCl<sub>3</sub>



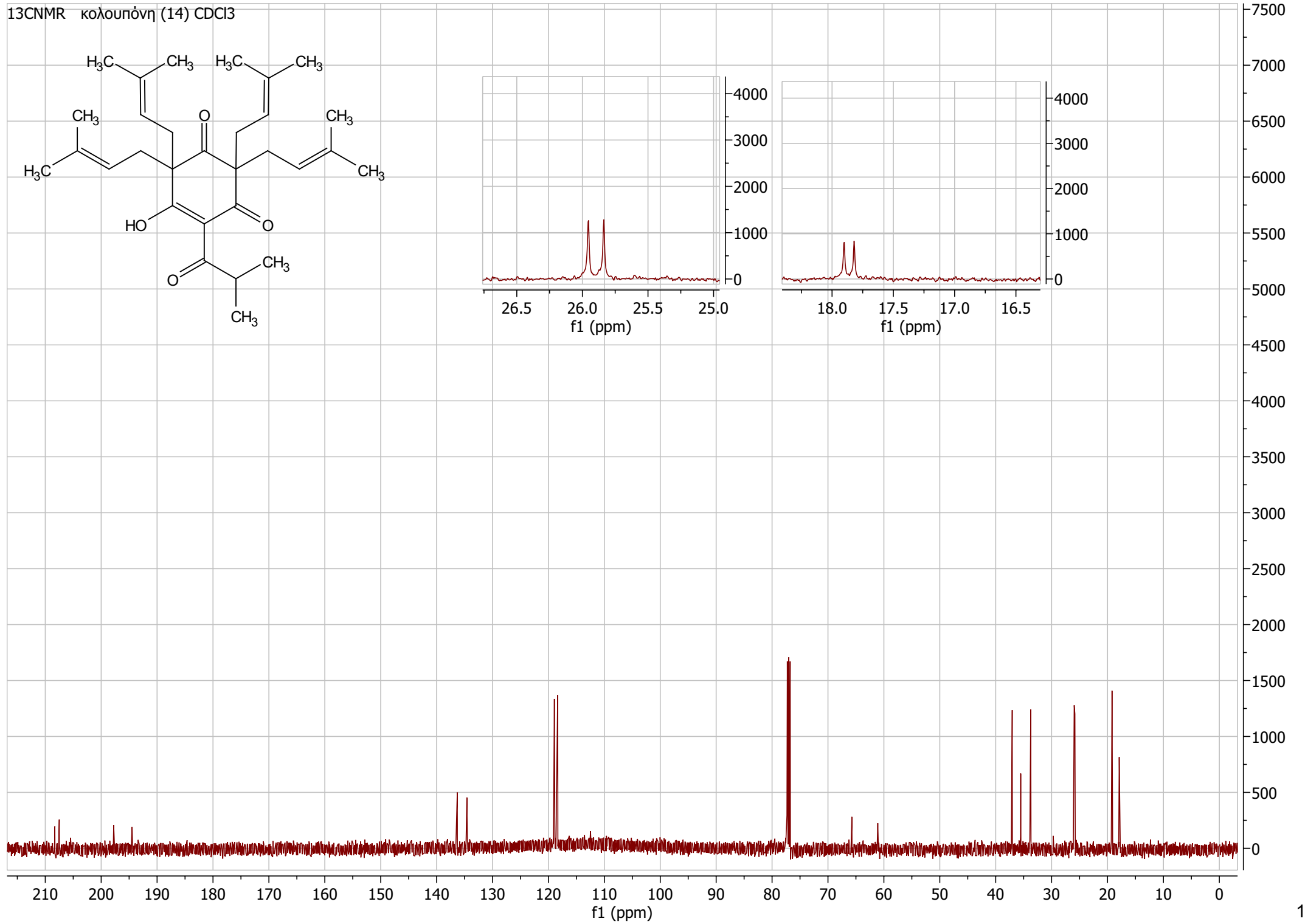
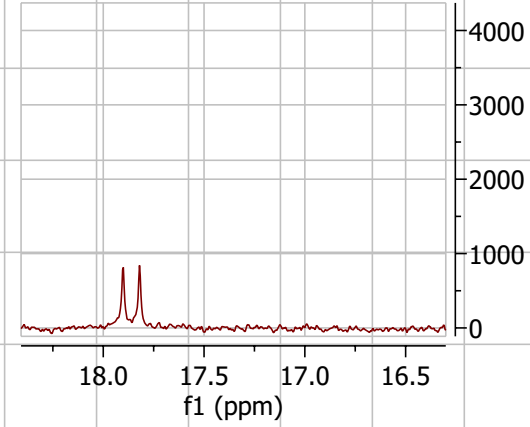
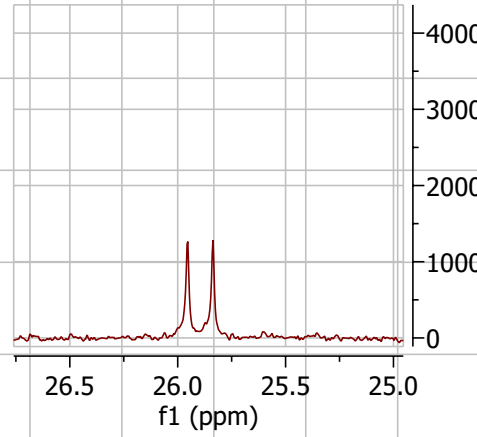
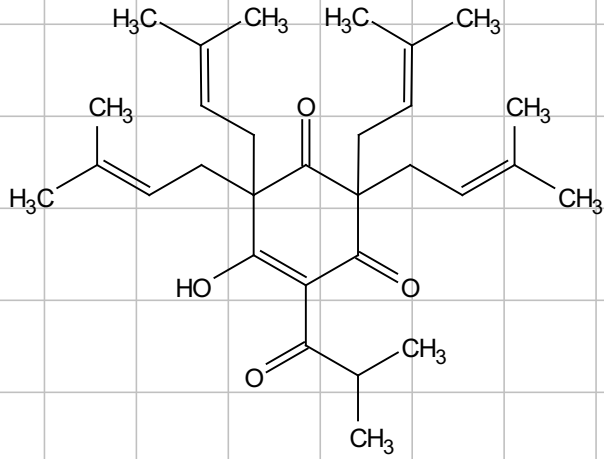
COSY κολουπόνη (14) CDCl<sub>3</sub>



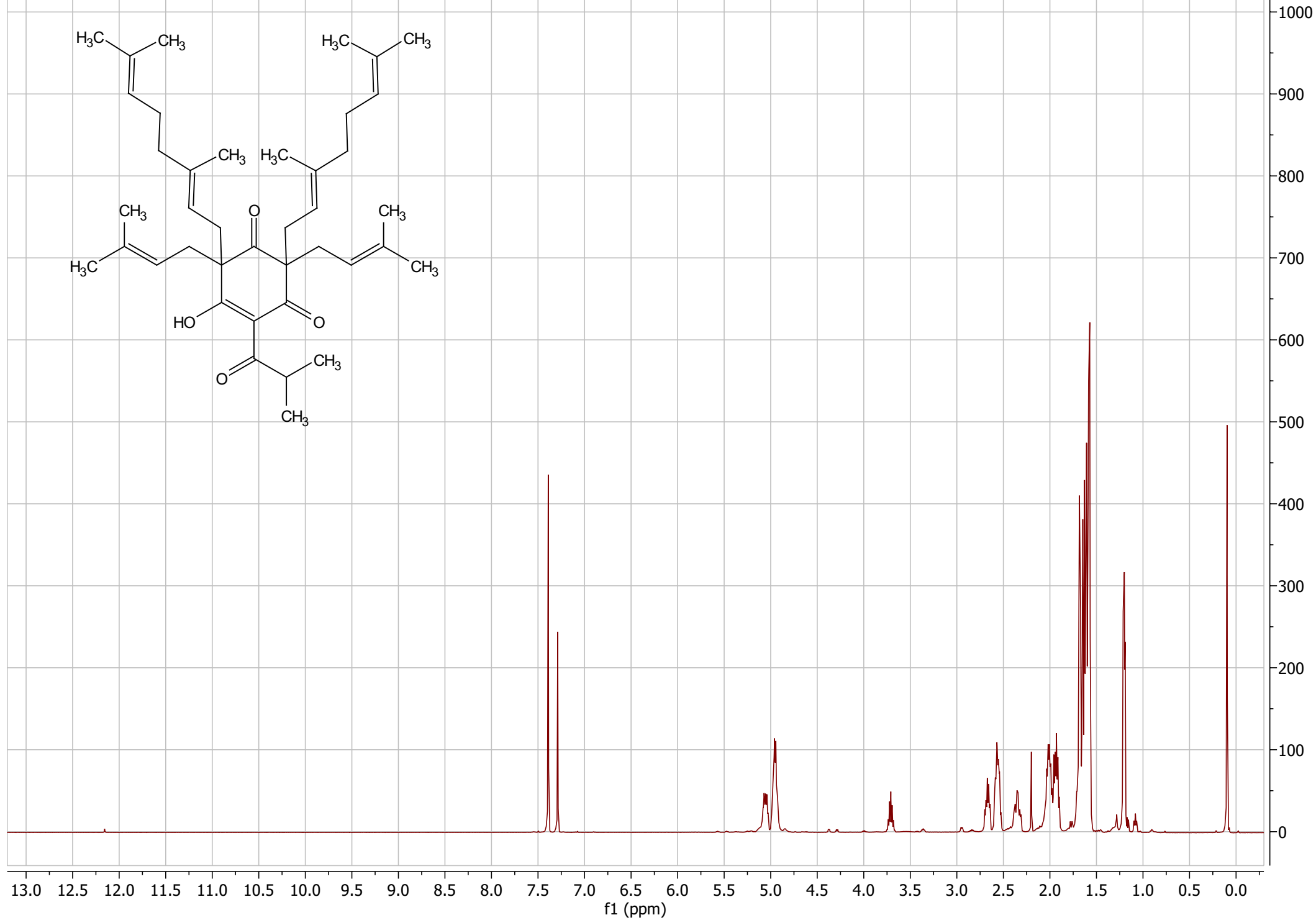
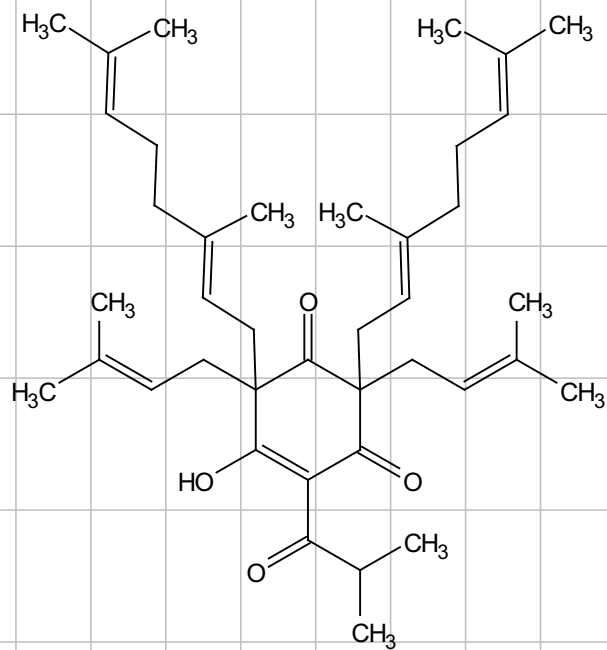
f1 (ppm)

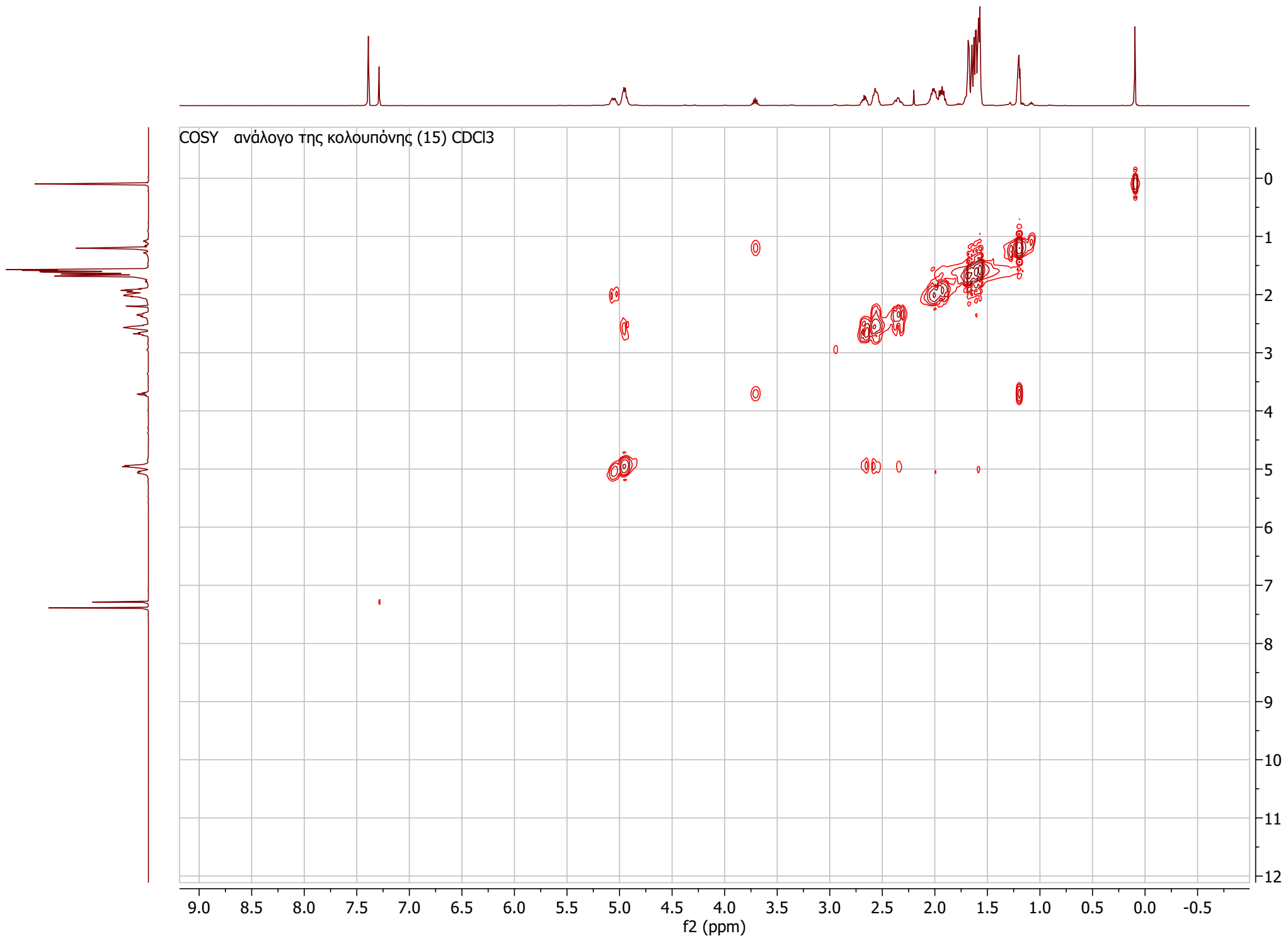
f2 (ppm)

<sup>13</sup>CNMR κολουπόνη (14) CDCl<sub>3</sub>

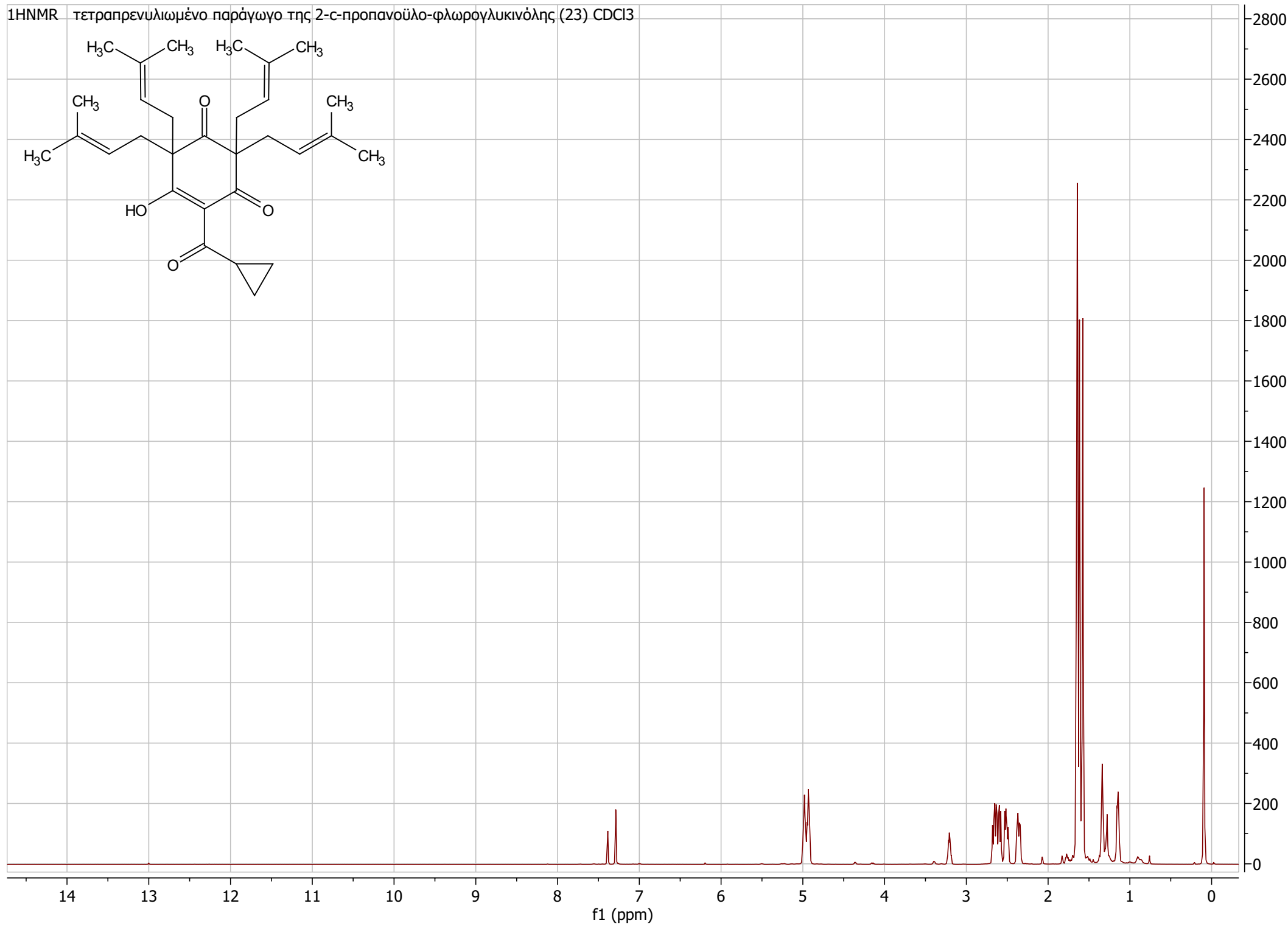
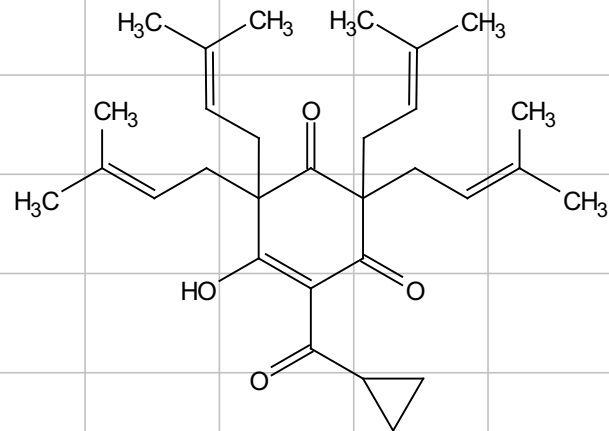


<sup>1</sup>HNMR ανάλογο της κολουπώνης (15) CDCl<sub>3</sub>



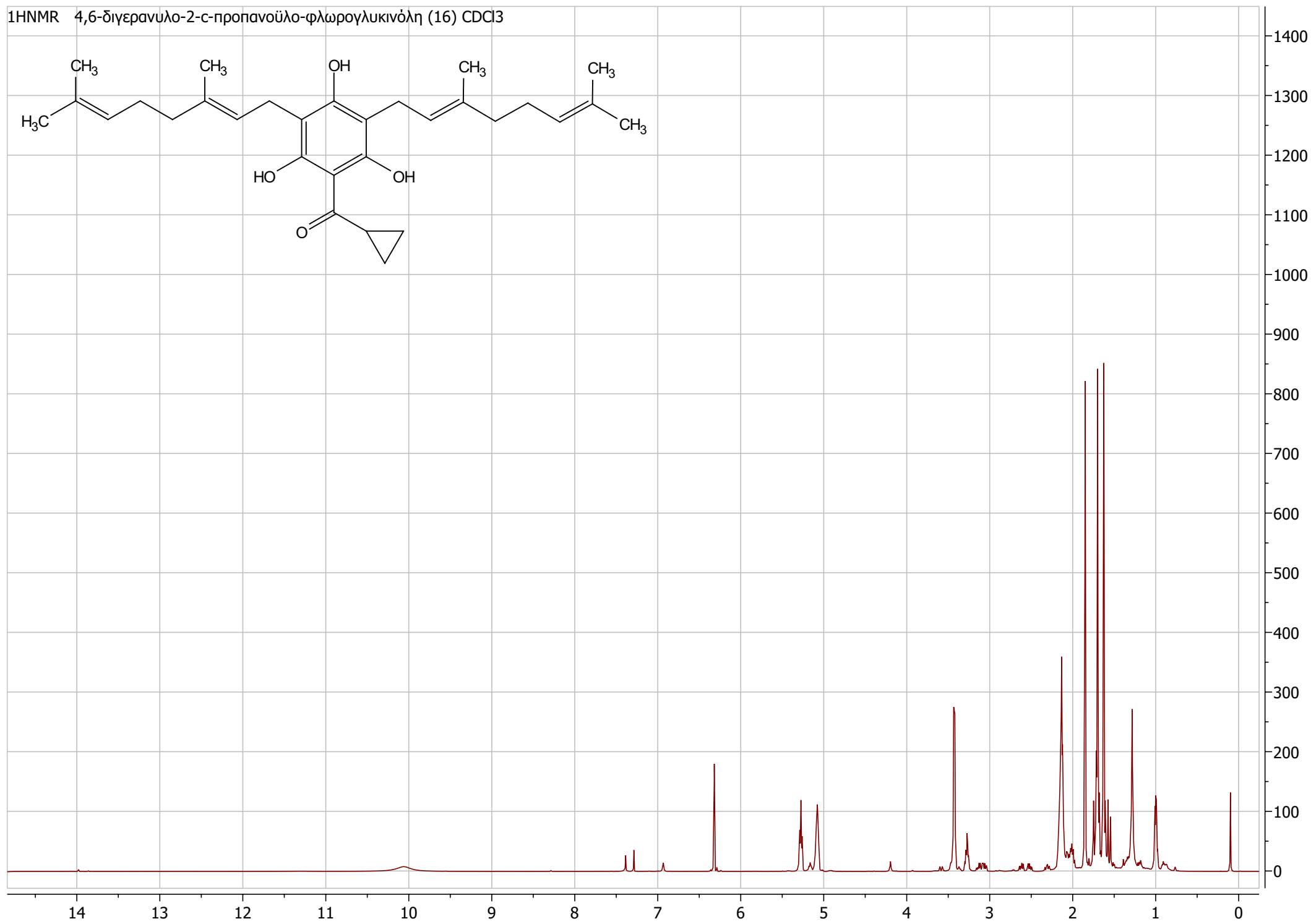
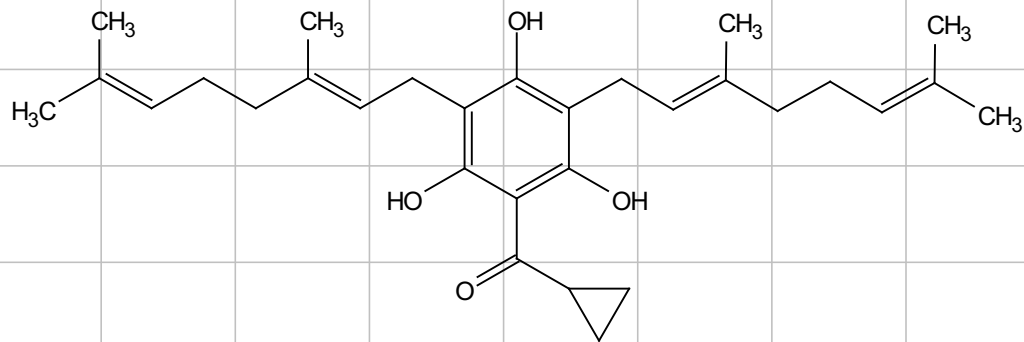


<sup>1</sup>HNMR τετραπρενυλιωμένο παράγωγο της 2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλης (23) CDCl<sub>3</sub>

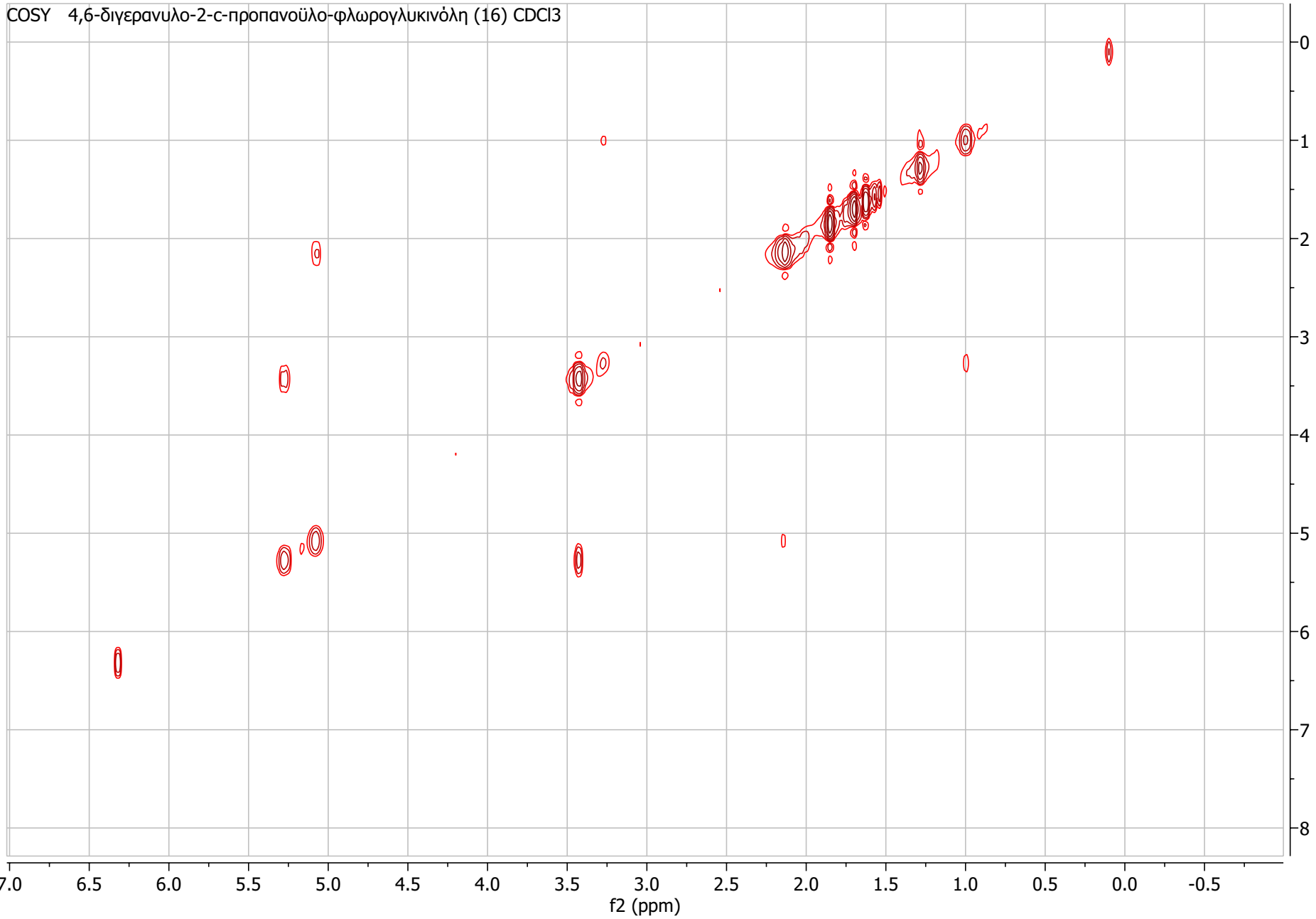




<sup>1</sup>H NMR 4,6-διγερανύλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη (16) CDCl<sub>3</sub>



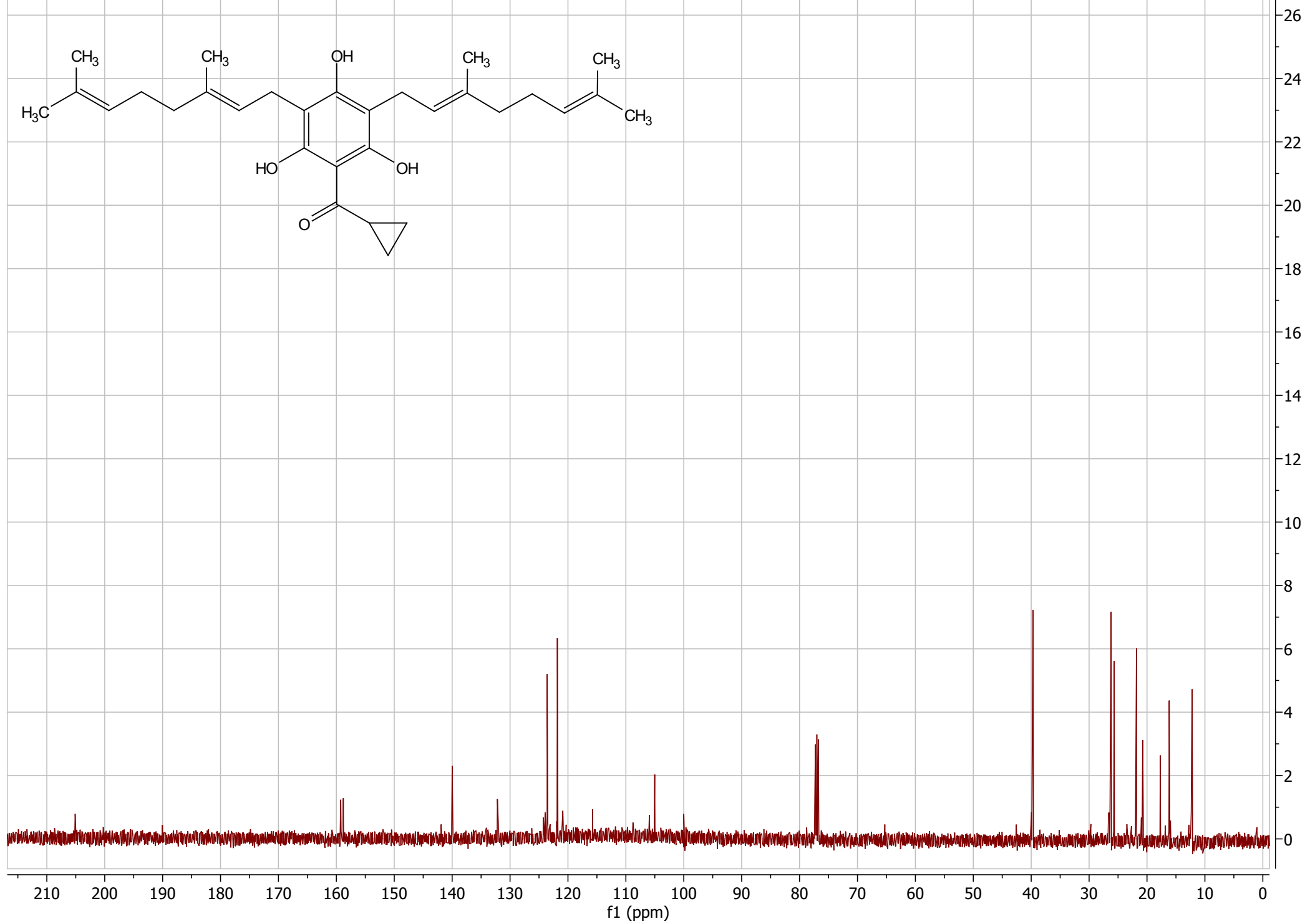
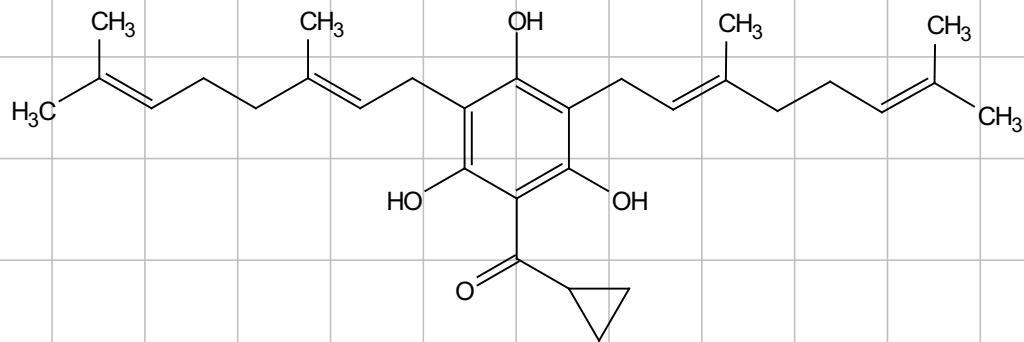
COSY 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη (16) CDCl<sub>3</sub>



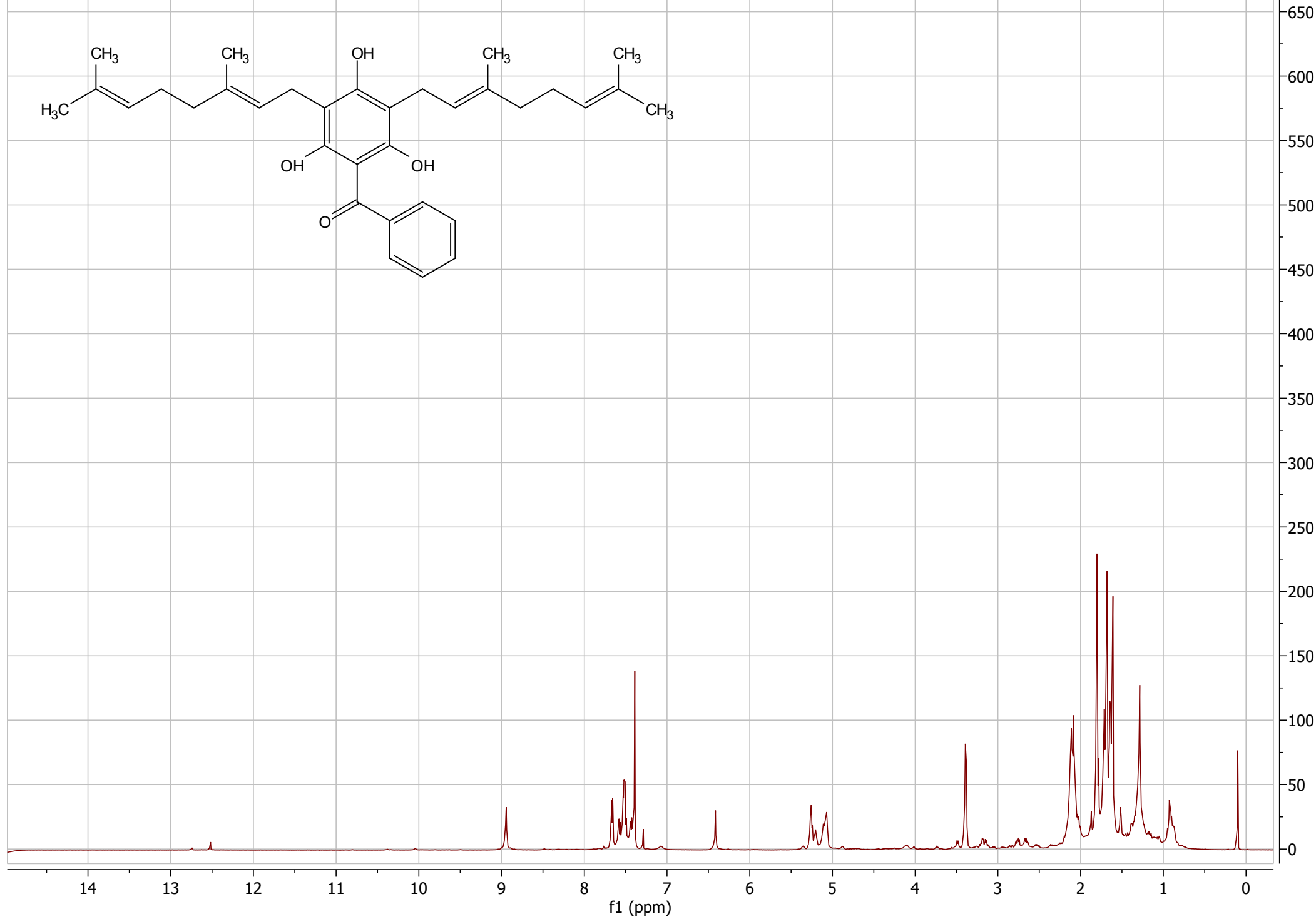
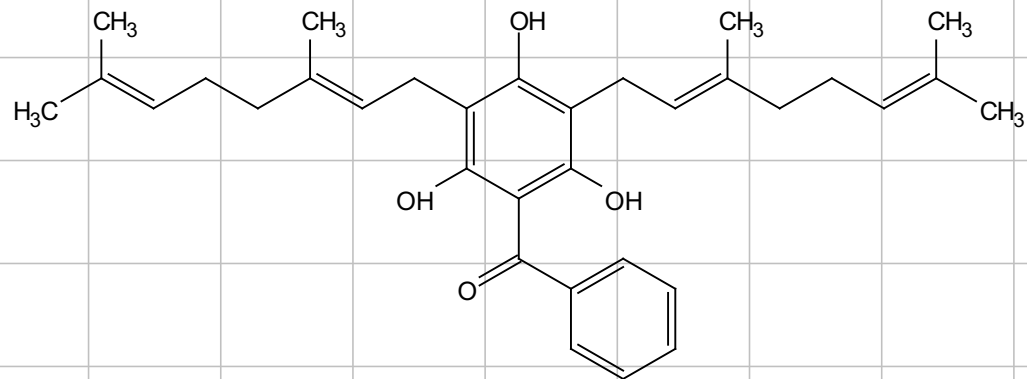
f1 (ppm)

f2 (ppm)

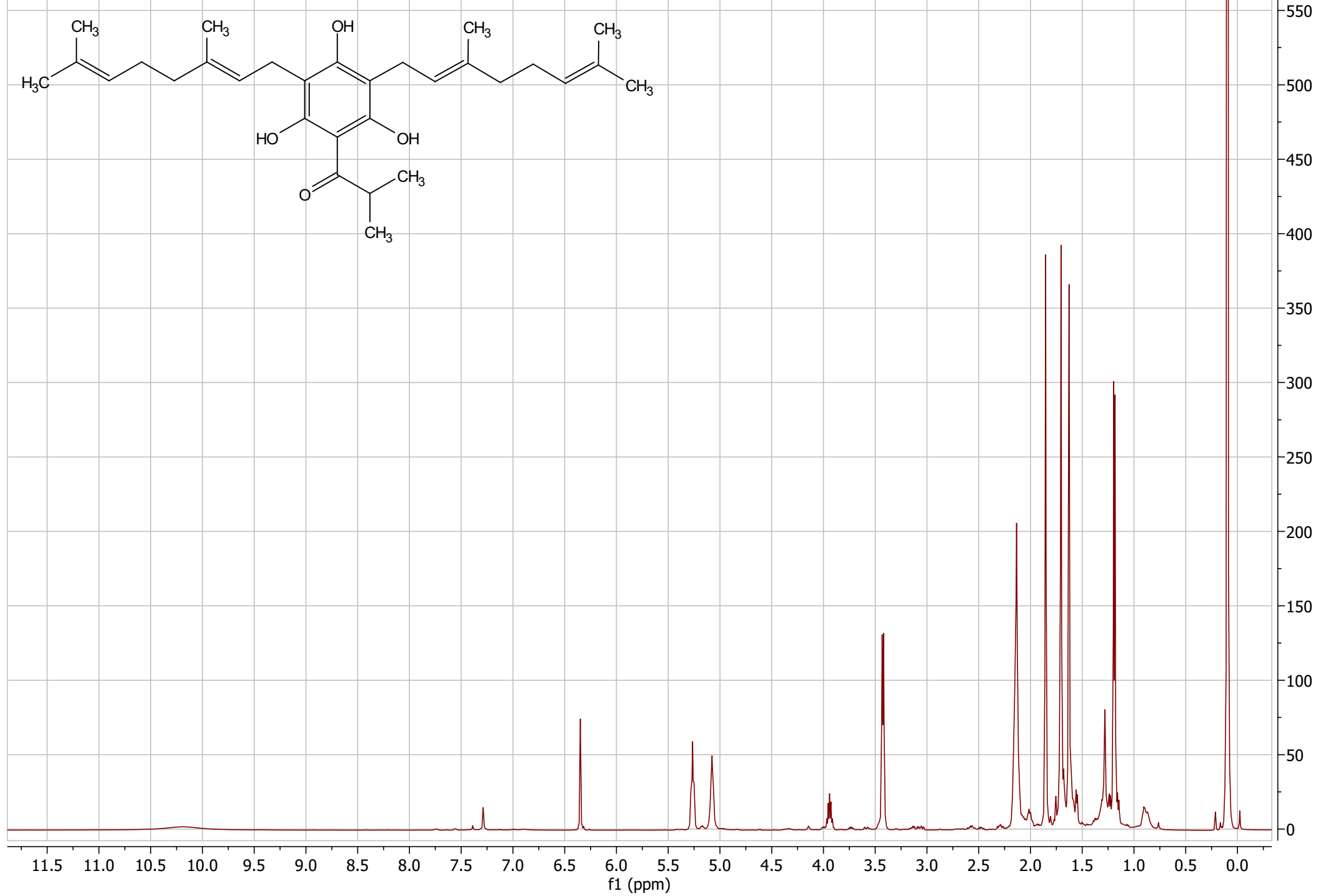
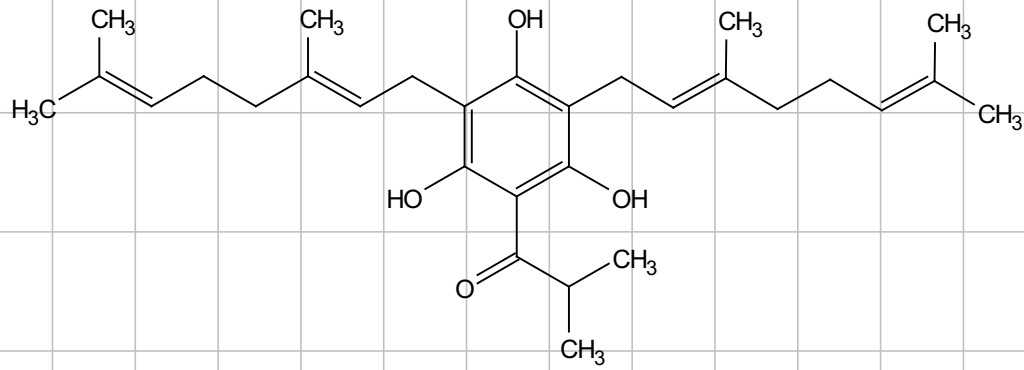
<sup>13</sup>CNMR 4,6-διγερανυλο-2-σ-προπανούλο-φλωρογλυκινόλη (16) CDCl<sub>3</sub>



<sup>1</sup>HNMR 4,6-διγερανυλο-2-βενζοϋλο-φλωρογλυκινόλη (18) CDCl<sub>3</sub>



<sup>1</sup>HNMR 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυρυλο-φλωρογλυκινόλη (19) CDCl<sub>3</sub>





<sup>13</sup>CNMR 4,6-διγερανυλο-2-ισοβουτυριλο-φλωρογλυκινόλη (19) CDCl<sub>3</sub>

