

---

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

---

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ  
ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ *DITTRICHIA VISCOSA*  
ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ  
ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ *VARROA DESTRUCTOR*

**ΣΟΦΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ  
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2007

---

**MASTER OF SCIENCE**

---

ISOLATION, STRUCTURE ELUCIDATION AND USE OF COMPONENTS  
FROM THE PLANT *DITTRICHIA VISCOSA*  
AGAINST THE BEE PARASITE *VARROA DESTRUCTOR*

**SOFOU KALLIOPI**

RESEARCH ADVISOR: Prof. H. E. KATERINOPOULOS

E.P.E.A.E.K., EDUCATIONAL PROGRAM  
«ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH  
BIOLOGICAL ACTIVITY»

DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF CRETE

OCTOBER 2007

*Στην ανιψιά μου, Αννούλα*

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ (*Επιβλέπων*)

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Φ. ΝΤΑΗΣ

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γ. ΒΑΣΙΛΙΚΟΓΙΑΝΝΑΚΗΣ

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

- ◆ Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε, καθώς και τα προγράμματα ΕΠΕΑΕΚ, *CRINNO* και *ΦΥΤΩΡΙΟ ΙΔΕΩΝ* για την οικονομική υποστήριξη της παρούσας εργασίας.
- ◆ Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο που με επέλεξε να εργαστώ στο εργαστήριό του και που με τόση υπομονή με καθοδηγούσε, με συμβούλευε και ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή εύκολη ή δύσκολη.
- ◆ Ευχαριστώ τους καθηγητές κ. Φώτη Νταή & κ. Γιώργο Βασιλικογιαννάκη που δέχθηκαν να κρίνουν την ερευνητική μου εργασία.
- ◆ Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Απόστολο Σπύρο για την βοήθεια του στη λήψη και στη μελέτη των φασμάτων NMR.
- ◆ Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου μου: Μανόλη Ρουσάκη, Γιώργο Τσικαλά και Αντώνη Κοκολάκη για την συνεργασία μας, αλλά ξεχωριστά θέλω να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στη φίλη Στέλλα Βουτσαδάκη που με τόση υπομονή και προθυμία ήταν κάθε στιγμή δίπλα μου να με βοηθάει στην κάθε μικρή ή μεγάλη δυσκολία που συναντούσα.
- ◆ Ευχαριστώ τον καθηγητή Δρ. Αθανάσιο Γιάννη από το εργαστήριο της Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Λειψίας για τη συνεργασία μας.
- ◆ Ευχαριστώ όλους τους φίλους και συμφοιτητές μου από το Πανεπιστήμιο Κρήτης για την ωραία μας παρέα που έκαναν την φοιτητική μου ζωή ακόμα καλύτερη.
- ◆ Ευχαριστώ τις πολύτιμες φίλες μου Μαρία Καρύδη, Διονυσία Ζερβάνου και Μαρία Αδαμαντίδη που υπάρχουν στη ζωή μου για να την γεμίζουν γέλιο και αισιοδοξία.
- ◆ Ευχαριστώ τον φίλο μου Χάρη Χήτα που με την αγάπη του με στηρίζει και μου ομορφαίνει την κάθε στιγμή.
- ◆ Ευχαριστώ τους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την ανεξάντλητη αγάπη και φροντίδα που μου προσφέρουν μέσα από την καρδιά τους και θα τους είμαι ευγνώμον για όλη μου τη ζωή.

...ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους σας!

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</u></b>	vii
<b><u>CURRICULUM VITAE</u></b>	x
<b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u></b>	xiii
<b><u>ABSTRACT</u></b>	xiv
<b><u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>	1
1.1 Γενικά για τη μέλισσα	1
1.1.1 Η μέλισσα <i>Apis mellifera</i>	2
1.2 Το παράσιτο <i>Varroa destructor</i>	4
1.3 Το φυτό <i>Dittrichia viscosa</i>	9
<b><u>2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ</u></b>	13
<b><u>3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ</u></b>	14
3.1 <i>Αέρια Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μαζών (GC/MS)</i>	14
3.1.1 Ποιοτική ανάλυση και σύστημα κατακράτησης Kovats	14
3.1.2 Δείκτες κατακράτησης στη γραμμικά θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία	16
3.2 <i>Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)</i>	18
3.2.1 Γενικά για την Μονοδιάστατη Φασματοσκοπία NMR	18
3.2.2 Γενικά για την Δισδιάστατη Φασματοσκοπία NMR (2D NMR)	21
3.2.3 Ομοπυρηνικά Πειράματα Συσχέτισης: COSY και NOESY	24
3.2.4 Ετεροπυρηνικά Πειράματα Συσχέτισης: HMQC και HMBC	28
<b><u>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	32
4.1 <i>Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του δραστικού συστατικού της <i>Dittrichia viscosa</i> (L.)</i>	36
4.2 <i>Ανάλυση Φασμάτων NMR μίας διάστασης</i>	37
4.3 <i>Ανάλυση Δισδιάστατων Φασμάτων NMR</i>	43
4.3.1 <i>Ανάλυση Φάσματος <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H Gcosy</i>	43
4.3.2 <i>Ανάλυση Φάσματος C-H gHMQC</i>	44
4.3.3 <i>Ανάλυση Φάσματος C-H gHMBC (long range)</i>	46
4.3.4 <i>Ανάλυση Φάσματος NOESY</i>	48
4.4 <i>Ανάλυση του αιθέριου ελαίου της <i>Dittrichia viscosa</i></i>	51
<b><u>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>	52
<b><u>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u></b>	59
<b><u>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	60
<b><u>8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ</u></b>	65

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ**

ΟΝΟΜΑ	ΚΑΛΛΙΟΠΗ
ΕΠΩΝΥΜΟ	ΣΟΦΟΥ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	01/12/1982
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΚΩΣ-ΔΩΔΕΚΑΝΗΣΑ
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ
ΜΟΝΙΜΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ	ΑΡΤΕΜΙΣΙΑΣ 1, 85 300, ΚΩΣ, ΔΩΔΕΚΑΝΗΣΑ
ΠΡΟΣΩΡΙΝΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ	ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΗ 25, 71 306, ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΚΡΗΤΗ, ΕΛΛΑΔΑ
ΤΗΛΕΦΩΝΟ	001 22420 26158
ΚΙΝΗΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ	6945509440
e-mail	<a href="mailto:sofou@chemistry.uoc.gr">sofou@chemistry.uoc.gr</a>

### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

- 2000-2005 Πτυχίο Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα.
- 1/2005-7/2005 Συμμετοχή στο πρόγραμμα «Socrates-Erasmus» σε συνεργασία με τα τμήματα Χημείας και Φαρμακευτικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Φλωρεντίας και Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Περούτζιας, Ιταλία. Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα «*Σύνθεση δύο γλυκογαλλικών παραγώγων & μέτρηση της αντιμυκητιασικής δραστηρότητάς τους. Μελέτη αντίστοιχων ενώσεων σε εκχυλίσματα φυτικών ιστών*». Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Prof. Cristina Nativi.
- 2005- Υποψήφια Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: «Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστηρότητα», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα.

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- 6/2004-10/2004 Πλήρης απασχόληση στον Βιολογικό Καθαρισμό της Δ.Ε.Υ.Α.Κ. του Δήμου Κω, στα πλαίσια πρακτικής άσκησης.
- 1/2005-7/2005 Εργαστηριακή απασχόληση, στα Πανεπιστήμια της Φλωρεντίας και Περούτζιας, Ιταλία.
- 10/2005-11/2005 Επιστημονικός βοηθός, Ομάδα Φυσικών Προϊόντων, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας (επιβλέπων: Χ.Ε. Κατερινόπουλος), υπό την αιγίδα του περιφερειακού προγράμματος CRINNO-HEI NET, Κρήτη, Ελλάδα.

7/2007-9/2007 Γραμματειακή υποστήριξη του EC ERASMUS: Εντατικό Πρόγραμμα 31388-IC-11-2005-1-GR-ERASMUS-IPUC-1, επονομαζόμενο ως «SYNAPS» - Σύνθεση και Ρετροσύνθεση στη Χημεία Φυσικών Προϊόντων.

9/2006-6/2007 Εργαστηριακός βοηθός, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα.

### **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ Η/Υ**

Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Power Point, Origin, Fortran 77, ChemDraw, MestRe-C, ChemProtect

### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ**

Gas Chromatography, GC/MS, NMR, FT-IR, HPLC, HPLC/MS, LLE, LSE

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

First Certificate in English (University of Cambridge).

Certificate of Competency in English (University of Michigan).

Italian-CELI 2.

Italian-Certificato di Frequenza con Valutazione (Universita degli Studi di Firenze), Livello: B2.

### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

6/2006 *«Παρασκευή ιδιοσκευάσματος για την αντιμετώπιση του παρασίτου Varroa destructor με χρήση εκχυλισμάτων φυτών από την χλωρίδα της Κρήτης», Έκθεση «Εβδομάδα Επιστήμης και Τεχνολογίας», Ζάππειο Μέγαρο, Αθήνα, Ελλάδα.*

4/2007 2<sup>ο</sup> Ελληνικό Συμπόσιο Οργανικής Σύνθεσης με θέμα: *«Από τη Χημεία στη Βιολογία, στην Ιατρική και στην Επιστήμη Υλικών»*. Αθήνα. Απρίλιος 19-21, 2007.



## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. B. Turchetti, P. Arapitsas, D. Tacconi, K. Sofou, P. Buzzini, E. Branda, S. Menichetti, C. Nativi, A. Romani  
*In vitro* synergistic activity between amphotericin B and 2,3-digalloyl-methyl-O-glucose against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Issatchenkia orientalis*.  
Manuscript in Preparation.
2. K. Sofou, D. Isaakidis, A. Giannis, H. E. Katerinopoulos  
Use of costic acid, a natural extract from *Dittrichia viscosa*, for the control of *Varroa destructor*, a parasite of *Apis mellifera*.  
Manuscript in Preparation.

## ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ

Καθ. Χαράλαμπος Ε. Κατερινόπουλος, Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης 71003, Ηράκλειο, Κρήτης,  
Ελλάδα.

Καθ. Cristina Nativi, Τμήμα Οργανικής Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Φλωρεντίας, 50019, Φλωρεντία, Ιταλία.

Καθ. Annalisa Romani, Τμήμα Φαρμακευτικής  
Χημείας, Πανεπιστήμιο Φλωρεντίας, U. Schiff,  
6 – 50019, Sesto F.no, Ιταλία.

Καθ. Pietro Buzzini, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο  
Περούτζιας, Borgo XX Giugno 74 – 06121, Ιταλία.

## CURRICULUM VITAE

### PERSONAL INFORMATION

FIRST NAME KALLIOPI  
LAST NAME SOFOU  
DATE OF BIRTH 01/12/1982  
PLACE OF BIRTH KOS  
NATIONALITY GREEK  
PERMANENT ADDRESS: ARTEMISISAS 1, 85 300, KOS, GREECE  
CURRENT ADDRESS KONSTANTINIDI 25, 71 306, HERAKLION,  
CRETE, GREECE  
TELEPHONE 001 22420 26158  
MOBILE PHONE 6945509440  
e-mail [sofou@chemistry.uoc.gr](mailto:sofou@chemistry.uoc.gr)

### EDUCATION

2000-2005 B.Sc., Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion, Greece.

1/2005-7/2005 “Socrates-Erasmus” Student at the Departments of Chemistry and Pharmaceutical Chemistry, University of Florence and Agricultural University of Perugia, Italy. Undergraduate thesis on “Synthesis of Two Glycogallic Analogs and Study of their Antimycotic Activity. Studies on Related Compounds in Plant Tissue”. Supervisor: Prof. Cristina Nativi.

2005- M.Sc. Candidate, Graduate School, Department of Chemistry, University of Crete, Greece. Graduate Program on “Isolation and Synthesis of Natural Products with Biological Activity.

### PROFESSIONAL EXPERIENCE

6/2004-10/2004 Full time employee at the Waste Control Unit of the Municipality of Kos, as part of the Industrial Training undergraduate course.

1/2005-7/2005 Research Assistant, Universities of Florence and Perugia, Italy.

10/2005-11/2005 Research Assistant, Natural Product Group, Organic Chemistry Laboratory (H.E. Katerinopoulos supervisor) under the CRINNO-HEI NET Regional Program, Crete, Greece.

- 7/2007-9/2007 Secretariat of the EC ERASMUS: Intensive Program 31388-IC-11-2005-1-GR-ERASMUS-IPUC-1, titled "SYNAPS"- Synthesis and Retrosynthesis in the Chemistry of Natural Products.
- 9/2006-6/2007 Teaching Assistant, Organic Chemistry II Laboratory for chemistry major students, Department of Chemistry, University of Crete

### **COMPUTER PROGRAMS**

Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Power Point, Origin, Fortran 77, ChemDraw, MestRe-C, ChemProtect

### **TECHNICAL SKILLS**

Gas Chromatography, GC/MS, NMR, FT-IR, HPLC, HPLC/MS, LLE, LSE

### **LANGUAGES**

First Certificate in English (University of Cambridge).

Certificate of Competency in English (University of Michigan).

Italian-CELI 2.

Italian-Certificato di Frequenza con Valutazione (Universita degli Studi di Firenze), Livello: B2.

### **PARTICIPATION IN SCIENTIFIC MEETINGS**

- 6/2006 *"Preparation of a recipe for the control of Varroa destructor using extract of plants from the Flora of Crete"* Participation in the Exhibition "Science and Technology Week" Zappeion, Athens, Greece.
- 4/2007 2<sup>nd</sup> Hellenic Symposium of Organic Synthesis: From Chemistry to Biology, Medicine and Materials Science. Athens April 19-21, 2007.

## **PRESENTATIONS-PUBLICATIONS**

1. B. Turchetti, P. Arapitsas, D. Tacconi, K. Sofou, P. Buzzini, E. Branda, S. Menichetti, C. Nativi, A. Romani  
*In vitro* synergistic activity between amphotericin B and 2,3-digalloyl-methyl-O-glucose against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Issatchenkia orientalis*.  
Manuscript in Preparation.
2. K. Sofou, D. Isaakidis, A. Giannis, H. E. Katerinopoulos  
Use of costic acid, a natural extract from *Dittrichia viscosa*, for the control of *Varroa destructor*, a parasite of *Apis mellifera*.  
Manuscript in Preparation.

## **RECOMMENDATIONS**

Prof. Haralambos E. Katerinopoulos, Department of Chemistry, University of Crete 71 003, Heraklion Crete, Greece.

Prof. Cristina Nativi, Department of Organic Chemistry, University of Florence, 50019, Florence, Italy.

Prof. Annalisa Romani, Department of Pharmacy University of Florence, U. Schiff, 6 – 50019, Sesto F.no, Italy.

Prof. Pietro Buzzini, Department of Agriculture, University of Perugia, Borgo XX Giugno 74 – 06121, Italy.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πλέον δραστικού συστατικού από το φυτό *Dittrichia viscosa*, το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του παρασίτου *Varroa destructor* της μέλισσας *Apis mellifera*, με σκοπό την παρασκευή σχετικού σκευάσματος.

Παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα της μελέτης της δομής του συστατικού αυτού, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως το costic acid. Σειρά πειραμάτων απέδειξε ότι το costic acid δρα κατά του παρασίτου χωρίς να έχει τοξικές επιπτώσεις στη μέλισσα. Επίσης, τα πειράματα πεδίου φανέρωσαν ότι το costic acid δεν έχει καμία τοξική επίδραση ούτε στην κυψέλη και κατά συνέπεια ούτε στο μέλι.

Εκμεταλλεόμενοι τις ιδιότητες αυτές, μπορούμε να προχωρήσουμε στην βιομηχανική παρασκευή ενός οικολογικού, ασφαλούς, οικονομικού και εύκολου στη χρήση προϊόντος για τους μελισσοκόμους με σκοπό την καταπολέμηση της βαρρόωσης, μία από τις σοβαρότερες ασθένειες των μελισσών.

Επίσης παρουσιάζεται η ανάλυση των συστατικών του αιθέριου ελαίου της *Dittrichia viscosa* και τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα.

**Λέξεις Κλειδιά:** *Dittrichia viscosa*, *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, varroosis, costic acid.

## ABSTRACT

This thesis includes results on the isolation and identification of the active component from the extract of the leaves of *Dittrichia viscosa*, a shrub growing in the area of Crete, Greece. The plant is traditionally used by bee keepers as a means of controlling the parasite known as *Varroa destructor*, that causes *varroosis*, a serious disease of the common bee, *Apis mellifera*.

The spectral study leading to the identification of the active component as a terpenoid known with the name of costic acid is presented, as well as data clarifying discrepancies on the NMR data of the compound that appear in the literature.

*In vivo* assays indicated that costic acid acts against the parasite with high efficacy without any toxic effects on the common bee. Moreover, preliminary field tests indicated that no toxic effects were found in the bee hives after the experiments meaning that the honey produced by the bees is free of costic acid.

The above results strongly suggest that costic acid may be used as the basic component for the formulation of an environmentally safe product that can be used against *varroosis*.

The analysis of the components of the essential oil of *Dittrichia viscosa* is also presented in the thesis, and the data are compared to those of related studies reported in the scientific literature.

**Key words:** *Dittrichia viscosa*, *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, varroosis, costic acid.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά για τη μέλισσα

Η μέλισσα είναι έντομο που ανήκει στην τάξη υμενόπτερα και θεωρείται από οικονομικής άποψης το πιο σπουδαίο από όλα τα έντομα για τον άνθρωπο.

Η μέλισσα ζει στη Γη το λιγότερο 15 εκατομμύρια χρόνια και θεωρείται από τους πιο παλιούς κατοίκους της, που εξακολουθεί να υπάρχει ακόμη και σήμερα. Είναι από τα ελάχιστα είδη των εντόμων που ο άνθρωπος προσπάθησε να εκμεταλλευτεί, βλέποντας ότι θα είχε κάποιο οικονομικό όφελος.

Το σώμα της μέλισσας αποτελείται από τρία μέρη: το κεφάλι, το θώρακα και την κοιλιά, συνολικού μήκους 1,5 εκ. περίπου. Η μέλισσα έχει τρίχωμα διαφορετικού χρώματος στο σώμα της. Αυτές οι τρίχες κάνουν τις ρίγες των μελισσών να φαίνονται καφέ και κίτρινες. Στο κεφάλι της έχει δεξιά και αριστερά δύο μεγάλα μάτια, που αποτελούνται από 13.000 περίπου μικρά μάτια το καθένα και έτσι έχει τη δυνατότητα να βλέπει ταυτόχρονα μπροστά, πίσω, πάνω και κάτω. Στο κέντρο του κεφαλιού της έχει ακόμα τρία απλά μάτια, που σχηματίζουν τρίγωνο. Έχει δυο κεραίες, που είναι σαν δέκτες ραδιοφώνου. Είναι τα όργανα της ακοής και της όσφρησης.

Στο στόμα η μέλισσα έχει μια γλώσσα μακριά, παχιά και εύκαμπτη. Στην άκρη είναι σαν προβοσκίδα με μικρό κουταλάκι, που είναι μαζί όργανο αφής και γεύσης. Όταν δεν τη μεταχειρίζεται, την κρατά κουλουριασμένη στην κοιλιά της. Με την προβοσκίδα ρουφά το νέκταρ από τα λουλούδια.

Από το θώρακα ξεφυτρώνουν δυο ζευγάρια διάφανα, λεπτά αλλά δυνατά φτερά, σαν μεμβράνη από ζελατίνη, ώστε να μπορεί να πετάξει μακριά για τροφή. Το γρήγορο κούνημα των φτερών τους προκαλεί ένα χαρακτηριστικό ήχο, το γνωστό μας «ζουζούνισμα».

Τα 6 πόδια της μέλισσας είναι κι αυτά τριχωτά και τελειώνουν στις άκρες τους σε νύχια αγκιστρωτά. Στα πίσω πόδια της έχει μικρές κοιλότητες, που λέγονται καλάθια. Αυτά μοιάζουν σαν κίτρινα μπαλόνια, γιατί εκεί βάζει τη γύρη από τα άνθη.

Η κοιλιά είναι χωρισμένη σε δακτυλίους, που ανάμεσά τους βρίσκονται οι κηρογόνοι αδένες. Ο τελευταίος από τους δακτυλίους έχει το κεντρί. Τα αρσενικά δεν διαθέτουν ούτε κηρογόνους αδένες ούτε κεντρί.

### 1.1.1 Η μέλισσα *Apis mellifera*

Η μέλισσα μελιτοφόρος (*Apis mellifera*), όπως επίσημα λέγεται η μέλισσα, είναι κοσμοπολίτικο, κοινωνικό έντομο, με μεγάλη οικονομική και οικολογική σημασία και εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ποικιλομορφία ως προς τις φυλές της. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην προσαρμογή σε διαφορετικές οικολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια των αιώνων στις περιοχές της Ευρώπης, της Ασίας και της Αφρικής.

Η κατάταξη των μελισσών βασίζεται τόσο σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όσο και στη μορφή της κοινωνικής ζωής τους. Τα παλαιότερα είδη μελισσών ζουν μοναχικά, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Adrena* και *Megachile*. Σε ανώτερη βαθμίδα φυλογενετικής εξέλιξης κατατάσσονται οι ημικοινωνικές μορφές όπως αυτές που ανήκουν στο γένος *Bombus*. Τα πιο εξελιγμένα είδη μελισσών, ανήκουν στο γένος *Apis*.

Η μέλισσα *Apis mellifera* θεωρείται σχετικά νέο είδος και τα πολλά υποείδη της θεωρούνται ότι δημιουργήθηκαν κατά την Πλειστόκαινο. Η ποικιλομορφία εμφανίζεται σε μορφολογικά (το χρώμα, το μέγεθος, το μήκος της γλώσσας κ.α.) και φυσιολογικά χαρακτηριστικά καθώς και χαρακτηριστικά που αφορούν τη συμπεριφορά όπως η επιθετικότητα, ο “χορός”, η ανθεκτικότητα σε ασθένειες κ.α.

Η ονομασία της μέλισσας “mellifera” δηλώνει τη πρακτική της μέλισσας να συλλέγει νέκταρ και να παράγει πολύ μεγάλες ποσότητες μελιού. Σύμφωνα με σχετικά πρόσφατα στοιχεία,<sup>1</sup> στο γένος *Apis* ανήκουν 9 είδη: *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis binghami*, *Apis breviligula*, *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis koschevnikovi*, *Apis florea*, *Apis adreniformis*. Επίσης τελευταία εντοπίστηκε και ένα νέο είδος, το “*Apis nuluensis*”.<sup>2</sup>

Το είδος *A. mellifera* χωρίζεται σε 27 υποείδη (φυλές), σύμφωνα με κριτήρια: μορφομετρικά, βιογεωγραφίας και συμπεριφοράς.<sup>3,4,5,6</sup> Τα περισσότερα απ’ αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν γενετική βάση, άρα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η γενετική ποικιλότητα των φυλών είναι μεγάλη. Ο μεγάλος αριθμός φυλών, οφείλεται ενδεχομένως στην απομόνωση των πληθυσμών σε διαφορετικό περιβάλλον.

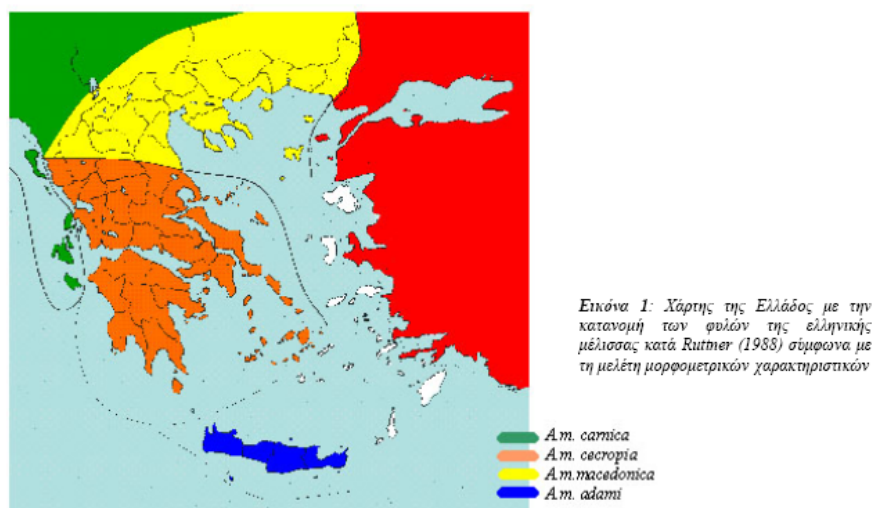
Μέσω της μελέτης των μορφομετρικών χαρακτηριστικών<sup>7</sup> έχει γίνει κατηγοριοποίηση σε τρεις εξελικτικές σειρές (κλάδοι) με τις οποίες ομαδοποιούνται οι φυλές της *A. mellifera*: ο κλάδος Α που συμπεριλαμβάνει υποείδη της Νότιας και Κεντρικής Αφρικής, ο κλάδος Μ που συμπεριλαμβάνει υποείδη της Βόρειας Ευρώπης,



Ισπανίας, Πορτογαλίας και Βόρειας Αφρικής και ο κλάδος C που συμπεριλαμβάνει τα υποείδη της Ανατολικής Ευρώπης, Βόρειας Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής.

Στην Ελλάδα υπάρχουν οι φυλές *A.m.adami* (Κρήτη-Ν. Αιγαίο), *A.m.carnica* (Επτάνησα), *A.m.macedonica* (Μακεδονία-Θράκη), *A.m.cecropia* (Κεντρική και Ν. Ελλάδα) και στην Κύπρο η *A.m.cypria*, βάσει της μορφομετρικής μελέτης του Ruttner<sup>3</sup> (Εικόνα 1).

Στην Ελλάδα υπάρχουν οι φυλές *A.m.adami* (Κρήτη-Ν.Αιγαίο), *A.m.carnica* (Επτάνησα), *A.m.macedonica* (Μακεδονία-Θράκη), *A.m.cecropia* (Κεντρική και Ν. Ελλάδα) και στην Κύπρο η *A.m.cypria*, βάσει της μορφομετρικής μελέτης του Ruttner (1988) (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.**

Για την ελληνική μέλισσα έχει γίνει μελέτη των μορφολογικών χαρακτήρων των εργατριών μελισσών της Ηπειρωτικής Ελλάδας,<sup>8</sup> με την οποία δεν είχαν διαπιστωθεί τότε ακόμη φαινόμενα ανάμειξης πληθυσμών (υβριδισμός) καθώς και της αλλοενζυμικής ποικιλότητας<sup>9</sup>, με την οποία πληθυσμοί από περιοχές της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας εμφανίζονταν διαφοροποιημένοι σε σχέση με τους πληθυσμούς των υπολοίπων περιοχών. Οι φυλές της ελληνικής μέλισσας μελετώνται τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα, με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά, ενζυμικούς πολυμορφισμούς και πολυμορφισμούς του μιτοχονδριακού DNA.<sup>10, 11, 12, 13, 14, 15, 16</sup> Έχει ξεκινήσει επίσης μελέτη της γενετικής δομής των μελισσών μέσω της γεωμετρικής μορφομετρίας που βασίζεται στη διαφοροποίηση της νεύρωσης των πτερύγων της μέλισσας.<sup>17,18</sup>

Η καθεμιά από τις παραπάνω ομάδες έχει μερικά βασικά διακριτά χαρακτηριστικά. Τα τελευταία χρόνια άρχισε η συστηματική διασταύρωση των μελισσών για να δημιουργηθεί νέος τύπος που θα έχει μέσο μέγεθος, θα είναι ήσυχη και εργατική και θα πολλαπλασιάζεται σχετικά εύκολα την άνοιξη.

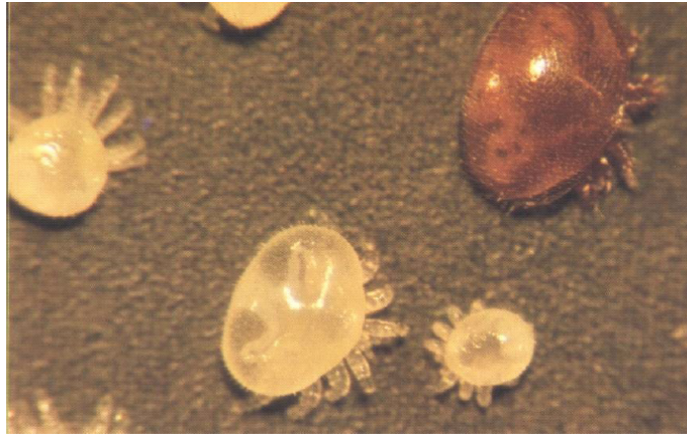
## 1.2 Το παράσιτο *Varroa destructor*

Μία από τις κυριότερες ασθένειες του γόνου και των ενήλικων μελισσών είναι η **Βαρρόωση ή βαρρόαση ή βαρροϊκή ακαρίωση που προκαλείται από το παράσιτο *Varroa destructor*.**

Το παράσιτο *Varroa destructor*, Anderson & Trueman, είναι ένα εκτοπαράσιτο της μέλισσας, το οποίο για πρώτη φορά περιγράφηκε το 1904 από τον Oudemans, ως *Varroa jacobsoni* από το νησί Java, που παρασιτούσε στο είδος της μέλισσας *Apis cerana*. Η περιγραφή του παρασίτου αυτού πέρασε σχεδόν απαρατήρητη αφού δεν προκαλούσε σημαντικές ζημιές στον ξενιστή της. Το πότε και πως έγινε η μεταφορά της στην οικιακή μέλισσα *Apis mellifera* δεν είναι ακριβώς γνωστό. Αλλά σε διάστημα λιγότερο από 40 χρόνια μεταδόθηκε σχεδόν σε όλο τον κόσμο εκτός την Αυστραλία. Η διασπορά του παρασίτου οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανθρώπινη παρέμβαση. Την περίοδο που η ασθένεια ήταν ελάχιστα γνωστή το διεθνές εμπόριο μελισσών διέσπειρε το άκαρι σ' όλο σχεδόν τον κόσμο. Το 2000 οι Anderson και Trueman, μετά από μελέτη του mtDNA και αλληλουχιών Co-I γονιδίων καθώς και μετά από μορφολογικούς χαρακτηρισμούς πολλών πληθυσμών της *V. jacobsoni*, την διαίρεσαν σε δύο είδη στο είδος *Varroa jacobsoni* s.s. που παρασιτεί στην μέλισσα *Apis cerana* F. στην περιοχή της Μαλαισίας-Ινδονησίας και στο είδος *Varroa destructor*, Anderson & Trueman, που παρασιτεί στην μέλισσα *A. cerana* στην κεντρική Ασία καθώς και στην μέλισσα *A. mellifera* L. σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές πλην της Αυστραλίας.

Ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου *Varroa destructor*, Anderson & Trueman, εξελίσσεται στο σφραγισμένο γόνο, όπου η βαρρόα βρίσκει ασφαλές καταφύγιο για την εναπόθεση των αυγών της, και κατάλληλη τροφή για την ανάπτυξη των ευαίσθητων ανώριμων σταδίων της.

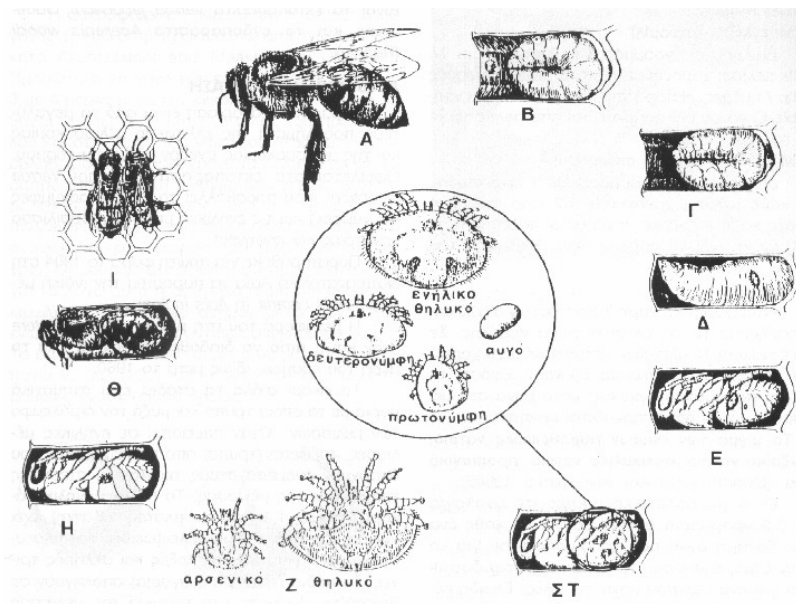
Όταν συμπληρωθεί η ανάπτυξή του γόνου, μαζί με τη νεαρή μέλισσα, εξέρχονται από το κελί και οι νεαρές βαρρόα που έχουν συμπληρώσει την ανάπτυξή τους. Πολύ σύντομα εγκαταλείπουν τη νεαρή μέλισσα και εγκαθίστανται σε κάποια άλλη. Δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στις τροφούς και τους κηφήνες και μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό, μικρότερο του 1% παρασιτεί τις συλλέκτριες (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Νεαρή ενήλικη θηλυκή βαρρόα με το καστανό χρώμα. Δευτερονύμφες διαφορετικών σταδίων με το λευκό χρώμα.

Μόνο ενήλικη θηλυκή βαρρόα βρέθηκε να παρασιτεί σε ενήλικες μέλισσες (καστανοκόκκινου χρώματος, περίπου 1.1 mm μήκος X 1.6 mm πλάτος).<sup>19</sup>

Τα παράσιτα εγκαθίστανται βαθιά μέσα στους δακτυλίους της κοιλίας των μελισσών, επειδή είναι ικανά να διατρύψουν με τα στοματικά τους μόρια μόνο τις λεπτές μεμβράνες που τους ενώνουν. Η θέση αυτή εκτός από τη διατροφή τους εξασφαλίζει και ασφαλή μεταφορά. Παραμένουν επάνω στις ενήλικες μέλισσες 2-15 ημέρες και στη συνέχεια εισέρχονται σε κάποιο κελί για να ωοτοκήσουν (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Ο βιολογικός κύκλος της *Varroa destructor*.

Δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση στον κηφηνογόνο όπου και αναπαράγονται με γρηγορότερους ρυθμούς. Στα μελίσσια που εκτρέφουν γόνο, μόνο ένα μικρό ποσοστό των βαρρόα βρίσκεται επάνω στις μέλισσες, οι υπόλοιπες παρασιτούν το γόνο όπου και αναπαράγονται.

Πηγή μόλυνσης σε μια περιοχή αποτελούν μόνο τα μολυσμένα μελίσσια. Το άκαρι μεταδίδεται από κυψέλη σε κυψέλη με τις περιπλανώμενες εργάτριες, τους κηφήνες, τη λεηλασία και τους μελισσοκομικούς χειρισμούς. Σε περιοχές που η ασθένεια ενδημεί, η περιπλάνηση σε συνδυασμό με την πυκνότητα των μελισσιών, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην επαναμόλυνση ή την επιμόλυνση μελισσιών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία.

Ο πληθυσμός του ακάρεως σε ένα μελίσσι δεν είναι σταθερός. Μεταβάλλεται δυναμικά μέσα στο χρόνο. Αυξάνει προοδευτικά από την αρχή της άνοιξης προς το φθινόπωρο. Παρουσιάζει ένα μέγιστο στις αρχές Ιουλίου και στη συνέχεια μέχρι τα μέσα Οκτωβρίου παρουσιάζει διαδοχικές αυξομειώσεις με ελαφρά αυξητική τάση. Από τα μέσα Οκτωβρίου μέχρι τα τέλη Δεκεμβρίου παρατηρείται έντονη μείωση του πληθυσμού η οποία συνεχίζεται με βραδύτερο ρυθμό μέχρι τις αρχές Μαρτίου που αρχίζει και πάλι η αύξησή του.

Ο ρυθμός αύξησης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Η πρόωμη έναρξη εκτροφής του γόνου και η συνέχισή της μέχρι αργά το χειμώνα, η πρόωμη και μακροχρόνια εκτροφή κηφηνογόνου, οι παραγωγικές βασίλισσες και οι συνθήκες που ευνοούν την εκτροφή μεγάλης έκτασης γόνου, ευνοούν την γρήγορη ανάπτυξη του πληθυσμού της βαρρόα. Εκτός όμως αυτών σημαντικό ρόλο παίζουν και οι αμυντικές ικανότητες του κάθε μελισσιού.

Οι μεμονωμένες μέλισσες που μολύνονται με βαρρόα βλάπτονται με δύο τρόπους: α) από την απώλεια αιμολέμφου,<sup>20</sup> που από μόνη της είναι σοβαρή και β) από την οπή που προκαλείται και επιτρέπει την δημιουργία μολύνσεων και ασθενειών. Η εξέλιξη της ασθένειας είναι αργή. Στην αρχή της μόλυνσης και για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα στη συνέχεια, δεν παρατηρείται κανένα σύμπτωμα, επειδή η αύξηση του πληθυσμού της βαρρόα αρχικά είναι αργή. Για να γίνουν αντιληπτά τα πρώτα συμπτώματα της ασθένειας, το ποσοστό μόλυνσης πρέπει να ξεπερνά το 15%-20%. Καθώς όμως το ποσοστό μόλυνσης αυξάνει και φτάνει στο 30-40%, τα συμπτώματα γίνονται περισσότερο φανερά. Τα αποτελέσματα του παρασιτισμού

είναι από απλή απώλεια βάρους, μέχρι την παραμόρφωση του ξενιστή (τσαλακωμένα ή καθόλου φτερά, ασύμμετρα πόδια κλπ)<sup>21,22,23</sup> (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Εμφανής παραμόρφωση μελισσών που έχουν προσβληθεί από βαρρόωση.

Σημαντική επίπτωση είναι και η αλλαγή της συμπεριφοράς της ενήλικης μέλισσας, καθώς ο εκνευρισμός από την συνεχή ενόχληση έχει σαν αποτέλεσμα ακόμη και την ομαδική εγκατάλειψη της κυψέλης, κάτι που συμβαίνει συνήθως τον τρίτο χρόνο της προσβολής, χωρίς όμως να αποκλείεται να συμβεί ακόμη και στον πρώτο χρόνο, όταν η ενόχληση έχει γίνει αφόρητη.

Η δυναμικότητα του μελισσιού προοδευτικά μειώνεται, ο γόνος εμφανίζεται συνεχώς όλο και περισσότερο διάσπαρτος και θυμίζει εικόνα σηψιγονίας. Τα σφραγίσματα μικρότερου ή μεγαλύτερου αριθμού κελιών είναι βυθισμένα, έχουν χρώμα σκοτεινότερο και μερικά απ' αυτά έχουν τρύπες ή σχισμές.<sup>24,25</sup> Στα κελιά αυτά υπάρχουν συνήθως νεκρές νύμφες, συχνά στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξής τους, αλλά και προνύμφες, καθώς και νεκρές ή ζωντανές βαρρόα σε διάφορα στάδια εξέλιξης. Οι προνύμφες συχνά βρίσκονται σε διάφορα στάδια αποσύνθεσης, η σύστασή τους όμως δεν είναι κολλώδης και αποβάλλονται εύκολα από τα κελιά (Εικόνα 5).



*Εικόνα 5.* Νεκρή νύμφη με εμφανή προσβολή από βαρρόα.

Μικρός ή μεγάλος αριθμός κελιών, ανάλογα με την ένταση της μόλυνσης, έχουν αποσφραγισθεί από τις εργάτριες και μέσα σ' αυτά διακρίνονται τμήματα ή ολόκληρες συνήθως λευκόχρωες νύμφες. Ο κηφηνογόνος εμφανίζει σημαντικότερη προσβολή από αυτήν των εργατριών. Συχνά παρατηρούνται επιπλοκές από άλλες ασθένειες του γόνου, οι οποίες ανάλογα με τη βαρύτητα τους, αλλοιώνουν την όλη εικόνα της ασθένειας.

Όλα αυτά μεταφράζονται σε μειωμένη παραγωγή μελιού στην αρχή μέχρι τον αφανισμό του μελισσιού στο τέλος.

Για την **αντιμετώπιση της ασθένειας** είχαν προταθεί διάφοροι μέθοδοι καταπολέμησης του ακάρεως όπως βιολογικές, φυσικές, μελισσοτεχνικές και χημειοθεραπευτικές.<sup>26,27</sup> Παρά την πληθώρα των μεθόδων και των φαρμάκων που είχαν προταθεί ως τώρα, η καταπολέμηση της βαρρόωσης δεν είναι εύκολη υπόθεση.

Μία από τις πιο υποσχόμενες φυσικές ουσίες που έχουν ακαρεοκτόνες ιδιότητες είναι το **οξαλικό οξύ**. Το οξαλικό οξύ παρουσιάζει το μεγαλύτερο πρακτικό ενδιαφέρον από όλα τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση της βαρρόωσης. Έχει υψηλή αποτελεσματικότητα (80-95%), μικρές παρενέργειες (κυρίως στη διαχείμαση), εύκολη εφαρμογή και χαμηλό κόστος.<sup>28</sup>

Έχουν δοκιμαστεί τρεις μέθοδοι για την χρήση του οξαλικού οξέος : στάγδην, με εξάτμιση και με ψεκάσμο. Η πρώτη φαίνεται να είναι και η αποτελεσματικότερη, καθώς είναι πολύ εύκολη η εφαρμογή της, είναι οικονομική (χρειάζεται μόνο μία σύριγγα) και διαθέτει τη μικρότερη επαφή του μελισσιού με το οξύ. Απαιτείται συγκέντρωση δίδυδροοξαλικού οξέος 3,5% σε διάλυμα ζάχαρης-νερού (1:1). Η εξωτερική θερμοκρασία πρέπει να είναι  $> 3^{\circ}\text{C}$ .<sup>29</sup> Η μέθοδος της εξάτμισης είναι ακριβότερη (λόγω ανάγκης εξοπλισμού ασφαλείας και ενός αποστακτήρα). Στα

περισσότερα πειράματα φάνηκε αποτελεσματική δράση του οξέος και καλή ανεκτικότητα των μελισσών σε αυτό ενώ εξατμιζόταν. Ένα γραμμάριο είναι αρκετό για την θεραπεία μίας κυψέλης. Για ακόμη μεγαλύτερη προστασία από την επαφή με το οξύ, χρησιμοποιήθηκαν ταμπλέτες (1 gr δίδροοξαλικού οξέος/ταμπλέτα). Η εξωτερική θερμοκρασία πρέπει να είναι  $> 2^{\circ}\text{C}$ . Τέλος, η μέθοδος του ψεκασμού είναι η πιο χρονοβόρα, αφού πρέπει κάθε πλαίσιο να μετακινηθεί από την κυψέλη για να ψεκαστεί. Απαιτείται υδατικό διάλυμα 3% δίδροοξαλικού οξέος. Η εξωτερική θερμοκρασία πρέπει να είναι  $> 5^{\circ}\text{C}$ . Και οι τρεις μέθοδοι που αναφέρθηκαν πρέπει να εφαρμόζονται κατά τη φθινοπωρινή ή χειμερινή περίοδο, και να μην συμπίπτουν με περίοδο επώασης.<sup>30</sup>

### 1.3 Το φυτό *Dittrichia viscosa*

Η πρακτική μελισσοκομεία της Κρήτης χρησιμοποιεί το φυτό *Dittrichia viscosa* ως παρασιτοκτόνο (Εικόνα 6). Βέβαια η δράση του φυτού ήταν γνωστή από παλιά, όπου χρησιμοποιούταν ακόμα και μέσα στα σπίτια για να διώχνει διάφορα έντομα και παράσιτα.



**Εικόνα 6.** *D. viscosa*.

Το φυτό *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter (syn. *Inula viscosa* (L.) Aiton) ανήκει στην οικογένεια Asteraceae<sup>31</sup> (*Inula viscosa*: Ίνουλα η ιξώδης). Αναφέρεται με τα κοινά ονόματα ακονιζιά, νεροκόνυζος, κονυζός, νεροκολλησιά, κολλητσαριά, ψίλιθρο και σκοτζάρι. Πιθανόν η κόνυζα ή άρρηνη του Θεόφραστου, καθώς και η κόνυζα η μεγάλη του Διοσκουρίδη να είναι η σημερινή ακονιζιά. Είναι αιθαλής πολυετής θάμνος, ιξώδης-κολλώδης και εύοσμος, όρθιος, πολύφυλλος και αποξυλωμένος στη βάση του. Φέρει φύλλα λογχοειδή ακέραια ή οδοντωτά και οξέα.

Απαντάται σε χέρσους, πετρώδεις τόπους σε όλη την Ελλάδα. Εξαπλώνεται στη Μεσογειακή Ευρώπη, Ασία και Αφρική.<sup>32</sup> Πρόκειται για θάμνο ιδιαίτερα επιθετικό στην κατάληψη διαταραγμένων, λόγω ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, περιοχών με αποτέλεσμα η γεωγραφική εξάπλωση του φυτού να επεκτείνεται ταχύτατα, διότι οι υποβαθμισμένες αυτές περιοχές διευρύνονται.<sup>33</sup> Ανθίζει το φθινόπωρο, τα λουλούδια του έχουν χρώμα ζωηρό κίτρινο και είναι κατεξοχήν γυρεοδοτικό φυτό (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Άνθη της *D. Viscosa*.

Λόγω εποχής άνθισης, τον Σεπτέμβριο-Οκτώβριο, είναι χρήσιμο φυτό στη μελισσοκομία αφού την εποχή αυτή αφενός η γύρη σπανίζει, αφετέρου είναι απαραίτητη για την εκτροφή γόνου και την ανανέωση του πληθυσμού των μελισσιών.<sup>34</sup> Φύεται σε θέσεις όπου υπάρχει ελάχιστη ή και καθόλου επίδραση του θαλασσινού νερού.

Η επιφάνεια του βλαστού και των φύλλων της *D. viscosa* είναι κολλώδης και ιξώδης, επειδή το φυτό εκκρίνει στην επιφάνειά του ένα πολύπλοκο μίγμα οργανικών ουσιών, κυρίως τερπενοειδών,<sup>35</sup> άγλυκων φλαβονοειδών και απλών φαινολικών.<sup>36</sup> Τα φύλλα και οι νεαροί βλαστοί του φυτού φέρουν άμισχες και έμισχες αδενώδεις τρίχες, οι οποίες παραμένουν λειτουργικές καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του φύλλου, από τα πρώτα στάδια του σχηματισμού του μέχρι την πλήρη ωρίμανσή του. Δεν είναι γνωστό εάν αυτοί οι δύο τύποι εκκρίνουν τις ίδιες ή διαφορετικές ουσίες. Στην τελευταία περίπτωση οι ουσίες μπορεί να έχουν και διαφορετική λειτουργία.<sup>37</sup> Και τα δύο είδη τριχών διαθέτουν μια αδενώδη κεφαλή, η οποία απαρτίζεται από τρεις τύπους κυττάρων: ένα ζεύγος κυττάρων της κορυφής, ένα ζεύγος κυττάρων κάτω από αυτό και τρία ζεύγη φωτοσυνθετικών κυττάρων. Όλα τα κύτταρα της κεφαλής εκκρίνουν λιπίδια, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Όσον αφορά στα εκκριτικά κύτταρα των αδενωδών τριχών του φυτού, τα λιπίδια εκκρίνονται μέσω πόρων που υπάρχουν στην εφυμενίδα, ενώ οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κάτω από την



εφυμενίδα, η οποία αργότερα διαρρηγνύεται. Κατά συνέπεια το επιπλέον υλικό το οποίο παράγεται στη συνέχεια από τα εκκριτικά κύτταρα εκκρίνεται απευθείας στο εξωτερικό περιβάλλον.<sup>38</sup> Σε υποκυτταρικό επίπεδο, φαίνεται ότι στην εκκριτική λειτουργία συμμετέχουν το λείο και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, τα πλαστίδια, τα μιτοχόνδρια και η συσκευή Golgi. Το έκκριμα αναφέρεται και ως μίγμα επιεφυμενιδικών συστατικών επειδή είναι ενσωματωμένο, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, στο κηρώδες εφυμενιδικό υπόστρωμα. Το επιεφυμενιδικό έκκριμα του φυτού *D. viscosa* είναι κατά μεγάλο ποσοστό (περίπου 70%) υδατοδιαλυτό.<sup>39</sup> Το υλικό αυτό περιορίζει τις απώλειες του νερού από την εφυμενίδα και είναι ισχυρά αλληλοπαθητικό.<sup>40</sup>

Λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τα συστατικά του επιεφυμενιδικού εκκρίματος του φυτού, έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης και ταυτοποίησης των ουσιών αυτών από πολλές ερευνητικές ομάδες. Εκτός από τα φλαβονοειδή<sup>35</sup> (Πίνακας 1), έχουν ανιχνευθεί και τερπένια- κυρίως σεσκιτερπενικές λακτόνες<sup>41,42</sup> και σεσκιτερπενικά οξέα,<sup>34,43,44,45</sup> τέσσερα από τα οποία είναι τα ακόλουθα: 3β-hydroxyilicic acid, 3-(R)-hydroxy-*epi*-ilicic acid, 2α-hydroxyilicic acid και 9β-hydroxy-2-oxoisocostic acid.<sup>46</sup> Το 1992 απομονώθηκαν 10 τριτερπένια με τη μορφή ελεύθερων αλκοολών, ή εστέρων του οξικού οξέος ή λιπαρών οξέων, τα οποία είναι: dammaradienyl acetate, taraxasteryl acetate, pseudotaraxasteryl acetate, friedelin, 3-epifriedelinol, μίγμα από λιπαρούς εστέρες της faradiol, pseudotaraxasterol, taraxasterol, λιπαροί εστέρες της 20(29)-lupene-3β,16β-diol, 3β-monoacetate της τριτερπενικής διόλης και λιπαροί εστέρες της 2-(4'-hydroxyphenyl)-ethanol.<sup>47</sup> Επίσης, είναι γνωστά 14 συστατικά που απομονώθηκαν από το φυτό *D. viscosa*: 3,3'-di-*O*-methylquercetin,<sup>48,49</sup> 3-*O*-acetylpadmatin,<sup>49</sup> 3-methylquercetin,<sup>49</sup> hispidulin,<sup>49</sup> nepetin,<sup>50</sup> 2-desacetoxyxanthinin,<sup>51</sup> inuviscolide,<sup>51,52</sup> 2-oxoisocostic acid,<sup>53</sup> ilicic acid,<sup>54,55,56,57</sup> viscic acid,<sup>54,55</sup> β-sitosterol,<sup>58</sup> β-sitosteryl glucoside,<sup>58</sup> 3,7,4'-trimethoxy-5, 3'-dihydroxyflavone<sup>59</sup> και 11α,13-dihydroinuviscolide.<sup>60</sup> Τα τελευταία δύο συστατικά βρέθηκαν για πρώτη φορά σε αυτό το φυτό.

**Πίνακας 1.** Τα φλαβονοειδή του επιεφυμενιδικού εκκρίματος των φύλλων του φυτού *D. viscosa*<sup>36</sup>.

Φλαβόνες	
scutellarein 6-methyl ether (hispidulin)	Apigenin
6-methoxyluteolin (nepetin)	Luteolin
Φλαβονόλες	
kaempferol 3-methyl ether (isokaempferide)	quercetin 7-methyl ether (rhamnetin)
kaempferol 7-methyl ether (rhamnocitrin)	quercetin 3'-methyl ether (isorhamnetin)
6-methoxykaempferol	quercetin 3,3'-dimethyl ether
quercetin	quercetagenin 3,6-dimethyl ether (axillarin)
quercetin 3-methyl ether	quercetagenin 6,3'-dimethyl ether (spinacetin)
Φλαβανόνες	
naringenin 7-methyl ether (sakuranetin)	eriodictyol 7-methyl ether
eriodictyol	
Διυδροφλαβονόλες	
aromadendrin 3-acetate	taxifolin 7-methyl ether
aromadendrin 7-methyl ether	taxifolin 7-methyl ether-3-acetate
taxifolin 3-acetate	

Σχετικές μελέτες αναφέρουν ότι τα υδατικά εκπλύματα των φύλλων του φυτού *Dittrichia viscosa* εμφανίζουν ισχυρή αλληλοπαθητική δράση έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, φυτοφάγων ακάρεων και ορισμένων φυτών. Συγκεκριμένα η εφαρμογή τους σε *in vitro* πειράματα παρεμπόδισε την ανάπτυξη του μυκηλίου στους τρεις εξετασθέντες φυτοπαθογόνους μύκητες (*Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* και *Fusarium* sp.). Όσον αφορά στους μύκητες *B. cinerea* και *Fusarium* sp. παρατηρήθηκε αύξηση στη φάση υστέρησης της βλάστησης των σπορίων. Επίσης, βρέθηκε ότι τα υδατικά εκπλύματα αυξάνουν τη θνησιμότητα των νυμφικών σταδίων του ακάρεως *Tetranychus urticae* Koch, ενώ δεν επηρεάζουν τη θνησιμότητα των ακμαίων αλλά ούτε και την εκκόλαψη των ωών. Τέλος, εξετάστηκε η παρεμπόδιση της βλάστησης των σπερμάτων ορισμένων φυτών (καλλιεργούμενων καθώς και ζιζανίων). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση των εκπλυμάτων είναι εντονότερη στα ζιζάνια σε σχέση με τα καλλιεργούμενα φυτά.<sup>61</sup> Επίσης παρουσιάζει έντονη αλληλοπαθητική δράση εμποδίζοντας τη βλάστηση σπερμάτων του μαρουλιού και της *Phlomis fruticosa*.<sup>39,40</sup> Έχουν παρουσιαστεί αποτελέσματα βιολογικών μελετών που αφορούν τις επιδράσεις του επιεφυμενιδικού αλληλοπαθητικού προϊόντος της *Dittrichia viscosa* σε άγρια φυτά του ίδιου ενδιαιτήματος. Καταγράφηκαν αρνητικές επιδράσεις τόσο στο ποσοστό όσο και στο ρυθμό βλαστικότητας των σπερμάτων αυτών, αλλά και στο μήκος της ρίζας των

αρτίβλαστων. Ταυτοχρόνως, η έλλειψη ριζικών τριχιδίων ήταν εμφανής σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν, ενώ σε ορισμένα είδη παρατηρήθηκε και απώλεια του προσανατολισμού των ριζών. Οι πιθανοί μηχανισμοί των παραπάνω δράσεων του αλληλοπαθητικού υλικού ελέγχθηκαν σε βιοδοκιμές στο μαρούλι. Τα ευρήματα αφορούν μειωμένες κυτταρικές διαιρέσεις στη ρίζα και έλλειψη αμυλοπλαστών που οδηγεί στην αδυναμία των ριζών να προσλάβουν το βαρυτροπικό ερέθισμα, με επακόλουθο την απώλεια του προσανατολισμού τους.<sup>62</sup>

## **2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ**

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η επιβεβαίωση της εικασίας ότι το φυτό *Dittrichia viscosa* (L.) περιέχει δραστικές ουσίες για αντιμετώπιση του παρασίτου *Varroa destructor* της μέλισσας (*Apis mellifera* L.). Βασικός στόχος της εργασίας είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση του δραστικότερου συστατικού του φυτού με σκοπό τη δημιουργία ιδιοσκευάσματος το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μελισσοκόμους για την αντιμετώπιση της βαρροϊκής ακαρίωσης.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

#### 3.1 Αέρια Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μαζών (GC/MS)<sup>63</sup>

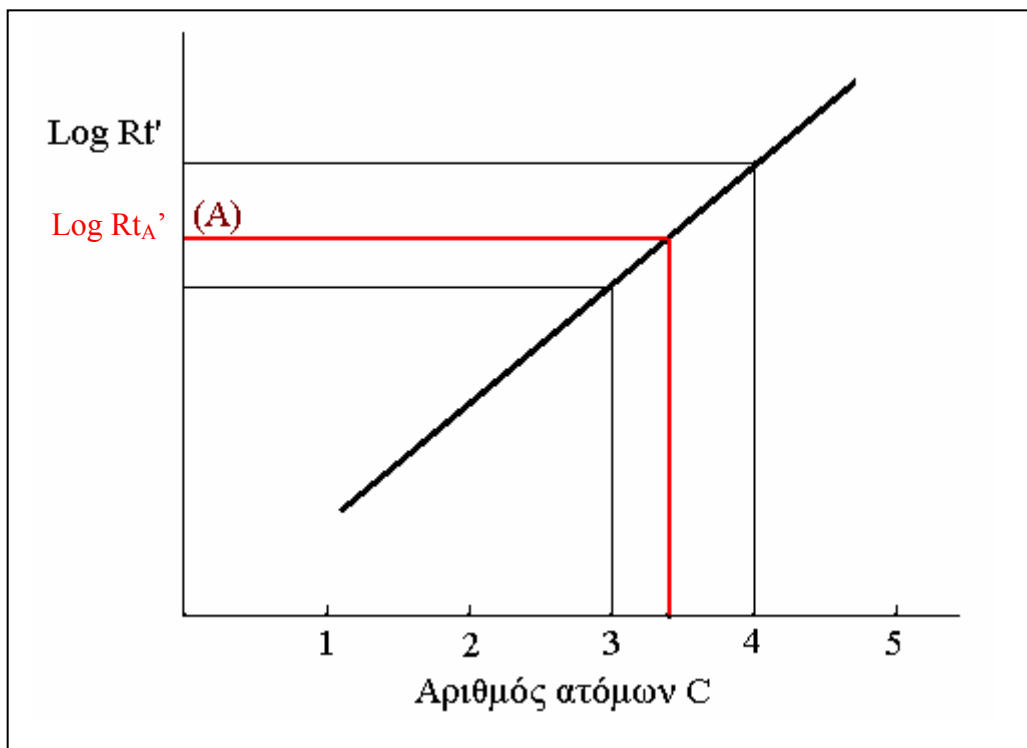
Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυαστεί με την αέρια χρωματογραφία και να προκύψει η ονομαζόμενη συνδυασμένη τεχνική GC/MS. Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Ο αναλυτής μαζών του φασματόμετρου μαζών είναι δυνατόν να ρυθμίζεται έτσι ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση ιόντος με προκαθορισμένη τιμή  $m/z$  οπότε πλέον το χρωματογράφημα παρέχει χρωματογραφικές κορυφές μόνο για τις ουσίες που παρέχουν το συγκεκριμένο ιόν.

##### 3.1.1 Ποιοτική ανάλυση και σύστημα κατακράτησης Kovats<sup>63</sup>

Η χρωματογραφία είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ποιοτική ανάλυση, μιας και είναι μια τεχνική που μελετήθηκε για να διαχωρίζει ένα μείγμα στα μεμονωμένα συστατικά του. Ο καθορισμός της ταυτότητας των συστατικών είναι ο κύριος σκοπός της ποιοτικής ανάλυσης και για αυτό έχει αναπτυχθεί ένας σημαντικός αριθμός τεχνικών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην χρωματογραφία για αυτό τον σκοπό.

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πληροφορία για μια συγκεκριμένη κορυφή είναι η συμπεριφορά κατακράτησης είτε ως χρόνος κατακράτησης, είτε ως διορθωμένος χρόνος κατακράτησης ή και ως όγκος κατακράτησης.

Ένα αξιόλογο και πολύ χρήσιμο σύστημα που χαρακτηρίζει την συμπεριφορά κατακράτησης είναι το Σύστημα Δεικτών Κατακράτησης Kovats<sup>64</sup> (Kovats Retention Index System). Είναι γνωστό στην αέρια χρωματογραφία ότι όταν ο λογάριθμος του διορθωμένου χρόνου κατακράτησης παρατίθενται σε σχέση με τον αριθμό ατόμων άνθρακα μιας ομόλογης σειράς, ισχύει μια γραμμική σχέση όπως φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1.** Γραμμική σχέση μεταξύ χρόνου κατακράτησης ( $\text{Log } R_t'$ ) και αριθμού ατόμων C. Η ουσία A έχει συμπεριφορά κατακράτησης όπως μια ένωση με 3.45 άτομα C.

Ο Kovats χρησιμοποίησε αυτή την γραμμική σχέση για να κατασκευάσει το ομόνυμο σύστημα κατακράτησης. Σε αυτό το σύστημα, ο χρόνος κατακράτησης του συστατικού σε μια δεδομένη στατική φάση, εκφράζεται σε σχέση με δυο κανονικά αλκάνια (παραφίνες) που εκλύονται το ένα πριν και το άλλο μετά από το συστατικό. Εξ ορισμού ο δείκτης κατακράτησης (R.I.) των συστατικών της ομόλογης σειράς είναι  $100n$ , με  $n$  τον αριθμό των ατόμων C στην αλυσίδα.

Η σχέση που δίνει τον δείκτη κατακράτησης μιας ουσίας A δίνεται από την εξίσωση:

$$RI_A = 100n + 100 \frac{\log R_t'_A - \log R_t'_{C_n}}{\log R_t'_{C_{n+1}} - \log R_t'_{C_n}} \quad (I)$$

Όπου  $C_n$  και  $C_{n+1}$  ο αριθμός των ατόμων άνθρακα των κορεσμένων υδρογονανθράκων, μεταξύ των οποίων εμφανίζεται στο χρωματογράφημα η κορυφή της ουσίας A.

Για πολλά συστατικά η αλλαγή στην θερμοκρασία δεν επηρεάζει σημαντικά τον R.I. για αυτό και για μικρό εύρος αλλαγής θερμοκρασίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γραμμική σχέση του τύπου :  $\Delta I = AT + \beta$ .

Είναι αυτονόητη η εξάρτηση του δείκτη Kovats από την στήλη που χρησιμοποιείται για την χρωματογραφική ανάλυση, αν είναι δηλαδή πολικής ή άπολης στατικής φάσης και άλλα χαρακτηριστικά αυτής. Γι αυτό για διαφορετικές στήλες παίρνουμε και διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης και άρα και δείκτες Kovats.

### 3.1.2 Δείκτες κατακράτησης στη γραμμικά θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία.<sup>65</sup>

Οι δείκτες κατακράτησης Kovats που δίνονται από την εξίσωση (I) μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για την ισόθερμη χρωματογραφική ανάλυση. Ακόμα, στην ισόθερμη χρωματογραφική ανάλυση μπορούμε να αντικαταστήσουμε τους διορθωμένους χρόνους κατακράτησης  $V'$  και έτσι η εξίσωση (I) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με την παρακάτω μορφή:

$$RI_A = 100n + 100 \frac{\log V'_A - \log V'_{C_n}}{\log V'_{C_{n+1}} - \log V'_{C_n}} \quad (II)$$

Όμως, στην θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία αυτή η αντικατάσταση δεν είναι επιτρεπτή, πράγμα που κάνει αδύνατη την εφαρμογή των παραμέτρων  $Rt'$  και  $V'$  που προέρχονται από μια τέτοια ανάλυση, στις εξισώσεις (I) και (II) (ισχύει  $RI_{(I)} = RI_{(II)}$  για την ισόθερμη χρωματογραφία και  $RI_{(I)} \neq RI_{(II)}$  για την θερμοπρογραμματιζόμενη).

Η πιο συχνά μετρούμενη παράμετρος κατακράτησης στην γραμμικά θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία είναι η θερμοκρασία κατακράτησης. Έχει παρατηρηθεί ότι η διαφορά στην θερμοκρασία κατακράτησης μεταξύ δύο συστατικών είναι πολύ σταθερή.

Το 1963, οι H. Van den Dool και P. Dec. Kratz<sup>65</sup>, βασιζόμενοι στις παραπάνω προτάσεις αλλά και στο συμπέρασμα ότι στην γραμμική θερμοπρογραμματιζόμενη GLPC ισχύει η παρακάτω εξίσωση για τα μέλη μιας ομόλογης σειράς:

$$t'_x = C - Dn_x$$

Όπου  $t'$  ο ρυθμιζόμενος χρόνος κατακράτησης, C και D σταθερές και n ο αριθμός των ατόμων άνθρακα της ένωσης.

Αποδείχθηκε ότι το σύστημα κατακράτησης δεικτών Kovats μπορεί να γενικευτεί και να περιλάβει και την γραμμική θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία GLPC, αν οι λογάριθμοι των  $Rt'$  αντικατασταθούν από του απλούς χρόνους κατακράτησης  $Rt$ . Έτσι η εξίσωση (I) παίρνει την παρακάτω γενική μορφή:

$$RI_x = 100n + 100 \frac{Rt_x - Rt_{Cn}}{Rt_{Cn+1} - Rt_{Cn}} \quad (IV)$$

Για την γραμμική θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία GLPC μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι διορθωμένοι χρόνοι κατακράτησης  $Rt'$ .

Σε αυτό το σημείο επιβεβαιώνεται το πλεονέκτημα της γραμμικά θερμοπρογραμματιζόμενης λειτουργίας από αυτή της ισόθερμης, μιας και ο χρόνος κράτησης του αέρα δεν χρειάζεται να μετρηθεί, μέτρηση η οποία είναι εξαιρετικά σημαντική για ανιχνευτές που δεν είναι ευαίσθητοι στον αέρα.

Οι παραπάνω συγγραφείς, χρησιμοποιώντας την ίδια στήλη για την ισόθερμη και για την θερμοπρογραμματιζόμενη ανάλυση, περίμεναν ότι σε όλες τις περιπτώσεις που ο συντελεστής θερμοκρασίας του συστήματος δεικτών κατακράτησης είναι μικρός, ο δείκτης κατακράτησης για ένα συστατικό θα είναι ο ίδιος, στη ισόθερμη και στην θερμοπρογραμματιζόμενη GLPC. Η υπόθεσή τους αποδείχτηκε σωστή και είχε σαν αποτέλεσμα την ευρύτατη χρησιμοποίηση των δεικτών κατακράτησης που δίνονται από την εξίσωση (IV). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της υπόθεσης αυτής .

**Πίνακας 2.** Δείκτες κατακράτησης κάτω από διαφορετικές συνθήκες χρωματογραφικής λειτουργίας στην ίδια στήλη.

Συστατικά	Ισόθερμη στους 125 °C		Προγραμματιζόμενη
			75° – 228° με 4.6° /min
	Ροή αερίου ( mL/min)		Ροή αερίου ( mL/min)
	55,6	80,0	80,0
Ethyl formate	820	822	822
Ethyl butyrate	1032	1032	1032
Ethyl valerate	1130	1136	1130-1128
Ethyl hexanoate	1226	1228	1228-1227

## 3.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

### 3.2.1 Γενικά για την Μονοδιάστατη Φασματοσκοπία NMR.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική που έχουν στην διάθεσή τους οι χημικοί για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ουσιών. Η φασματοσκοπία NMR παρέχει έναν «χάρτη» του όλου ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.<sup>65,66</sup> Έτσι, δεδομένου ότι κάθε χημικά διακριτό άτομο υδρογόνου σε ένα μόριο εμφανίζει κατά κανόνα τη δική του μοναδική απορρόφηση, κατά την εφαρμογή του  $^1\text{H}$  NMR βρίσκουμε πόσα είδη μη ισοδύναμων υδρογόνων υπάρχουν και σε συνδυασμό με την περιοχή απορρόφησης τους στο φάσμα είναι εφικτός και ο προσδιορισμός της τάξης του άνθρακα ( $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ) ή των χαρακτηριστικών ομάδων που περιέχουν άτομα H και μπορεί να υπάρχουν σε ένα οργανικό μόριο. Αντίθετα, με την φασματοσκοπία  $^{13}\text{C}$  NMR μας επιτρέπεται να απαριθμήσουμε τους μη ισοδύναμους άνθρακες ενός μορίου, ενώ και στην περίπτωση αυτή ανάλογα με τα στοιχεία που είναι συνδεδεμένο ένα άτομο C (συνήθως H, N, O) απορροφούν σε χαρακτηριστικές συχνότητες του φάσματος. Συνδυασμός των δύο παραπάνω φασμάτων μπορεί να δώσει μια ικανοποιητική προσέγγιση για την δομή ενός μορίου.

Τα τελευταία χρόνια, αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές που καθιστούν δυνατή τη συλλογή πρόσθετων πληροφοριών από τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR. Ανάμεσα στις πιο χρήσιμες από αυτές τις νέες τεχνικές συγκαταλέγεται και η επονομαζόμενη DEPT-NMR (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), με την οποία καθίσταται εφικτή η αναγνώριση σημάτων που οφείλονται σε  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ , ή τεταρτοταγείς άνθρακες. Ουσιαστικά μπορούμε να προσδιορίσουμε και τον αριθμό των υδρογόνων που βρίσκονται συνδεδεμένα σε κάθε άνθρακα<sup>66</sup>.

Γενικότερα, με τον παραπάνω όρο αναφερόμαστε σε ένα παλμό ή μια τεχνική μεταφοράς λόγω πολωσιμότητας (polarization transfer), η οποία είναι χρήσιμη για την παρατήρηση low- $\gamma$  πυρήνων που είναι J-συζευγμένοι με  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  ή  $^{31}\text{P}$  και μπορεί να δώσει ξεχωριστά υποφάσματα (sub-spectra) όπου διαχωρίζονται οι τριτοταγείς, δευτεροταγείς και πρωτοταγείς ομάδες. Θα μπορούσαμε με απλά λόγια να την χαρακτηρίσουμε σαν μια τεχνική αναγνώρισης και διαχωρισμού  $\text{XHN}$  ( $n=0-4$ ) σημάτων.<sup>67</sup>

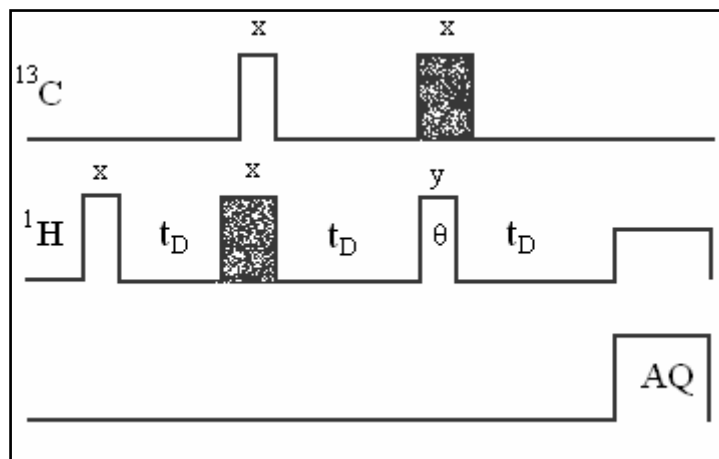


Η συχνότητα του παλμού που χρησιμοποιείται φαίνεται παρακάτω:

$$^1\text{H}: \quad (\pi/2)x - t_D - (\pi)x - t_D - (\theta)y$$

$$^{13}\text{C}: \quad (\pi/2)x - t_D - (\theta) - t_D - \text{Acquire}$$

Ενώ στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2) δίνεται η περιγραφική μορφή του παλμού.



**Σχήμα 2.** Παλμική συχνότητα για το DEPT με αποσύζευξη πρωτονίων.

Η καθυστέρηση,  $t_D$ , έχει ρυθμιστεί στο  $(2J_{\text{CH}})^{-1}$  και η συχνότητα λαμβάνεται κυκλικά ώστε να διασφαλιστεί η μέγιστη εξουδετέρωση των φυσικών μαγνητισμών και των παλμικών σφαλμάτων. Η λήψη του φάσματος μπορεί να γίνει με ή χωρίς αποσύζευξη πρωτονίων.

Η ένταση των σημάτων των ομάδων  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ , και  $\text{CH}$  εξαρτάται από το εύρος της γωνίας  $\theta$  του παλμού - ουσιαστικά αυτός είναι και ο παράγοντας που θέτει τις βάσεις για την λήψη διάφορων φασμάτων DEPT. Οι  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  ομάδες δίνουν το μέγιστο σήμα για  $\theta = \pi/4$  και μηδενίζονται σε  $\theta = \pi/2$ , ενώ οι  $\text{CH}$  ομάδες δίνουν το μέγιστο για  $\theta = \pi/2$ . Επίσης, οι ομάδες  $\text{CH}_2$  δίνουν αρνητικό μέγιστο για  $\theta = 3\pi/2$ , ενώ οι ομάδες  $\text{CH}_3$ , και  $\text{CH}$  δίνουν θετικά σήματα (Πίνακας 3). Έτσι το DEPT  $135^\circ$  είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος παλμός για τη διευκρίνιση του βαθμού υποκατάστασης των C. Οι τεταρτοταγείς άνθρακες δεν εμφανίζουν σήμα στους παραπάνω τύπους φασμάτων DEPT, μιας και δεν υπάρχει σύζευξη C-H (αναφέραμε παραπάνω ότι ο παλμός  $t_D$ , έχει ρυθμιστεί ώστε να αποκαλύπτει τη σύζευξη  $2J_{\text{CH}}$  (single bond J coupling).

**Πίνακας 3.** Συνολικός πίνακας σημάτων DEPT.

ΟΜΑΔΕΣ C	DEPT 45° ( $\theta=\pi/4$ )	DEPT 90° ( $\theta=\pi/2$ )	DEPT 135° ( $\theta=3\pi/4$ )
CH <sub>3</sub>	Μέγιστο σήμα	—	Θετικό Σήμα
CH <sub>2</sub>	Μέγιστο σήμα	—	Αρνητικό Σήμα
CH	—	Μέγιστο σήμα	Θετικό Σήμα
C	—	—	—

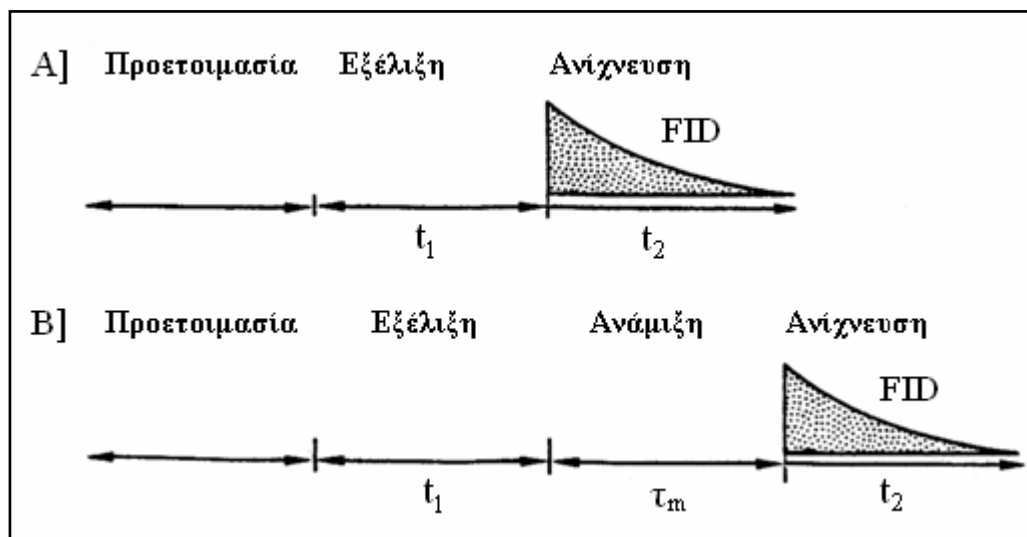
Ένα πείραμα DEPT εκτελείται συνήθως σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο συνίσταται στην καταγραφή ενός συνηθισμένου φάσματος αποσύζευξης ευρείας ζώνης για τον εντοπισμό όλων των χημικών μετατοπίσεων όλων των ανθράκων. Στη συνέχεια, καταγράφεται το φάσμα DEPT 90°, όπου εμφανίζονται μόνον σήματα οφειλόμενα σε τριτοταγείς άνθρακες CH. Τέλος, καταγράφεται το φάσμα DEPT 135° με τέτοιες συνθήκες ώστε οι συντονισμοί CH<sub>3</sub> και CH να εμφανίζονται ως θετικά σήματα και οι συντονισμοί των CH<sub>2</sub> ομάδων να εμφανίζονται ως αρνητικά σήματα.

Συνδυάζοντας τις πληροφορίες από τα τρία φάσματα, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των υδρογόνων που φέρει κάθε άνθρακας. Η προσθαφαίρεσή τους οδηγεί σε τρία ξεχωριστά υποφάσματα που περιέχουν μόνο ενός τύπου ομάδες C. Οι τεταρτοταγείς άνθρακες προσδιορίζονται αφαιρώντας όλες τις κορυφές του φάσματος DEPT 135° από της κορυφές του κλασικού φάσματος <sup>13</sup>C MNR.<sup>66,67</sup>

### 3.2.2 Γενικά για την Δισδιάστατη Φασματοσκοπία NMR (2D NMR)

Η φασματοσκοπία 2D NMR αποτελεί σημαντική εξέλιξη της φασματοσκοπίας NMR, η οποία τα τελευταία 25 χρόνια άλλαξε ριζικά τη θεωρητική και πειραματική βάση της συμβατικής φασματοσκοπίας. Το NMR δύο διαστάσεων περιλαμβάνει μια σχετικώς νέα ομάδα πολυπαλμικών τεχνικών οι οποίες το καθιστούν ικανό να διευκρινίζει περίπλοκα φάσματα. Ένα πείραμα 2D NMR χαρακτηρίζεται από ένα συνδυασμό ή μια ακολουθία παλμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν ορισμένα χρονικά διαστήματα αναμονής. Το είδος της ακολουθίας των παλμών που χρησιμοποιείται προσδιορίζει το είδος της πληροφορίας που θα μας δώσει το δισδιάστατο φάσμα.

Σε γενικές γραμμές, ένα πείραμα 2D NMR περιλαμβάνει τρεις βασικές χρονικές περιόδους: α) την περίοδο προετοιμασίας, β) την περίοδο εξέλιξης, και γ) την περίοδο ανίχνευσης. Κάθε μία από τις περιόδους χαρακτηρίζεται από μια χρονική διάρκεια, τον χρόνο προετοιμασίας  $T$ , τον χρόνο εξέλιξης  $t_1$  και τον χρόνο ανίχνευσης  $t_2$  αντίστοιχα. Σε ορισμένα πειράματα 2D NMR, πριν την περίοδο ανίχνευσης, προστίθεται μια τέταρτη περίοδος, η περίοδος ανάμιξης με χρονική διάρκεια τον χρόνο ανάμιξης  $\tau_m$ <sup>64,68,69</sup> (Σχήμα 3).

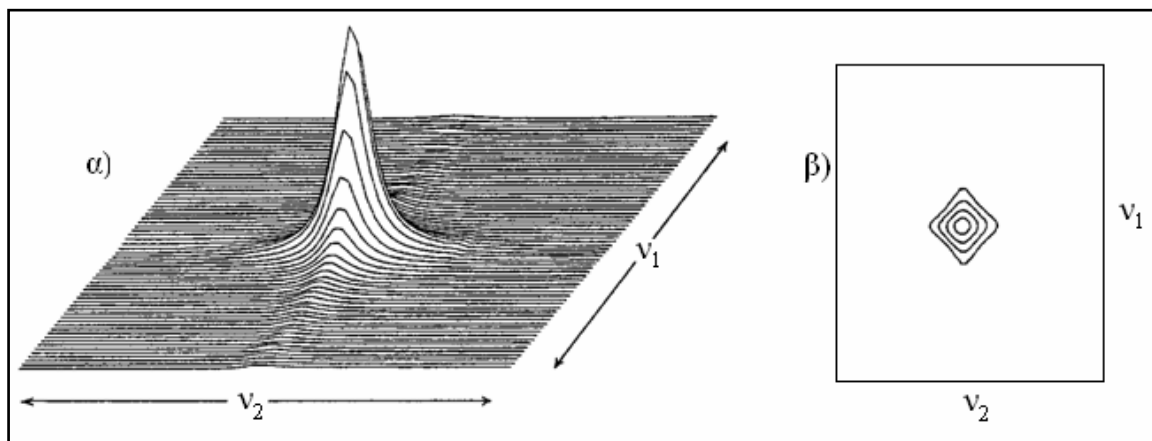


Σχήμα 3. Χρονικοί περίοδοι φασματοσκοπίας 2D NMR.

Κατά την περίοδο προετοιμασίας το σύστημα βρίσκεται στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας και προετοιμάζεται για το πείραμα. Η περίοδος εξέλιξης ξεκινά συνήθως από έναν παλμό, ο οποίος διαταράσσει το σύστημα από την κατάσταση ισορροπίας. Μετά την παύση του παλμού το σύστημα αναπτύσσεται για χρονικό διάστημα  $t_1$ . Μετά το πέρας της εξέλιξης, το σήμα ανιχνεύεται κατά την περίοδο

ανίχνευσης σε χρόνο  $t_2$ . Ο μετασχηματισμός Fourier του σήματος FID ως συνάρτηση του  $t_2$  για σταθερό  $t_1$  παρέχει φάσμα όμοιο με αυτό που λαμβάνεται σε ένα συνηθισμένο πείραμα με παλμούς. Στη συνέχεια, η διαδικασία επαναλαμβάνεται για διάφορες τιμές του  $t_1$ , δίνοντας ένα δισδιάστατο φάσμα ως προς τις δύο μεταβλητές συχνότητες  $\nu_1$  και  $\omega_2$  ή μερικές φορές τις παραμέτρους χημικής μετατόπισης  $\delta_1$  και  $\delta_2$ . Η φύση και ο χρονισμός των παλμών που έχουν χρησιμοποιηθεί σε 2D NMR ποικίλουν και σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται περισσότεροι από δυο επαναλαμβανόμενοι παλμοί. Το σπουδαιότερο όμως επίτευγμα της φασματοσκοπίας 2D NMR είναι το ότι οι πληροφορίες στους δύο άξονες του δισδιάστατου φάσματος μπορούν να συσχετιστούν και να διευκολύνουν, στην απλούστερη περίπτωση, την ανάλυση ενός μονοδιάστατου φάσματος.

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι απεικόνισης 2D NMR φασμάτων. Ένας τρόπος είναι η συστοιχία φασμάτων (stacked plots) δηλαδή, η διάταξη μιας σειράς φασμάτων συχνότητας  $\nu_2$ , το ένα πίσω από το άλλο, κατά σειρά αυξανόμενης συχνότητας  $\nu_1$ , ενώ η πιο δημοφιλής απεικόνιση είναι αυτή των ισοϋψών καμπυλών (contour plot) η οποία παρουσιάζει την κατανομή της έντασης των κορυφών όπως ακριβώς απεικονίζεται το υψόμετρο στους γεωγραφικούς χάρτες (Σχήμα 4). Οι γραμμές των ισοϋψών καμπυλών συνδέουν σημεία τα οποία έχουν την ίδια ένταση.



**Σχήμα 4.** Απεικόνιση δισδιάστατου φάσματος NMR. (α) Συστοιχία φασμάτων. (β) Διάγραμμα ισοϋψών καμπυλών.

Τα πειράματα φασματοσκοπίας 2D NMR μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τις πληροφορίες που παρέχουν. Εάν για παράδειγμα δίνουν πληροφορίες συσχέτισης φασματικών παραμέτρων μεταξύ όμοιων πυρήνων (π.χ. πρωτονίων) ή μεταξύ ανόμοιων πυρήνων, όπως για παράδειγμα μεταξύ άνθρακα-πρωτονίου ή και φωσφόρου-πρωτονίου.

Μια πιο θεμελιώδης διάκριση<sup>68</sup> μπορεί να γίνει λαμβάνοντας υπόψη εάν η ακολουθία παλμών περιέχει ή όχι την περίοδο ανάμιξης. Κατά την περίοδο ανάμιξης, μεταφέρονται πληροφορίες από ένα σύστημα σπιν, το οποίο έχει εξελιχθεί κατά τη διάρκεια  $t_1$ , σε ένα άλλο σύστημα σπιν, το οποίο ανιχνεύεται κατά την περίοδο  $t_2$ . Το προκύπτον δισδιάστατο φάσμα συσχετίζει τις συχνότητες  $\nu_1$  και  $\nu_2$ . Γι' αυτό το λόγο, πειράματα τα οποία γίνονται με ακολουθίες παλμών, οι οποίες περιέχουν την περίοδο ανάμιξης, αναφέρονται συνήθως ως πειράματα ή μέθοδοι συσχέτισης (correlation methods) και τα προκύπτοντα φάσματα αναφέρονται ως φάσματα συσχέτισης (correlated spectra). Εάν η συσχέτιση γίνεται μεταξύ φασματικών παραμέτρων ομοίων πυρήνων, προκύπτουν τα φάσματα συσχέτισης ομοίων πυρήνων (correlated homonuclear 2D NMR spectra), ενώ εάν η συσχέτιση γίνεται μεταξύ ανόμοιων πυρήνων, τα αντίστοιχα φάσματα ονομάζονται ετεροπυρηνικά φάσματα συσχέτισης (correlated heteronuclear 2D NMR spectra).

Στην περίπτωση όπου η ακολουθία παλμών δεν περιέχει την περίοδο ανάμιξης, τότε το ίδιο σύστημα εξελίσσεται και ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της ακολουθίας παλμών. Αυτό βέβαια προϋποθέτει ότι το σύστημα εκτίθεται σε δύο διαφορετικές φυσικές επιδράσεις κατά τη διάρκεια των δύο περιόδων και ότι θυμάται το παρελθόν του, δηλαδή θυμάται στην περίοδο ανίχνευσης τι του συνέβη στην περίοδο εξέλιξης. Ένα τέτοιο πείραμα, χωρίς την περίοδο ανάμιξης, συσχετίζει χημικές μετατοπίσεις με σταθερές σύζευξης ομοίων ή ανόμοιων πυρήνων (2D J-Resolved Spectroscopy).

Στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά πειράματα συσχέτισης. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα πειράματα COSY και NOESY ενώ η δεύτερη κατηγορία περιέχει τα πειράματα HMQC και HMBC.

### 3.2.3 Ομοπυρηνικά Πειράματα Συσχέτισης: COSY και NOESY

#### *COSY: Correlated Spectroscopy*

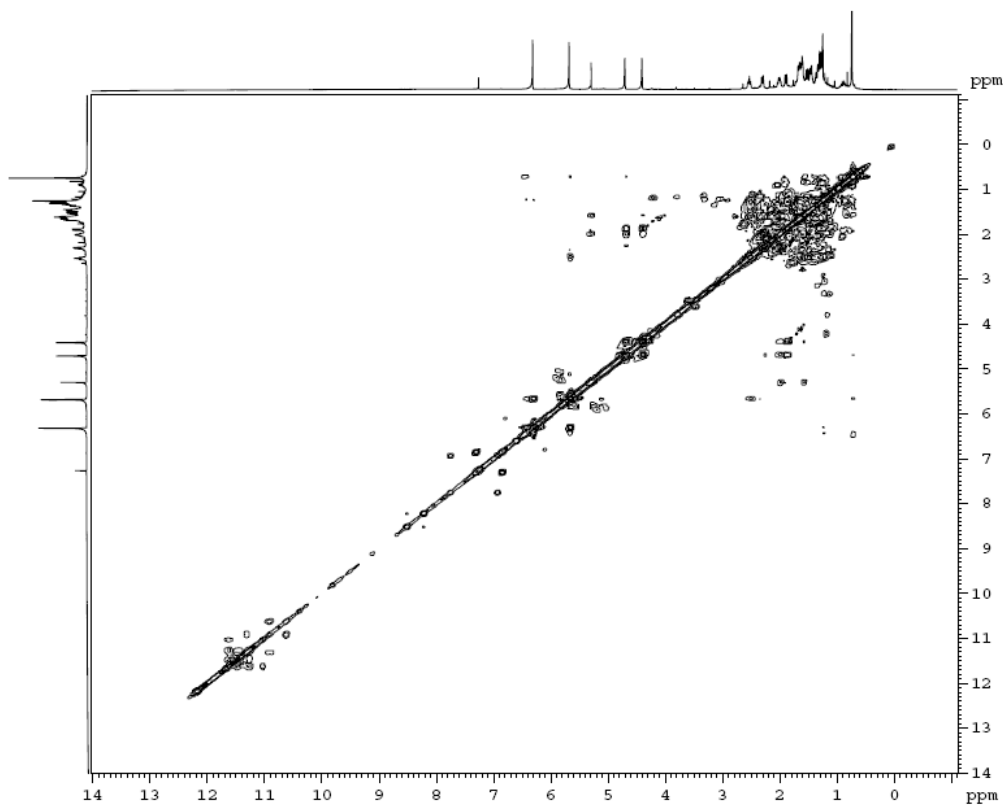
Είναι το πιο αξιόπιστο και το πιο συχνά εφαρμοζόμενο πείραμα δύο διαστάσεων που χρησιμοποιείται στην αποσαφήνιση της δομής και την ταυτοποίηση χημικών μορίων.

Η παλμική συχνότητα που εφαρμόζεται σε ένα τυπικό πείραμα COSY είναι ανάλογη με αυτήν για ετεροπυρηνικές συσχετίσεις, αλλά απλούστερη, και ουσιαστικά αποτελείται από μια σειρά συναρτήσεων της μορφής:<sup>70</sup>

$$\pi/2 - t_1 - \pi/2 - \text{Acquire [FID (}t_2\text{)]}$$

με  $t_1$  την προσαυξημένη καθυστέρηση η οποία αποδίδεται είτε σαν την βασική δισδιάστατη συχνότητα του πρωτονίου, είτε ως προσαύξηση από την hard-pulse SPI εφαρμοζόμενη συχνότητα. Τα πειράματα συχνά ονομάζονται COSY-90 ή COSY- $\pi/2$ . Είναι το αντίστοιχο του ετεροπυρηνικού πειράματος συσχέτισης HMQC το οποίο αναπτύσσεται παρακάτω.<sup>71</sup>

Πληροφορίες για το ποιοί δεσμοί σε ένα φάσμα αλληλεπιδρούν – συζευγνούνται, μπορούν να ανακτηθούν από ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα. Στην περίπτωση των COSY αναφερόμαστε σε ομοπυρηνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων. Για την αποφυγή των ετεροπυρηνικών αλληλεπιδράσεων που μπορεί να παρουσιαστούν, η παραπάνω συχνότητα περιλαμβάνει την μαγνητική μεταφορά ανάμεσα στις μεταβάσεις του συζευγμένου συστήματος, μεσολαβώντας του δεύτερου  $90^\circ$  ( $\pi/2$ ) παλμού.<sup>70</sup> Όμως, παρόμοιες μαγνητικές μεταφορές μπορεί να γίνουν και μεταξύ των ίδιων πυρήνων. Σε αυτήν την περίπτωση, αυτές οι κορυφές που φαίνονται στο δισδιάστατο COSY φάσμα, βρίσκονται πάνω ή πολύ κοντά στην κεντρική διαγώνιο του φάσματος ( $f_1=f_2$ ). Κορυφές εκτός διαγωνίου φανερώνουν ποιες συχνότητες στις αντίστοιχες μετατοπίσεις στους δύο άξονες, άρα και ποιοι πυρήνες, είναι συζευγμένοι. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα COSY παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.



**Σχήμα 5.** Αντιπροσωπευτικό δείγμα δισδιάστατου φάσματος COSY του costic acid.

*NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*

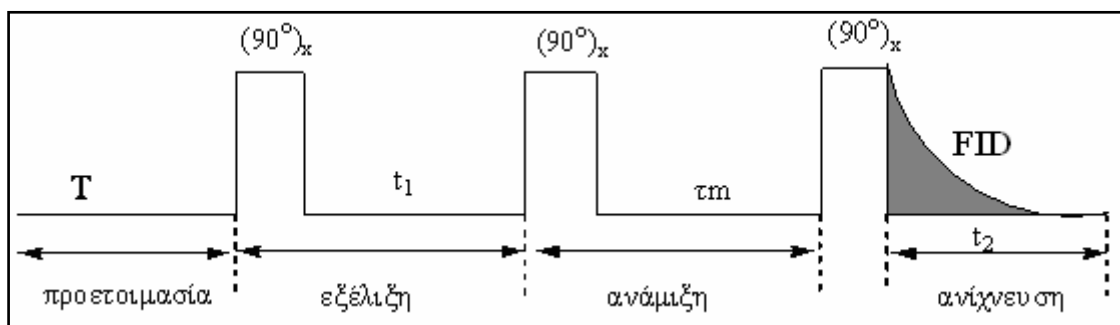
Η θεωρία του NOE βασίζεται στην αλληλεπίδραση των μαγνητικών ροπών δύο πρωτονίων (αλληλεπιδράσεις δίπολου – δίπολου), η οποία διαμορφώνεται από την περιστροφική κίνηση του μορίου στο διάλυμα. Επειδή η αλληλεπίδραση δίπολου-δίπολου συμβαίνει στο χώρο και εξαρτάται από την απόσταση των πρωτονίων, μας επιτρέπει έναν έμμεσο προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής ενός μορίου ή την ανάλυση των διαμορφώσεών του.<sup>64</sup> Παράλληλα, η εξάρτηση του NOE από την

απόσταση -  $\left(\frac{\mu_o}{4\pi}\right)^2 \frac{3}{2} \gamma_A^4 \eta^2 \frac{\tau_C}{r^6}$ , όπου  $\mu_o$  η μαγνητική διπολική ροπή,  $\gamma_A$  ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα,  $\tau_C$  ο χρόνος συσχέτισης και  $r$  η απόσταση - υποδηλώνει τη μείωση των αλληλεπιδράσεων δίπολου-δίπολου με αυτήν και συνεπώς περιορίζει την ακρίβεια της ανάλυσης για πρωτόνια που βρίσκονται πολύ κοντά (απέχουν στο χώρο  $<6 \text{ \AA}$ ).<sup>63</sup>

Το δισδιάστατο πείραμα NOE πραγματοποιείται με την εξής ακολουθία παλμών:

$$T - (90^\circ)_x - t_1 - (90^\circ)_x - r_m - (90^\circ)_x - t_2$$

Και μπορούμε να την αποδώσουμε σχηματικά (Σχήμα 6):



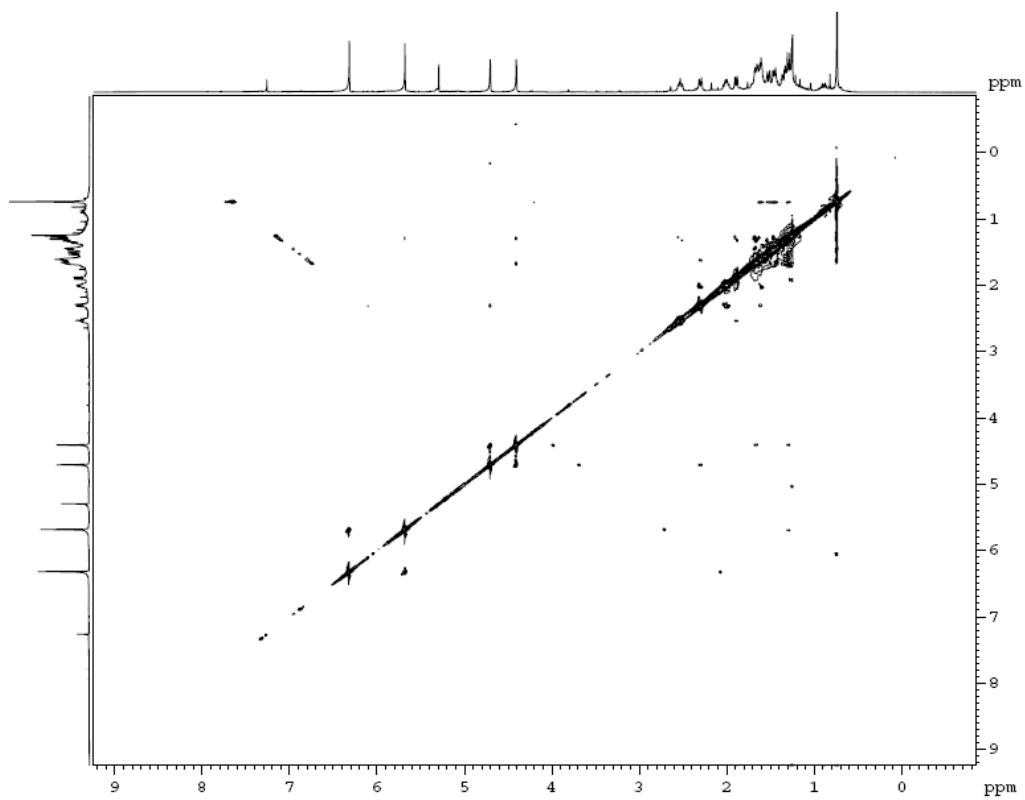
Σχήμα 6. Παλμική ακολουθία του πειράματος NOESY.

Μετά την περίοδο προετοιμασίας (χρόνος αναμονής T) κατά την οποία όλοι οι πυρήνες βρίσκονται στην κατάσταση ισορροπίας, εφαρμόζεται παλμός  $90^\circ$  στον άξονα x. Ο παλμός εκτρέπει τη μαγνήτιση στο επίπεδο xy. Κατά την διάρκεια του χρόνου εξέλιξης  $t_1$ , η οριζόντια μαγνήτιση αναλύεται στις συνιστώσες της, οι οποίες περιστρέφονται με τις συχνότητες Larmor – συχνότητα μεταπτωτικής κίνησης: κίνηση περιστρεφόμενου σωματιδίου εντός μαγνητικού πεδίου  $B_0$ , είναι ίδια με την συχνότητα απορροφούμενης ακτινοβολίας  $\nu_0 = \nu_i - \nu_j = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$  κάθε πυρήνα. Οι

γωνίες περιστροφής των συνιστωσών μαγνητίσεων γύρω από τον άξονα y εξαρτώνται από τις συχνότητες Larmor και την χρονική διάρκεια  $t_1$ . Στο τέλος της περιόδου της εξέλιξης εφαρμόζεται ένας δεύτερος παλμός  $(90^\circ)_x$ , ο οποίος δημιουργεί μαγνήτιση κατά τον άξονα z. Κατά την περίοδο ανάμιξης  $t_m$ , γίνεται μεταφορά μαγνήτισης από το ένα πρωτόνιο στο άλλο μέσω της διασταυρούμενης αποδιέργησης. Ο τρίτος παλμός  $(90^\circ)_x$  επαναφέρει τη μαγνήτιση στο επίπεδο xy, η οποία ανιχνεύεται κατά την περίοδο ανίχνευσης  $t_2$ . Η προκύπτουσα FID περιέχει όλες τις πληροφορίες της συμπεριφοράς των πρωτονίων κατά τη διάρκεια των περιόδων εξέλιξης και ανάμιξης. Με άλλα λόγια περιέχει το «κτίσιμο» του NOE του δικτύου των σπιν κατά τον χρόνο ανάμιξης  $t_m$ . Το πείραμα μπορεί να επαναληφθεί με έναν αυξανόμενο αριθμό  $t_m$ , ώστε να καταγραφεί η πλήρης ανάμιξη του NOE.

Για δεδομένο χρόνο  $t_m$ , το πείραμα επαναλαμβάνεται αυξάνοντας σταδιακά τον χρόνο εξέλιξης. Έτσι λαμβάνουμε μια σειρά από FIDs, οι οποίες εξαρτώνται από τον χρόνο  $t_1$  και  $t_2$  (δισδιάστατο πείραμα). Το δισδιάστατο φάσμα NOESY προκύπτει από έναν διπλό μετασχηματισμό Fourier. Ένα χαρακτηριστικό φάσμα NOESY φαίνεται στο Σχήμα 7.





Σχήμα 7. Φάσμα NOESY του cotic acid.

Σε ένα φάσμα NOESY παρατηρούμε δυο είδη κορυφών: α) τις κορυφές που βρίσκονται επί της διαγωνίου ή διαγώνιες κορυφές (diagonal peaks) και β) τις κορυφές εκτός διαγωνίου (off diagonal peaks) ή αλλιώς κορυφές διασταύρωσης (cross peaks). Οι πρώτες αντιστοιχούν ακριβώς στις συχνότητες συντονισμού των πρωτονίων και υποδηλώνουν μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ ισοδύναμων πρωτονίων. Οι εκτός διαγωνίου κορυφές είναι συμμετρικές ως προς την διαγώνιο και υποδηλώνουν μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ μη ισοδύναμων πρωτονίων. Με άλλα λόγια, συνδέουν μαγνητικά μη ισοδύναμα πρωτόνια τα οποία αποδιεγείρονται με την διασταυρούμενη αποδιέγερση.<sup>72</sup>

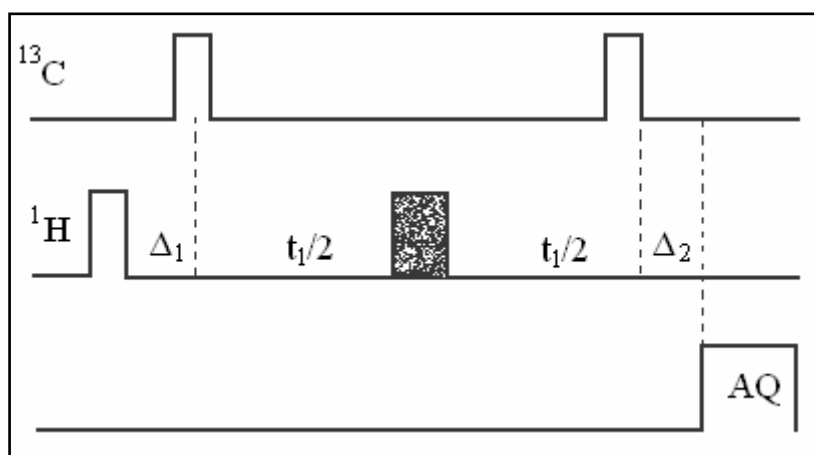
Το πιο σημαντικό στοιχείο του φάσματος NOESY είναι οι κορυφές του, οι διασταύρωσης, οι οποίες αντανakλούν την ανάπτυξη του φαινομένου NOE στο δίκτυο των πρωτονίων. Επειδή η ανάπτυξη του NOE απαιτεί η απόσταση στο χώρο μεταξύ των πρωτονίων που αλληλεπιδρούν να είναι μικρή (όπως προαναφέρθηκε, <6 Å), οι διασταυρούμενες αυτές κορυφές αποκαλύπτουν ζεύγη πρωτονίων που είναι γειτονικά στο χώρο. Οι πληροφορίες αυτές είναι σημαντικές και σε συνδυασμό με τις άλλες τεχνικές 2D NMR, συμβάλλουν στη διευκρίνιση της δομής και της διαμόρφωσης στον χώρο μίας χημικής ένωσης.

### **3.2.4 Ετεροπυρηνικά Πειράματα Συσχέτισης: *HMQC* και *HMBC***

Για να ερμηνευτούν πλήρως τα φάσματα NMR μιας οργανικής ένωσης είναι συχνά επιθυμητή η συσχέτιση μεταξύ των πυρήνων άνθρακα και πρωτονίων (<sup>13</sup>C και <sup>1</sup>H) ώστε να μπορεί να διευκρινιστεί ποιο H συνδέεται με ποιόν C. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με εκλεκτικά πειράματα αποσύζευξης, αλλά πρέπει να γίνει ξεχωριστά για κάθε κορυφή του φάσματος <sup>1</sup>H, διαδικασία εξαιρετικά χρονοβόρα ειδικά αν πρόκειται για μεγάλα οργανικά μόρια.<sup>70</sup> Βέβαια για την λύση του παραπάνω προβλήματος έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές που κάνουν εύκολη την συσχέτιση ετεροπυρηνικών ατόμων. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στη μεταφορά ενέργειας λόγω πολωσιμότητας (polarization transfer) από το άτομο του C σε αυτό του H.

Με αυτές τις τεχνικές συσχετίζονται οι χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων με πυρήνες <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, ή <sup>31</sup>P με τους οποίους συνδέονται με χημικό δεσμό (π. χ. C-H, N-H, ή H-P). Η συσχέτιση αυτή γίνεται μέσω της ετεροπυρηνικής σύζευξης. Έτσι, μπορούμε να προσδιορίσουμε τις χημικές μετατοπίσεις κορυφών στα φάσματα <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, ή <sup>31</sup>P εάν γνωρίζουμε τις χημικές μετατοπίσεις στο αντίστοιχο πρωτονιακό φάσμα και αντίστροφα. Σε ένα τέτοιο πείραμα, πρώτα λαμβάνεται το φάσμα <sup>1</sup>H, με

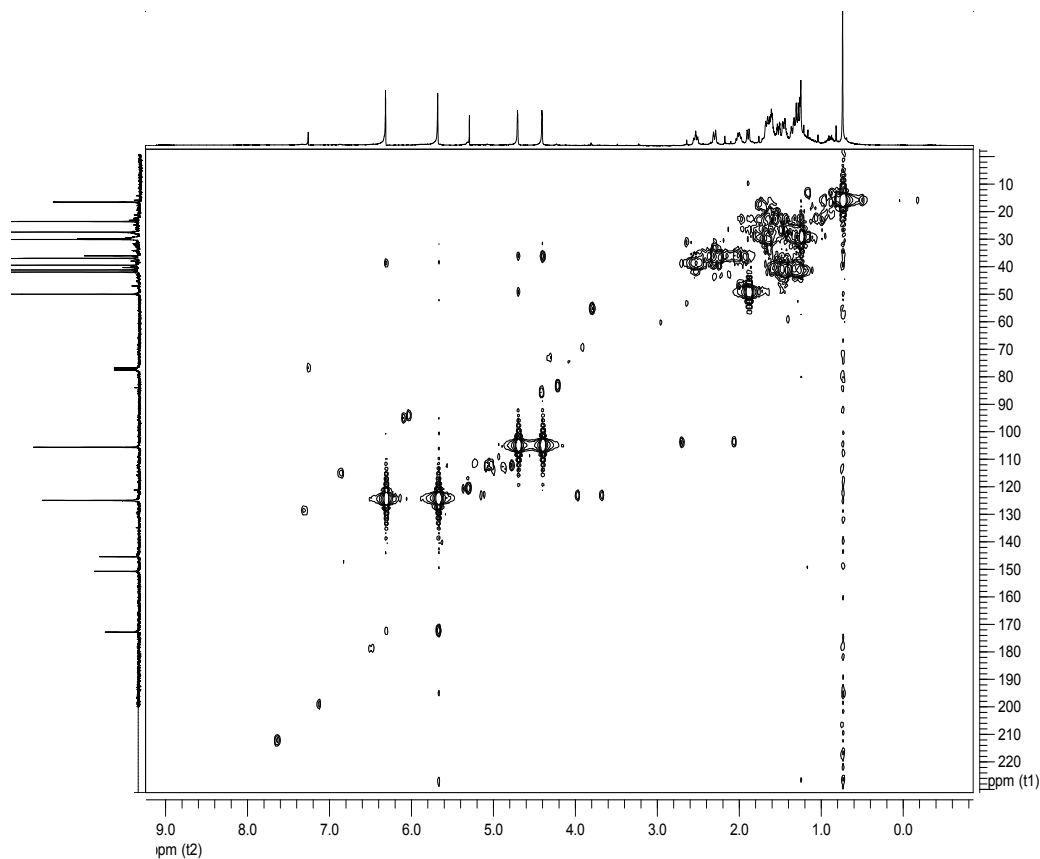
τέτοια ακτινοβολία ώστε να προκαλέσει την πόλωση των πυρήνων  $^{13}\text{C}$  μέσω του φαινομένου NOE και έτσι καταστρέφεται το δίκτυο μαγνήτισης των πρωτονίων. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται η κατάλληλη συχνότητα polarization transfer, με τους πυρήνες του  $^{13}\text{C}$  να υποβάλλονται στους  $\pi/2$  παλμούς και τα πρωτόνια να υποβάλλονται στον εφαρμοζόμενο παλμό. Στο τελικό φάσμα εμφανίζονται μόνο κορυφές που αντιστοιχούν σε πρωτόνια που είναι συζευγμένα με τους πυρήνες  $^{13}\text{C}$ .<sup>67</sup> Στην εφαρμογή η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη συχνότητα είναι αυτή που βασίζεται στη συσχέτιση των πυρήνων μέσω πολλαπλής κβαντικής συστολής και η τεχνική είναι γνωστή ως HMQC (Heteronuclear Correlation through Multiple Coherence). Το βασικό πείραμα HMQC αποτελείται από ένα συνδυασμό δύο ακολουθιών παλμών, οι οποίες επενεργούν στους πυρήνες  $^1\text{H}$  και στους λιγότερους ευαίσθητους πυρήνες, π.χ.  $^{13}\text{C}$ . Στο Σχήμα 8, απεικονίζεται η ακολουθία παλμών του πειράματος HMQC.



**Σχήμα 8.** Συχνότητα του παλμού HMQC. Παρόμοια συχνότητα χρησιμοποιείται και στα πειράματα HMBC.

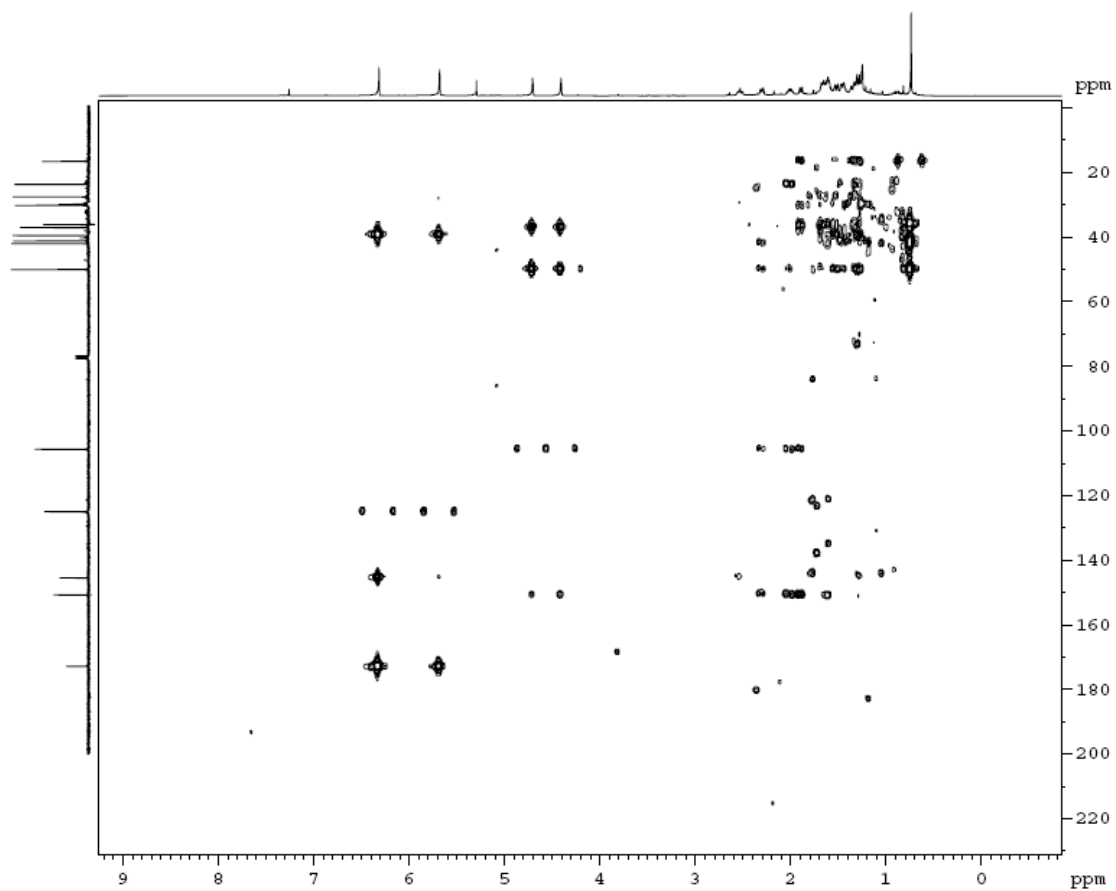
Η καθυστέρηση  $\Delta_1$  αντιστοιχεί σε  $(2J_{\text{CH}})^{-1}$  και έτσι μπορεί να ρυθμιστεί για σύζευξη πρωτονίων που βρίσκονται σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα (one-bond coupling) ή για σύζευξη με γειτονικά άτομα C (long-range HMQC).

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 9) παρουσιάζεται το δισδιάστατο φάσμα HMQC για το costic acid.



**Σχήμα 9.** Φάσμα HMQC του costic acid.

Ένα ακόμα χρήσιμο πείραμα ετεροπυρηνικής σύζευξης που βασίζεται στις ίδιες αρχές με τα πειράματα HMQC, είναι η τεχνική long-range C-H ( $^3J_{n>3}$ ) HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity). Με ένα πείραμα HMBC μπορούμε να εντοπίσουμε τις αλληλεπιδράσεις πρωτονίων-άνθρακα που βρίσκονται σε απόσταση μεγαλύτερη από έναν δεσμό, συνήθως δύο ή τρεις δεσμούς ( $^2J_{CH}$  και  $^3J_{CH}$ ) μέσω  $^1H$ ,  $^{13}C$  σταθερές σύζευξης. Είναι επίσης πιθανό, να πάρουμε σημαντικές πληροφορίες για συσχετίσεις C-H σε μεγαλύτερη απόσταση,  $^nJ_{CH} \text{ } n>3$ , αν ληφθούν πολλαπλά πειράματα HMBC με διαφορετική long-range καθυστέρηση,  $\Delta_2$  (Σχήμα 8). Οι παραπάνω συσχετίσεις μακράς εμβέλειας (long range correlations) έχουν αποδειχτεί σημαντικές στην δομική αποσαφήνιση των οργανικών μορίων.<sup>73</sup> Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 10) παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό NMR φάσμα long-range HMBC του costic acid.



Σχήμα 10. Δισδιάστατο φάσμα long-range HMBC του costic acid.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Συλλογή και κατεργασία πρώτης ύλης

Φύλλα ακονιζάς συλλέχθηκαν από 5 διαφορετικές περιοχές της Κρήτης, τοποθετήθηκαν και ξηράθηκαν υπό σκιά για περίπου 20 ημέρες. Η αποξηραμένη ακονιζά κονιορτοποιήθηκε και τα συστατικά της εκχυλίστηκαν με αιθανόλη ακλουθώντας την εξής διαδικασία: σε σφαιρική φιάλη 2 L, τοποθετήθηκε 1 L αιθανόλη. Στην φιάλη προσαρμόστηκε συσκευή Soxhlet, με thimble 12cm x 3,5cm, στο οποίο τοποθετήθηκε δείγμα από κονιοποιημένα αποξηραμένα φύλλα ακονιζάς συνολικού βάρους 10,30 g. Εκχύλιση με αιθανόλη υπό αναβρασμό επί 4 ώρες, έδωσε διάλυμα το οποίο συμπυκνώθηκε σε κενό, αποδίδοντας εκχύλισμα τελικού βάρους 2,70 g. Η απόδοση ήταν 26% σε βάρος αποξηραμένου δείγματος.

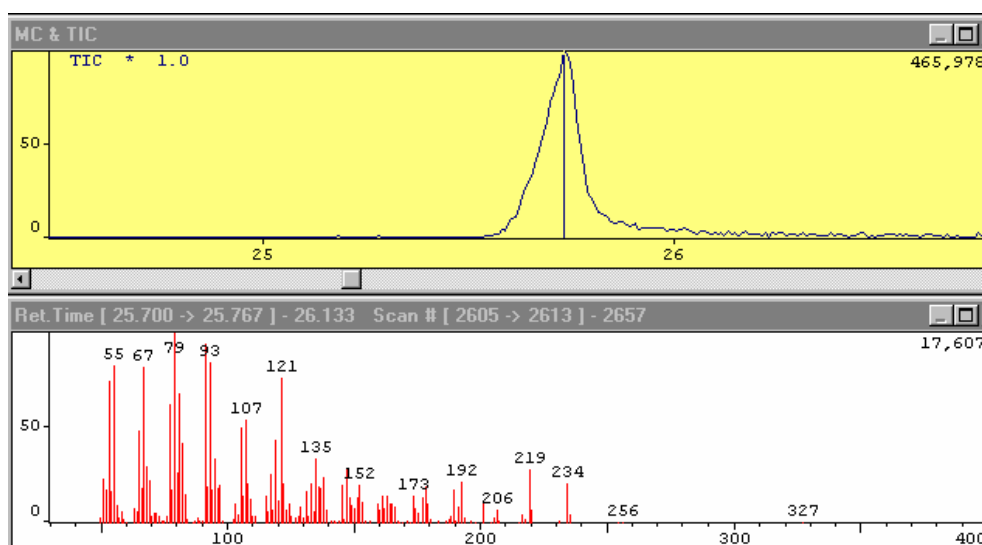
Από την παραπάνω ποσότητα εκχυλίσματος, ζυγίστηκαν 0,64 g τα οποία διαλύθηκαν σε 2 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Στήλη χρωματογραφίας flash εσωτερικής διαμέτρου 3,5 cm, πληρώθηκε με Silica Gel 60 (0,040-0,063mm) σε ύψος 12 cm.

Τα συστήματα διαλυτών βαθμιδωτής έκλυσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Acetone/PE στις εξής αναλογίες: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%. Χρησιμοποιήθηκαν 100 ml από το κάθε σύστημα. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με MeOH. Ελήφθησαν κλάσματα των 13 ml σε 131 δοκιμαστικούς σωλήνες οπότε συλλέχθηκαν τα περισσότερα διακριτά συστατικά και κατά τη τελική έκπλυση της στήλης συλλέχθηκαν κλάσματα των 50 ml σε 4 κωνικές φιάλες. Ελήφθησαν δείγματα για ανάλυση TLC ανά 2 δοκιμαστικούς σωλήνες τα οποία αναπτύχθηκαν με διάλυμα Ac/Tol 30%. Για την ανάλυση TLC χρησιμοποιήθηκαν υάλινα πλακίδια επιστρωμένα με ξηροπηκτική διοξειδίου του πυριτίου (silica gel 60, F254S). Τα προϊόντα εμφανίστηκαν με εμβάπτιση των πλακιδίων σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος σε αιθανόλη 3% και με θέρμανση. Σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία, τα κλάσματα κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες, με αντίστοιχα  $R_f$  για την κάθε μία: Α' ομάδα  $R_f$ : 0.90-0.80, Β' ομάδα  $R_f$ : 0.80-0.60, Γ' ομάδα  $R_f$ : 0.10-0.01.

Στη συνέχεια για κάθε ομάδα έγινε *in vivo* δοκιμή επί ζώντων βαρρόα. Η βαρρόα συλλέχθηκε με δύο τρόπους: α) εξήχθη προσεκτικά από νεογέννητες μέλισσες με ένα μαλακό βουρτσάκι και β) τοποθετώντας ενήλικες μέλισσες σε ένα κύλινδρο

από συρμάτινο πλέγμα και αυτό σε δεύτερο κύλινδρο από Plexiglas όπου εφαρμόζεται ροή CO<sub>2</sub> (5 L/min) για 5 λεπτά, με αποτέλεσμα να υπνωτίζεται η μέλισσα και η βαρρόα ώστε ανακινώντας τον πρώτο κύλινδρο να πέφτει η υπνωτισμένη βαρρόα η οποία συνέρχεται σε λίγα λεπτά.<sup>74</sup> Με τη βοήθεια ενός στερεοσκοπίου η βαρρόα τοποθετείται αμέσως σε υάλινα φιαλίδια των 20 ml. Από τα προϊόντα της εκχύλισης της ακονιζάς παρασκευάστηκαν διαλύματα ακετόνης, συγκέντρωσης 10 mg/ml, τα οποία τοποθετήθηκαν στο καπάκι του φιαλιδίου. Έγιναν μετρήσεις για τρεις διαφορετικές ποσότητες διαλύματος 20μl, 60μl και 100μl. Σε κάποια φιαλίδια τοποθετήθηκε από την αντίστοιχη ποσότητα μόνο ακετόνη για να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρας. Η ακετόνη απομακρύνθηκε με αέριο άζωτο από τα καπάκια και σφραγίσθηκαν τα φιαλίδια με την βαρρόα, όπου παρέμειναν σε επωαστικό κλίβανο στους 34 °C και ακολούθησαν μετρήσεις της επίδρασης μετά από 5, 8, 12 και 19 ώρες.

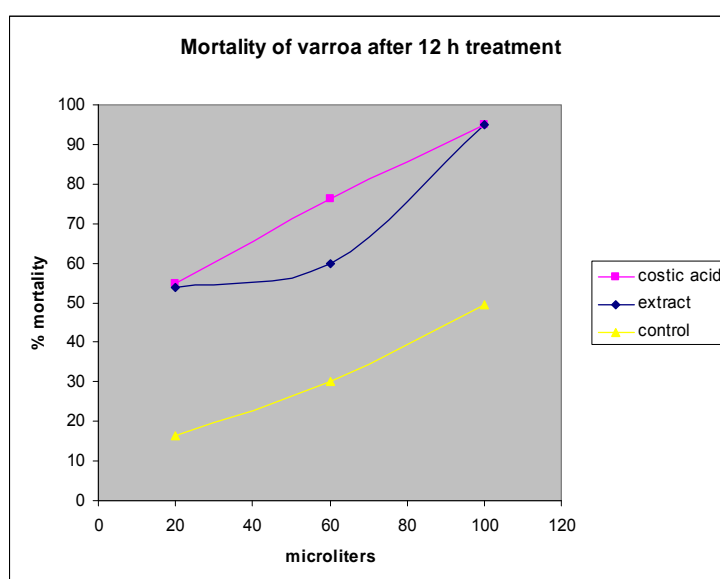
Συγκεκριμένες ομάδες των εκχυλισμάτων ακονιζάς στις πρώτες *in vivo* μελέτες παρουσίασαν επιλεκτική τοξικότητα ενάντια στην βαρρόα, παρά το γεγονός ότι δρουν ταυτόχρονα ως ελκυστικές ουσίες. Με δεδομένη την ταυτοποίηση συγκεκριμένης ομάδας συστατικών ως δραστικής ομάδας (B' ομάδα R<sub>f</sub> : 0.80-0.60), στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ακολούθησε χημική ανάλυση του μίγματος με χρήση GC/MS (αέρια χρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματοσκοπία μάζας) με σκοπό την ταυτοποίηση των χημικών συστατικών. Στο ακόλουθο χρωματογράφημα παρουσιάζεται σε καθαρή μορφή το πλέον δραστικό συστατικό του κλάσματος και το φάσμα μάζας της ένωσης.



Χρησιμοποιώντας το δραστικό κλάσμα συστατικών δημιουργήθηκε το ακόλουθο σκεύασμα για την καταπολέμηση της βαρρόα: 1 g από το κλάσμα διαλύθηκε σε 1ml αιθανόλης και το διάλυμα αραιώθηκε με νερό μέχρι τελικού όγκου 1L. Το σκεύασμα αυτό χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε μελέτες πεδίου σε διαφορετικές περιοχές της Κρήτης.

Από τη Β' ομάδα ( $R_f$ : 0.80-0.60), που είναι η ομάδα που παρουσιάζει την μεγαλύτερη βιολογική δραστικότητα σύμφωνα με τα πειράματα κατά της βαρρόα, αναλύθηκαν τα συστατικά του κλάσματος με πολλαπλούς διαχωρισμούς χρωματογραφίας στήλης ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Τα συστατικά αυτά χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά και διαπιστώθηκε ότι το κύριο συστατικό είναι το costic acid ( $R_f$ : 0.70) (βλέπε τμήμα αποτελέσματα), με απόδοση 4.5 % σε βάρος του αρχικού εκχυλίσματος, ενώ τα άλλα δύο που χαρακτηρίστηκαν από το φάσμα μάζας τους είναι φλαβονοειδή με ονομασίες 7-O-methyl-Aromadendrin και 7-O-methyl-Aromadendrin-3-acetate, αντίστοιχα. Ακολούθησε μία νέα σειρά *in vivo* πειραμάτων επί ζώντων βαρρόα, αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας διαλύματα από τα τρία αυτά συστατικά, με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε πρωτύτερα, όπου φάνηκε ότι η μεγαλύτερη βιολογική δραστικότητα οφείλεται στο costic acid. Η βέλτιστη δόση διαλύματος costic acid αποδείχθηκε να είναι αυτή των 60 μl ανά φιαλίδιο, καθώς μεγαλύτερη ποσότητα δεν έφερε καλύτερα αποτελέσματα.

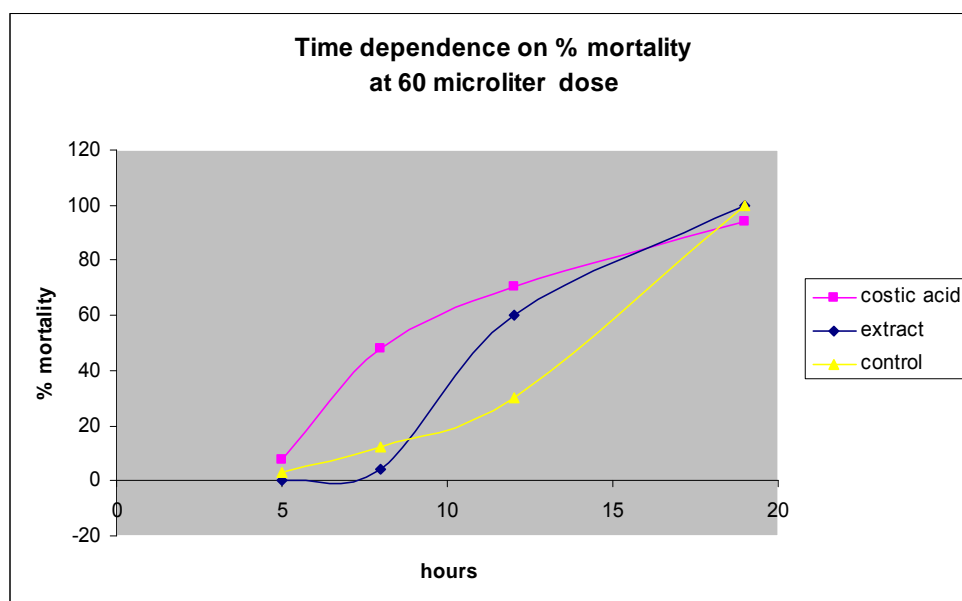
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα γραφήματα που προέκυψαν από τη στατιστική μελέτη των πειραματικών μας δεδομένων.



**Γράφημα 1.**



Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται η επί τοις εκατό θνησιμότητα της βαρρόα παρουσία ποσοτήτων 20, 60, και 100 μl διαλυμάτων ακετόνης συγκέντρωσης 10 mg/ml του εκχυλίσματος και του costic acid, αντίστοιχα, καθώς και του μάρτυρα (ακετόνη). Είναι προφανές ότι η θνησιμότητα του παρασίτου αυξάνεται ραγδαία στην περίπτωση του costic acid, ενώ η δραστηριότητα του εκχυλίσματος προσεγγίζει τα ίδια επίπεδα μόνο στην μέγιστη δόση. Το ποσοστό θνησιμότητας στον μάρτυρα παραμένει σε γενικές γραμμές, στα ίδια επίπεδα.



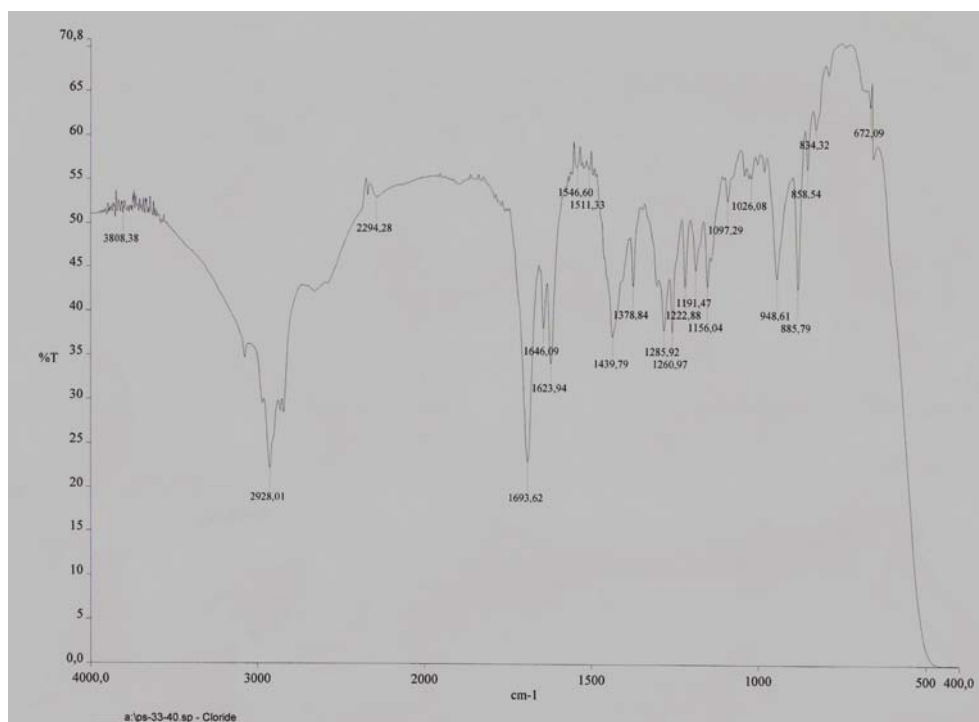
**Γράφημα 2.**

Στο Γράφημα 2 παρουσιάζεται η αλλαγή της επίδρασης των δειγμάτων με την πάροδο του χρόνου. Η μεγαλύτερη διαφορά επίδρασης μεταξύ costic acid και εκχυλίσματος παρουσιάζεται στις 8 ώρες ενώ η διαφορά αυτή μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Στο σημείο αυτό πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην αύξηση της θνησιμότητας της βαρρόα στην περίπτωση του μάρτυρα. Είναι γνωστό από προηγούμενα πειράματα ότι το παράσιτο παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας όταν απομακρυνθεί από τον ξενιστή του. Συνεπώς η θνησιμότητα στον μάρτυρα, η οποία προσεγγίζει το 100% στις 19 ώρες είναι αναμενόμενη. Είναι επίσης πιθανόν ο παράγοντας αυτό να συνεισφέρει κατά ένα ποσοστό στην ελάττωση της διαφοράς στην θνησιμότητα μεταξύ costic acid και εκχυλίσματος στις 12 ώρες. Κατά συνέπεια η πραγματική διαφορά δραστηριότητας παρουσιάζεται στις 8 ώρες όπου η θνησιμότητα, λόγω απομάκρυνσης από τον ξενιστή, είναι ελάχιστη.

#### 4.1 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του δραστικού συστατικού της *Dittrichia viscosa* (L.)

Οι φασματοσκοπικές μας μελέτες του δραστικού συστατικού της *D. viscosa* έδειξαν ότι η ένωση αυτή είναι γνωστή με το όνομα costic acid. Ωστόσο, επειδή στις ήδη δημοσιευμένες φασματοσκοπικές μελέτες για τον προσδιορισμό της δομής του costic acid υπήρχαν κάποιες ασυμφωνίες, και λόγω της μεγάλης σημασίας της διευκρίνησης της σωστής δομής για την έρευνά μας, επιχειρήθηκε η παρουσίαση ενός πλήρους φασματοσκοπικού χαρακτηρισμού της ένωσης, ο οποίος εν συντομία περιγράφεται ως εξής:

Η φασματοσκοπία IR υπέδειξε ξεκάθαρα την παρουσία μίας καρβοξυλομάδας ( $2928\text{ cm}^{-1}$ ).



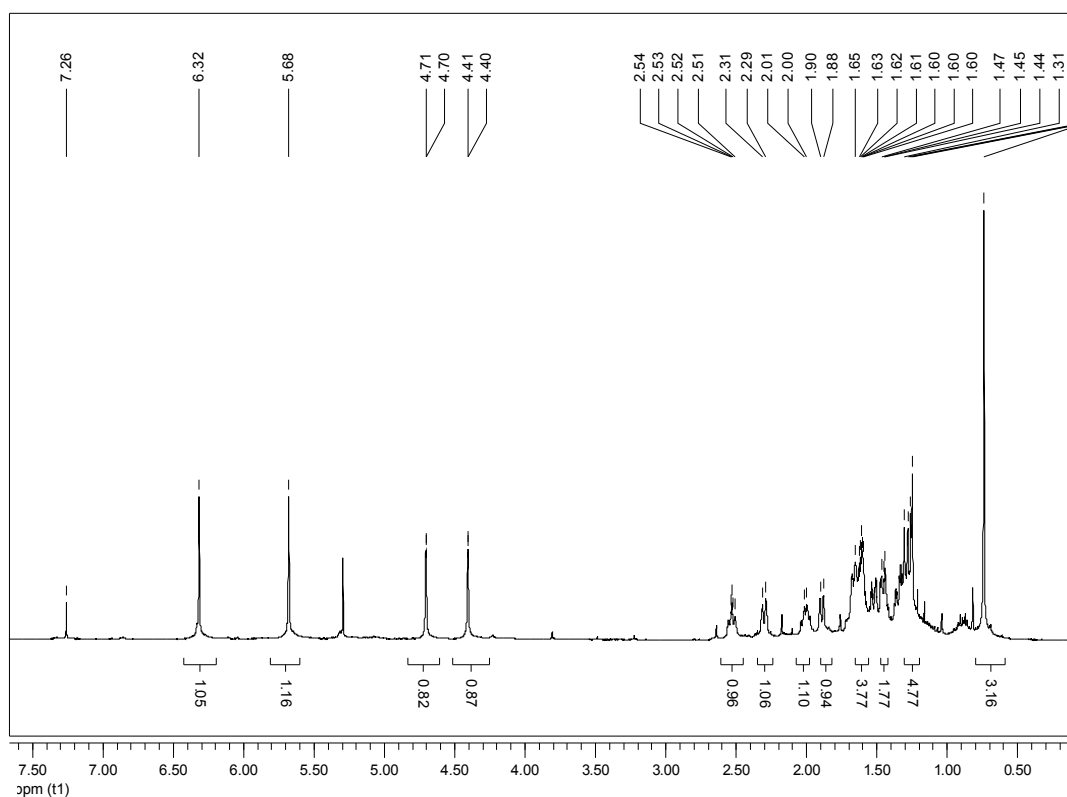
Φάσμα IR του costic acid.

## 4.2 Ανάλυση Φασμάτων NMR μίας διάστασης

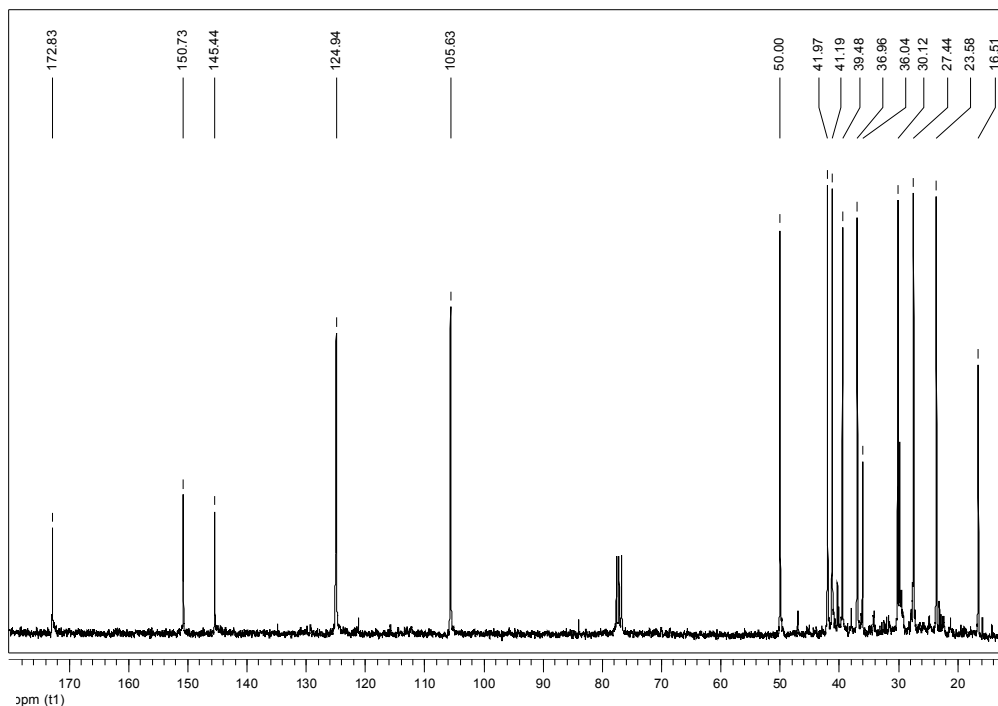
Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο FT-NMR AMX500, (500MHz) της εταιρίας Bruker ενώ τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο FT-NMR MSL300 (300MHz) της εταιρίας Bruker. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $\text{CDCl}_3$ . Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων αναγράφονται σε ppm σε σχέση με την μετατόπιση του τετραμεθυλοσιλανίου (TMS).

Από το πρωτονιακό φάσμα διαπιστώσαμε ότι πρόκειται για μια ένωση η οποία έχει τέσσερα βινυλικά πρωτόνια: στα 6,31 ppm (H-13 $_{\alpha}$ ) και στα 5,68 ppm (H-13 $_{\beta}$ ), οι οποίες είναι απλές κορυφές, καθώς και στα 4,71 ppm (H-15 $_{\beta}$ ) και στα 4,41 ppm (H-15 $_{\alpha}$ ) οι οποίες σχάζονται ελαφρά μεταξύ τους. Στα υψηλότερα πεδία, παρουσιάζεται μία απλή κορυφή στα 0,75 ppm (3 H, H-14) που αποδίδεται σε μία μεθυλική ομάδα. Η απουσία κορυφών στα χαμηλότερα πεδία (6,50 ppm -9,50 ppm) φανερώνει ότι στο μόριο μας δεν υπάρχει αρωματικότητα.

Η ολοκλήρωση όλων των πρωτονίων του φάσματος μας φανερώνουν ότι πρόκειται για μία ένωση που έχει 21 πρωτόνια, προσθέτοντας όμως ακόμη ένα πρωτόνιο από την καρβοξυλομάδα που εντοπίστηκε στο φάσμα IR, δηλαδή 22 πρωτόνια στο σύνολο, ενώ στο φάσμα του άνθρακα εντοπίστηκαν 15 κορυφές.



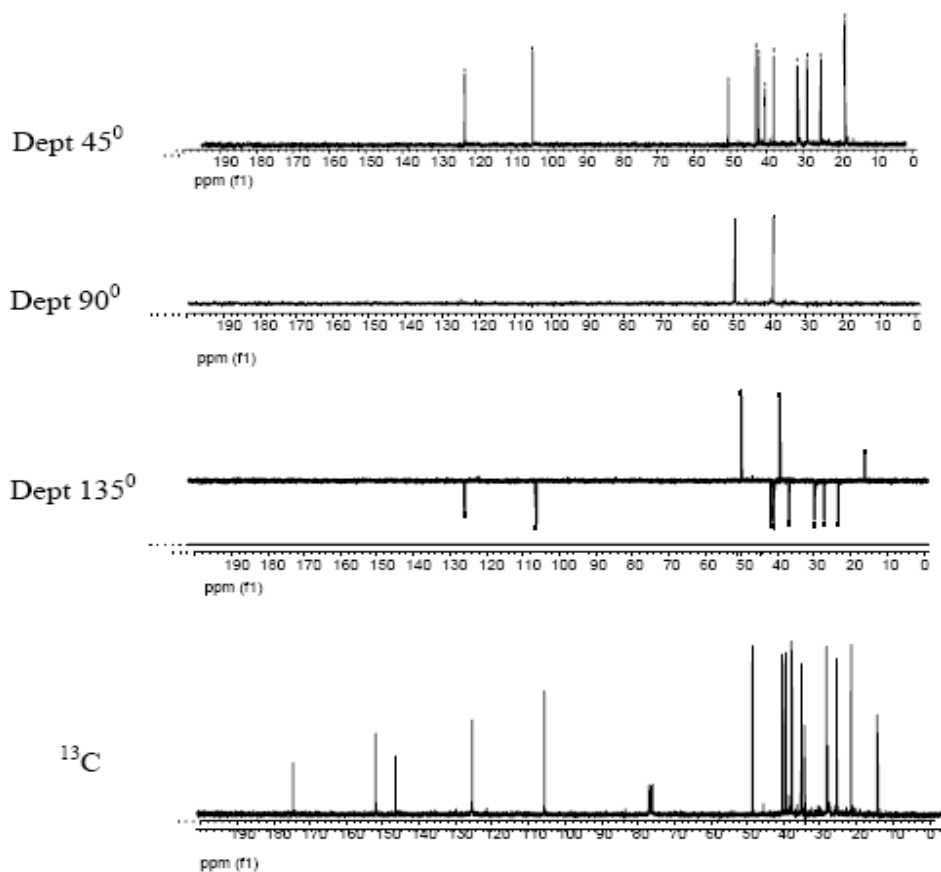
Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του costic acid.



Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR του costic acid.

Στη συνέχεια, θεωρήθηκε ως σημαντική η λήψη φασμάτων DEPT, τα οποία θα υποδείκνυαν τον βαθμό υποκατάστασης του κάθε άνθρακα. Τα φάσματα αυτά ελήφθησαν σε φασματογράφο FT-NMR MSL300 της εταιρίας Bruker. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $\text{CDCl}_3$ .

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τεταρτοταγείς C δεν εμφανίζονται στα φάσματα αυτά εξαιτίας πολύ χαμηλής έντασης του σήματος τους. Στο Σχήμα 11, παρουσιάζονται τα φάσματα DEPT  $135^\circ$  όπου οι πρωτοταγείς και τριτοταγείς άνθρακες δίδουν θετικό σήμα και οι δευτεροταγείς άνθρακες αρνητικό σήμα, φάσμα DEPT  $90^\circ$  όπου δίδουν σήμα μόνο οι τριτοταγείς άνθρακες και τέλος φάσμα DEPT  $45^\circ$  στο οποίο δίδουν σήμα όλοι οι άνθρακες εκτός των τεταρτοταγών.



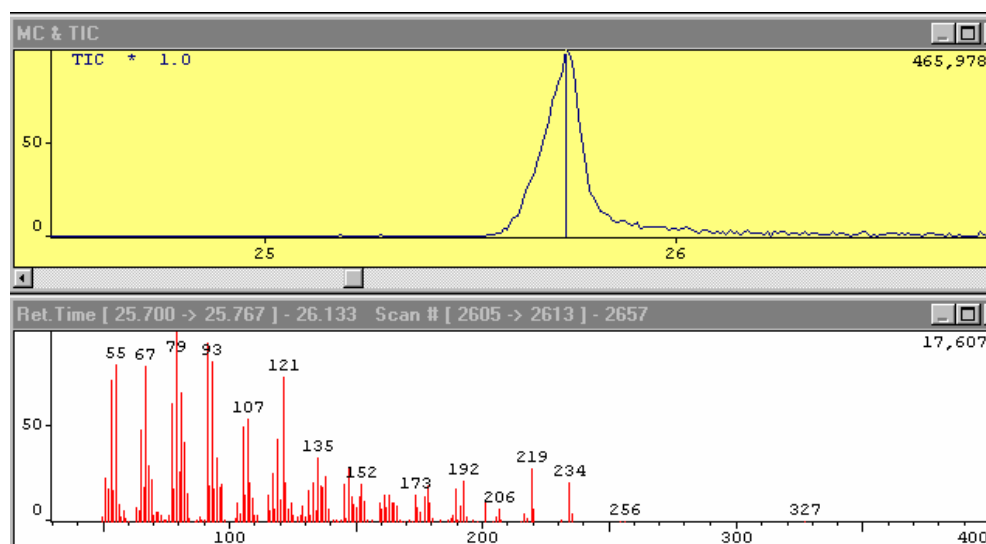
**Σχήμα 11.** Φάσματα DEPT 45<sup>0</sup>, 90<sup>0</sup> και 135<sup>0</sup>, αντίστοιχα όπου διευκρινίζεται ο βαθμός υποκατάστασης του κάθε άνθρακα. Παρατίθεται το φάσμα <sup>13</sup>C-NMR για λόγους σύγκρισης.

Η σύγκριση των φασμάτων <sup>13</sup>C-DEPT με το ολικό φάσμα <sup>13</sup>C-NMR, αποκρυπτογραφεί την ταυτότητα του κάθε άνθρακα του μορίου μας. Έτσι, φάνηκε η παρουσία ενός μεθυλικού άνθρακα, όπως επίσης έξι δευτεροταγών αλειφατικών, δύο τριτοταγών αλειφατικών, ενός τεταρτοταγούς αλειφατικού, ενός καρβονυλικού, δύο τεταρτοταγών ολεφινικών και δύο δευτεροταγών ολεφινικών ανθράκων.

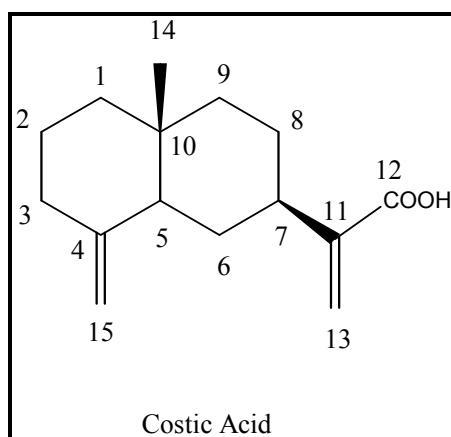
Από τα φάσματα αυτά αποσαφηνίστηκε ότι στο μόριο μας υπάρχουν τέσσερις τεταρτοταγείς άνθρακες, στα 36,04 ppm (C-10), στα 145,44 ppm (C-11), στα 150,73 ppm (C-4) και στα 172,83 ppm (C-12), κορυφές οι οποίες απουσιάζουν από τα τρία φάσματα DEPT. Από τις χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων, είναι φανερό ότι ο

τελευταίος (172,83 ppm) ανήκει σε καρβονύλιο, οι άλλοι δύο (στα 145,44 ppm και στα 150,73 ppm) ανήκουν σε συστήματα διπλών δεσμών, ενώ ο άλλος ένας (στα 36,04 ppm) έχει  $sp^3$  υβριδισμό. Ακόμα υπάρχουν δύο τριτοταγείς άνθρακες, στα 50,00 ppm (C-5) και στα 39,48 ppm (C-7), θετικές κορυφές στο DEPT 135°, ενώ στο ίδιο φάσμα υπάρχει ακόμα μία θετική κορυφή που αποδίδεται στο μεθύλιο (πρωτοταγής άνθρακας), συγκεκριμένα στα 16,51 ppm (C-14). Οι δευτεροταγείς άνθρακες φαίνονται σαν αρνητικές κορυφές στο φάσμα DEPT 135°. Έτσι, παρουσιάζονται οκτώ κορυφές που αποδίδονται σε δευτεροταγείς άνθρακες, στα 23,58 ppm (C-2), στα 27,44 ppm (C-8), στα 30,12 ppm (C-6), στα 36,96 ppm (C-1), στα 41,19 ppm (C-9), στα 41,97 ppm (C-3), στα 105,63 ppm (C-15) και στα 124,94 ppm (C-13). Οι δύο τελευταίοι λόγω του ότι είναι και βινυλικοί άνθρακες, δεν μπορούν παρά να είναι εξωκυκλικοί. Στο φάσμα DEPT 90° στο οποίο, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζονται μόνο οι κορυφές των CH, έχουμε έντονες κορυφές των C-5 στα 50,00 ppm και C-7 στα 39,48 ppm.

Στο φάσμα μάζας παρουσιάστηκε μία κύρια κορυφή με  $m/z$ : 234, η οποία αντιστοιχούσε σε πιθανό μοριακό τύπο  $C_{15}H_{22}O_2$ .



Με δεδομένο ότι η ένωση μας έχει βαθμό ακορεστότητας 5, ένα καρβονύλιο και δύο ολεφινικούς διπλούς δεσμούς, προτάθηκε η πιθανή δομή του δικυκλικού συστήματος του costic acid, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



**Εικόνα 8.** Δομή του costic acid.

Για λόγους σύγκρισης, τηρήθηκε η ίδια αρίθμηση που συναντήσαμε σε δημοσιευμένες μελέτες. Λεπτομερής ανάλυση του φάσματος NMR παρατίθεται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Συγκριτικά φάσματα  $^1\text{H}$  NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR βάσει πειραματικών δεδομένων και δεδομένων από την βιβλιογραφία.

$^{13}\text{C}$ NMR	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	C 11	C 12	C 13	C 14	C 15
M. Blanc, et al. 2005 <sup>75</sup>	36.79	23.41	40.99		49.81	29.93	<b>41.78</b>	27.26	<b>39.31</b>				124.32	16.36	105.47
Y. Watanabe, et al 2005 <sup>76</sup>	<b>41.8</b>	23.4	<b>36.8</b>	150.6	49.8	29.9	39.2	27.2	41.0	35.9	145.2	172.9	124.9	16.4	105.5
Costic acid που απομονώθηκε	36.96	23.58	41.97	150.73	50.00	30.12	<b>39.48</b>	27.44	<b>41.19</b>	36.04	145.44	172.83	124.94	16.51	105.63

$^1\text{H}$ NMR	CH <sub>2</sub> H-1	CH <sub>2</sub> H-2	CH <sub>2</sub> H-3	CH H-5	CH <sub>2</sub> H-6	CH H-7	CH <sub>2</sub> H-8	CH <sub>2</sub> H-9	CH <sub>2</sub> H-13	CH <sub>3</sub> H-14	CH <sub>2</sub> H-15
Y. Watanabe, et al. 2005 <sup>75</sup>	1.43 1.42	1.62 1.60	2.31 2.01	1.90	1.66 1.30	2.54	1.65 1.46	1.50 1.35	6.33 5.70	0.75	4.42 4.72
Costic acid που απομονώθηκε	2.28 2.01	1.58 1.52	1.59 1.32	1.90	1.65 1.22	2.51	1.68 1.41	1.59 1.28	6.31 5.68	0.75	4.39 4.71

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις διαμορφώθηκε ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 5) όπου φαίνεται ο μερικός χαρακτηρισμός των ανθράκων της ένωσης:

**Πίνακας 5.** Χαρακτηρισμός ατόμων άνθρακα του costic acid.

Carbon	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ
C-1	36.96	δευτεροταγής	$\text{sp}^3$
C-2	23.58	δευτεροταγής	$\text{sp}^3$
C-3	41.97	δευτεροταγής	$\text{sp}^3$
C-4	150.73	τεταρτοταγής	$\text{sp}^2$
C-5	50.00	τριτοταγής	$\text{sp}^3$
C-6	30.12	δευτεροταγής	$\text{sp}^3$
C-7	39.48	τριτοταγής	$\text{sp}^3$
C-8	27.44	δευτεροταγής	$\text{sp}^3$
C-9	41.19	δευτεροταγής	$\text{sp}^3$
C-10	36.04	τεταρτοταγής	$\text{sp}^3$
C-11	145.44	τεταρτοταγής	$\text{sp}^2$
C-12	172.83	τεταρτοταγής	$\text{sp}^2$
C-13	124.94	δευτεροταγής	$\text{sp}^2$
C-14	16.51	πρωτοταγής	$\text{sp}^3$
C-15	105.63	δευτεροταγής	$\text{sp}^2$

Ασυμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα παρατηρήθηκε στον χαρακτηρισμό των ανθράκων C-7 και C-9 (39.48 ppm και 41.19 ppm, αντίστοιχα), οι οποίοι αναφέρονταν ως δευτεροταγής και τριτοταγής αντίστοιχα, ενώ στα πειράματα  $^{13}\text{C}$ -DEPT είναι εμφανές ότι ισχύει το αντίστροφο.

Επίσης για λόγους σύγκρισης, μετρήθηκε η οπτική στροφή  $[\alpha]_{\text{D}}$  της ένωσης που μελετήθηκε. Στη βιβλιογραφία,<sup>77</sup> η τιμή της οπτικής της στροφής της ένωσης αυτής είναι  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 23.42^\circ$  (*c*, 1.3, MeOH). Η μέτρηση της οπτικής στροφής της ένωσης μας έδωσε την τιμή  $[\alpha]_{\text{D}} + 24.03^\circ$  (*c*, 1.3 MeOH), τιμή που είναι παρόμοια με αυτήν της βιβλιογραφίας.



### 4.3 Ανάλυση Δισδιάστατων Φασμάτων NMR

Για τα δισδιάστατα φάσματα πρωτονίου, χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος FT-NMR AMX500 (500 MHz) της εταιρίας Bruker, ενώ το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR λήφθηκε σε φασματογράφο FT-NMR MSL300 300 MHz) της εταιρίας Bruker. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $\text{CDCl}_3$ . Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων αναγράφονται σε ppm σε σχέση με την μετατόπιση του τετραμεθυλσιλανίου (TMS).

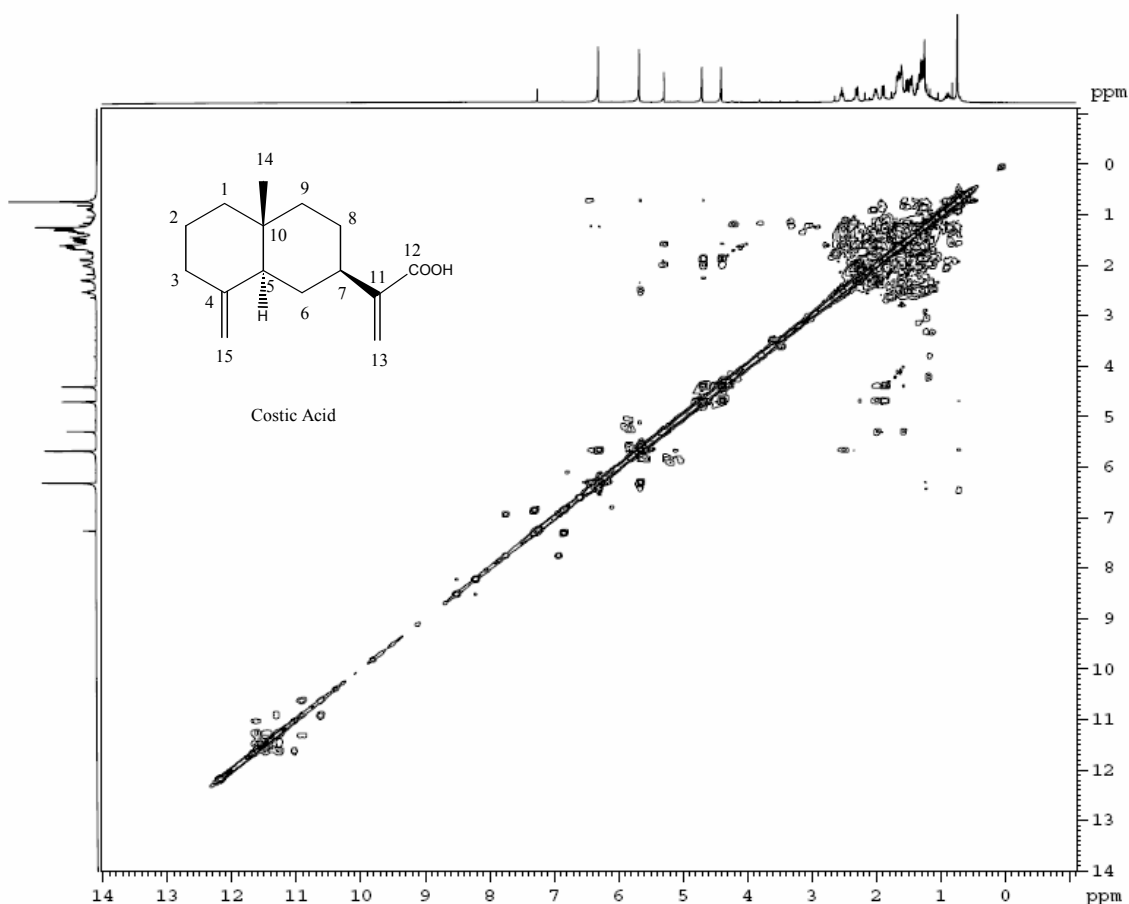
#### 4.3.1 Ανάλυση Φάσματος $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ gCOSY.

Σε ένα φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  gCOSY εμφανίζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων που βρίσκονται στο ίδιο άτομο άνθρακα αλλά και αυτών που βρίσκονται σε γειτονικά άτομα άνθρακα πάντα σε σχέση με την σύνδεσή τους μέσω δεσμών. Στον Πίνακα 6, παρουσιάζονται συνοπτικά οι συσχετίσεις των πρωτονίων του μορίου μας ενώ στο Σχήμα 12, παρουσιάζεται το αντίστοιχο φάσμα.

**Πίνακας 6.**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  gCOSY συσχετίσεις των πρωτονίων του costic acid.

position	Proton*	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	COSY
1	H-1 H-1'	2.30 (m, 6.0, 1.0, 1.0) 2.01 (q, 9.0, 6.0)	H-1', H-2 H-1, H-3
2	H-2 H-2'	1.58 (m) 1.52 (m, 8.0, 2.0, 2.0)	H-2' H-3', H-2
3	H-3 H-3'	1.59 (m) 1.34 (m, 10.0, 2.5, 2.5)	H-1' H-2'
4	-	-	-
5	H-5'	1.89 (dd, 7.0, 0.3)	H-6'
6	H-6 H-6'	1.66 (m, 7.2, 1.5, 1.5) 1.22 (m)	H-6' H-6, H-7', H-5'
7	H-7'	2.53 (m, 7.2, 7.2, 3.0, 3.0)	H-6', H-8'
8	H-8 H-8'	1.61 (m) 1.46 (m, 7.5, 7.5, 2.0, 2.0)	H-9', H-8' H-8, H-9'
9	H-9 H-9'	1.59 (m) 1.28 (m)	H-9' H-8', H-9
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	H-13 $_{\alpha}$ H-13 $_{\beta}$	6.31 (s) 5.68 (s)	H-13 $_{\beta}$ H-7', H-13 $_{\alpha}$
14	H-14 H-14 H-14	0.75(s)	H-13 $_{\alpha}$ , H-13 $_{\beta}$
15	H-15 $_{\alpha}$ H-15 $_{\beta}$	4.41 (d, 3.0) 4.71 (d, 3.0)	H-5' H-5'

\*Τα πρωτόνια σε αξονική θέση σημειώνονται με (')



Σχήμα 12. Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  gCOSY του costic acid.

#### 4.3.2 Ανάλυση Φάσματος C-H gHMQC.

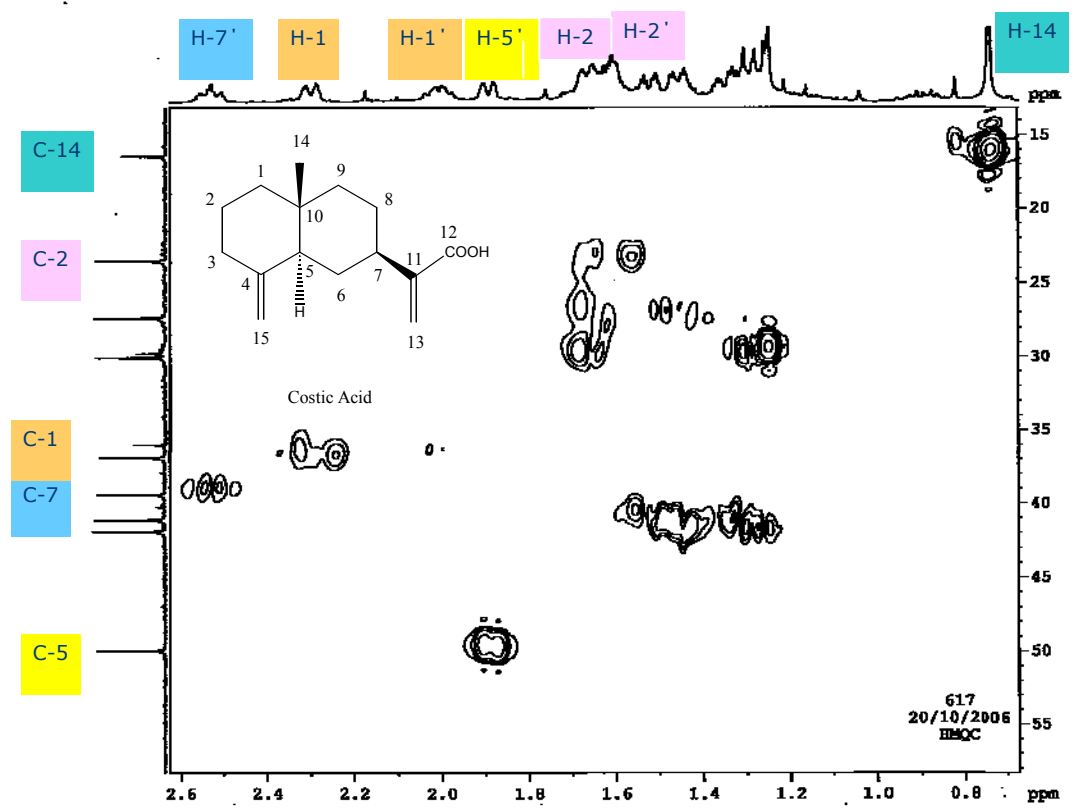
Σε ένα φάσμα C-H gHMQC παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των ατόμων άνθρακα και των πρωτονίων τους ( $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ ). Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται το πρωτόνιο που είναι συζευγμένο με τον αντίστοιχο C, ενώ εντοπίζονται και αυτά τα πρωτόνια που βρίσκονται στο ίδιο άτομο άνθρακα αλλά λόγω της ασυμμετρίας του μορίου έχουν διαφορετικό χημικό περιβάλλον και διαχωρίζονται μεταξύ τους δίνοντας σήματα σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Για παράδειγμα, τα πρωτόνια του C-8, δίνουν μια διπλή της διπλής κορυφή στα 1,11 ppm (H-8') και μια πολλαπλή σχάση στα 1,90 ppm (H-8). Ίδια φασματοσκοπική συμπεριφορά έχουν όλα τα πρωτόνια των δευτεροταγών ομάδων άνθρακα του μορίου που μελετάται. Στον Πίνακα 7, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις C-H gHMQC και στο Σχήμα 13, το αντίστοιχο φάσμα.

*Πίνακας 7. C-H gHMQC συσχετίσεις του costic acid.*

<b>Carbon</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math> (ppm)</b>	<b>proton*</b>	<b><math>\delta^1\text{H}</math> (ppm)</b>
C-1	36.96	H-1 H-1'	2.30 (m) 2.01 (q)
C-2	23.58	H-2 H-2'	1.58 (m) 1.52 (m)
C-3	41.97	H-3 H-3'	1.59 (m) 1.34 (m)
C-4	150.73	-	-
C-5	50.00	H-5'	1.89 (dd)
C-6	30.12	H-6 H-6'	1.66 (m) 1.22 (m)
C-7	39.48	H-7'	2.53 (m)
C-8	27.44	H-8 H-8'	1.61 (m) 1.46 (m)
C-9	41.19	H-9 H-9'	1.59 (m) 1.28 (m)
C-10	36.04	-	-
C-11	145.44	-	-
C-12	172.83	-	-
C-13	124.94	H-13 <sub><math>\alpha</math></sub> H-13 <sub><math>\beta</math></sub>	6.31 (s) 5.68 (s)
C-14	16.51	H-14	0.75 (s)
C-15	105.63	H-15 <sub><math>\alpha</math></sub> H-15 <sub><math>\beta</math></sub>	4.39 (d) 4.71 (d)

*\*Τα πρωτόνια σε αξονική θέση σημειώνονται με (')*

Με το φάσμα αυτό, επιβεβαιώνονται τα συμπεράσματα των φασμάτων DEPT σχετικά με την υποκατάσταση των ατόμων άνθρακα του costic acid.



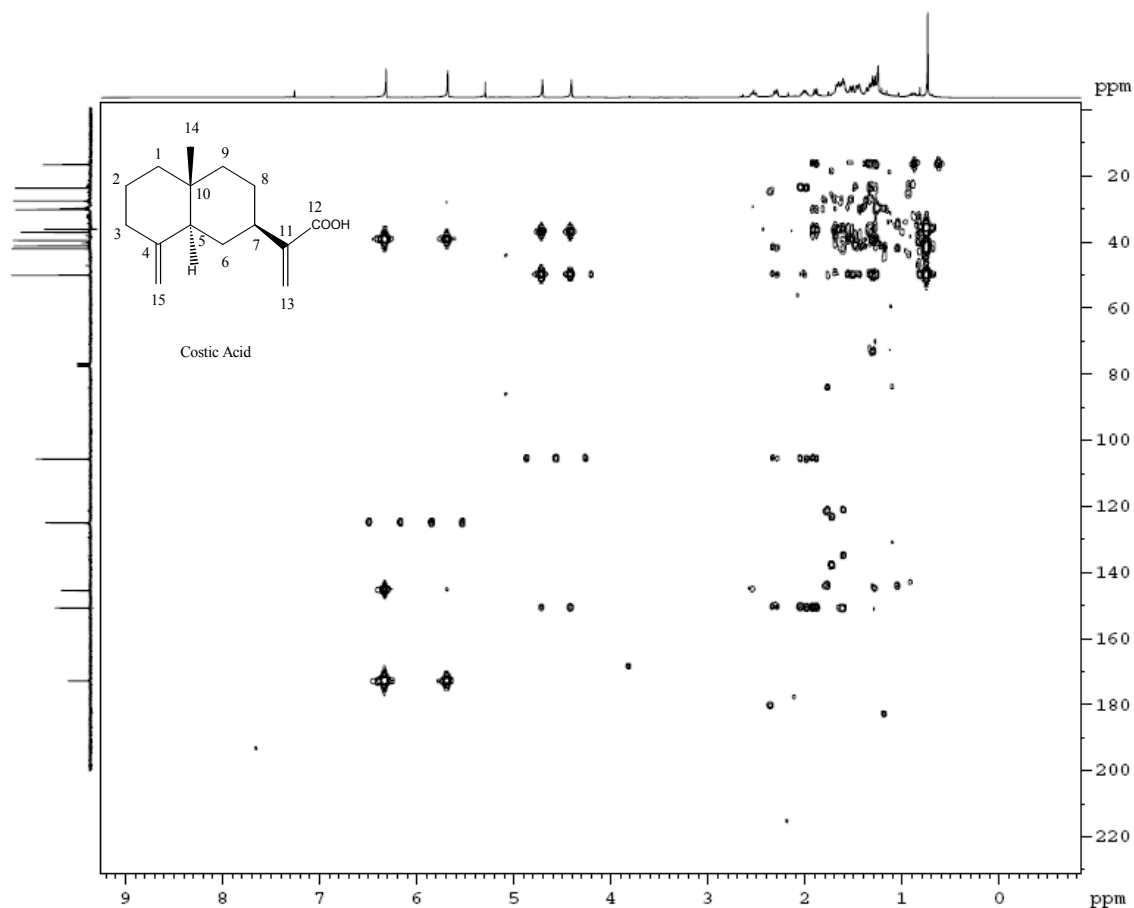
Σχήμα 13. Φάσμα C-H gHMBC του costic acid.

#### 4.3.3 Ανάλυση Φάσματος C-H gHMBC.

Στα φάσματα C-H gHMBC συσχετίζονται τα άτομα άνθρακα του μορίου με τα πρωτόνια που συνδέονται μέσω σειράς δεσμών, αλλά όχι στο ίδιο άτομο άνθρακα. Ουσιαστικά, εμφανίζονται συζεύξεις μεταξύ πυρήνων που βρίσκονται σε απόσταση δύο ή ακόμα και τριών ή τεσσάρων ατόμων ( ${}^3J_{C-H}$  ή  ${}^4J_{C-H}$ ). Αποκρυπτογραφώντας ένα τέτοιο φάσμα και σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που παίρνουμε από τα πειράματα NMR που προαναφέρθηκαν, μπορούμε να προσδιορίσουμε τα τεταρτοταγή άτομα C και να περιγράψουμε με ακρίβεια τη δομή αυτού του μορίου. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) παρουσιάζονται οι C-H gHMBC συσχετίσεις και στο Σχήμα 14, το αντίστοιχο φάσμα του μορίου που μελετάται.

*Πίνακας 8.* C-H gHMBC του costic acid.

<b>Carbon</b>	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	<b>C-H gHMBC</b>
C-1	36.96	H-5', H-9', H-3'
C-2	23.58	H-1', H-3'
C-3	41.97	H-1 , H-14 , H-2
C-4	150.73	H-1 , H-1', H-5', H-3 , H-6'
C-5	50.00	H-1', H-1 , H-2', H-9', H-14, H-6'
C-6	30.12	H-8', H-5', H-9'
C-7	39.48	H-6', H-8'
C-8	27.44	H-6', H-6
C-9	41.19	H-1', H-14
C-10	36.04	H-5', H-3 , H-8 , H-14
C-11	145.44	H-7', H-6 , H-6', H-8'
C-12	172.83	H-7'
C-13	124.94	H-7', H-6 , H-8
C-14	16.51	H-9 , H-9', H-1', H-1
C-15	105.63	H-5', H-1', H-1



Σχήμα 14. Φάσμα C-H gHMBC του costic acid.

#### 4.3.4 Ανάλυση Φάσματος NOESY.

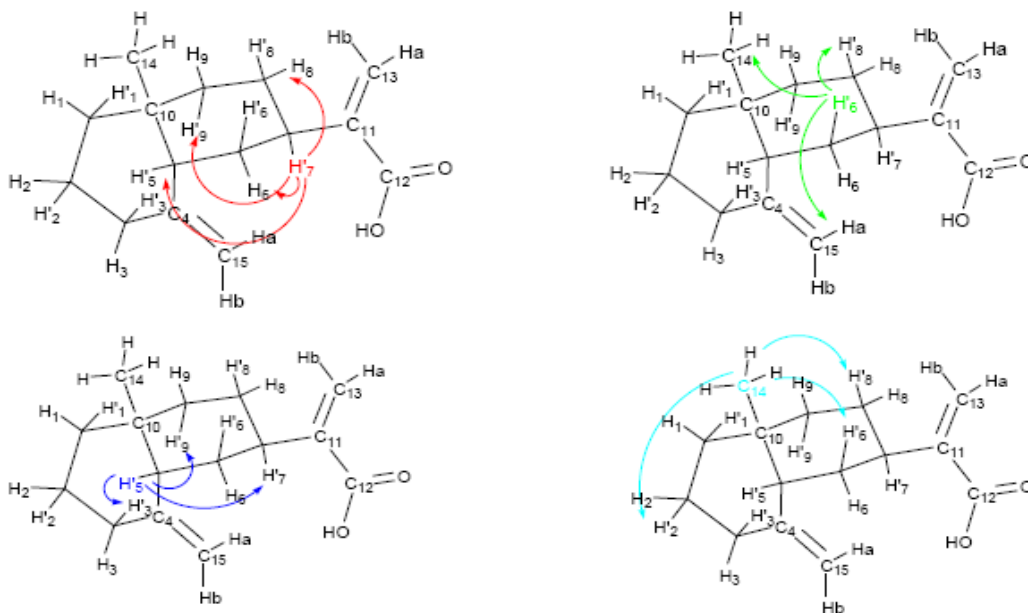
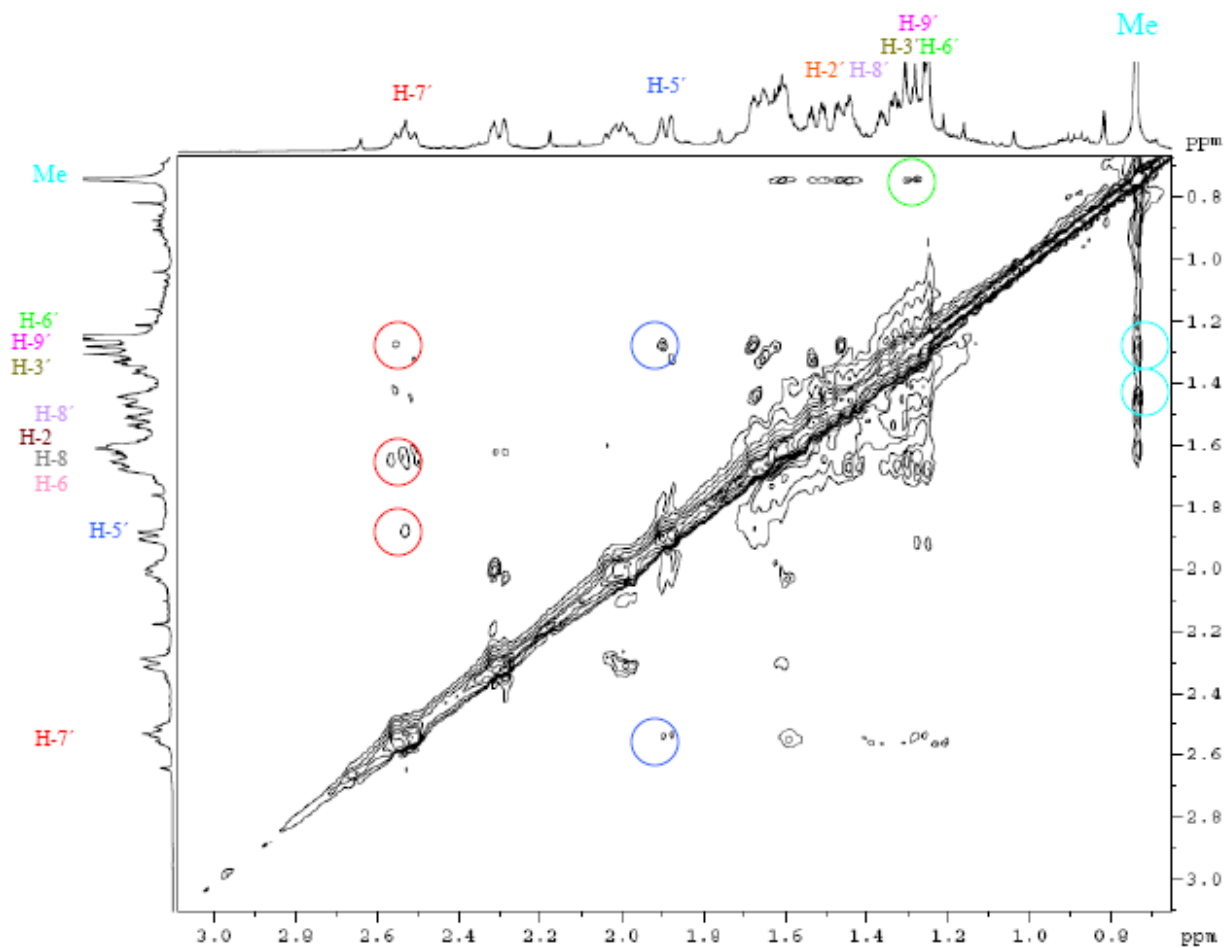
Τέλος, με το δισδιάστατο φάσμα NOE μπορούμε να προσεγγίσουμε την διαμόρφωση που έχει στο χώρο το μόριο του costic acid που απομονώσαμε από το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού *D. viscosa*. Συγκεκριμένα γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός της σχετικής στερεοχημείας των τριών χειρόμορφων κέντρων του μορίου, C-5, C-7 και C-10. Αναλυτικότερα, τα πρωτόνια H-5', H-3', H-7' και H-9' παρουσιάζουν ισχυρό NOE φαινόμενο μεταξύ τους, γεγονός που δηλώνει ότι βρίσκονται πολύ κοντά στον χώρο και για να συμβαίνει αυτό πρέπει να είναι και τα δύο από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Ισχυρό NOE παρουσιάζουν και τα πρωτόνια του μεθυλίου H-14 με τα πρωτόνια H-2', H-6' και H-8'. Πολύ κοντά στο χώρο βρίσκονται και τα αξονικά πρωτόνια H-2' και H-6' με τα βινυλικά πρωτόνια H-15<sub>a</sub> και H-15<sub>b</sub>. Ακόμη αξίζει να αναφερθεί ότι ισχυρό NOE φαινόμενο παρουσιάζει και το

πρωτόνιο H-13<sub>b</sub> με τα πρωτόνια H-7' και H-6' (τα οποία βρίσκονται σε *trans* διαμόρφωση), λόγω της ελεύθερης περιστροφής γύρω από το δεσμό C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>.

**Πίνακας 9.** NOESY του costic acid.

position	Proton*	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	NOESY
1	H-1 H-1'	2.30 (m, 6.0, 1.0, 1.0) 2.01 (q, 9.0, 6.0)	H-9 H-9', H-3'
2	H-2 H-2'	1.58 (m) 1.52 (m, 8.0, 2.0, 2.0)	H-14
3	H-3 H-3'	1.59 (m) 1.34 (m, 10.0, 2.5, 2.5)	H-5', H-7'
4	-	-	-
5	H-5'	1.89 (dd, 7.0, 0.3)	H-7', H-3', H-9'
6	H-6 H-6'	1.66 (m, 7.2, 1.5, 1.5) 1.22 (m)	H-7', H-5' H-8', H-14, H-9, H-15 <sub>a</sub>
7	H-7'	2.53 (m, 7.2, 7.2, 3.0, 3.0)	H-6, H-8, H-5'
8	H-8 H-8'	1.61 (m) 1.46 (m, 7.5, 7.5, 2.0, 2.0)	H-9', H-7' H-9, H-6', H-14
9	H-9 H-9'	1.59 (m) 1.28 (m)	H-1 H-8, H-6, H-5', H-7'
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	H-13 <sub>a</sub> H-13 <sub>b</sub>	6.31 (s) 5.68 (s)	H-7', H-6', H-8', H-8
14	H-14 H-14 H-14	0.75(s)	H-2', H-8', H-6'
15	H-15 <sub>a</sub> H-15 <sub>b</sub>	4.41 (d, 3.0) 4.71 (d, 3.0)	H-2', H-6', H-15 <sub>b</sub> H-15 <sub>a</sub>

\*Τα πρωτόνια σε αξονική θέση σημειώνονται με (')



Σχήμα 15. Αλληλεπιδράσεις πρωτονίων του costic acid στο φάσμα NOESY.



#### 4.4 Ανάλυση του αιθέριου ελαίου της *Dittrichia viscosa* (L.)

Το αιθέριο έλαιο από τα φύλλα του φυτού *Dittrichia viscosa* (L.) απομονώθηκε με χρήση συσκευής Clevenger, με την διαδικασία που περιγράφεται ακολούθως:

Σε σφαιρική φιάλη των 2 L προστέθηκαν 800 mL αποσταγμένου νερού, πέτρες βρασμού και 50 g αποξηραμένων και κονιοποιημένων φύλλων του φυτού *Dittrichia viscosa*. Στο σύστημα εφαρμόστηκε συσκευή Clevenger και ακολούθησε ήπια θέρμανση μέχρι σημείο βρασμού. Η διαδικασία της απόσταξης διήρκεσε 4 ώρες. Το αιθέριο έλαιο συγκεντρώθηκε στην φυσαλίδα συλλογής της συσκευής Clevenger, συλλέχθηκε με πιπέτα και το υπόλοιπο αιθέριο έλαιο που είχε παραμείνει στα τοιχώματα της συσκευής απομακρύνθηκε με εκπλύσεις με MeOH. Στη συνέχεια ακολούθησε εκχύλιση του διαλύματος. Σε διαχωριστική χοάνη των 250 mL, τοποθετήθηκαν το προς εκχύλιση διάλυμα και 50 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Στην οργανική φάση προστέθηκε και το αρχικό αιθέριο έλαιο που είχε απομακρυνθεί με πιπέτα. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη και ξηράνθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ή άνυδρο MgSO<sub>4</sub>. Ακολούθησε διήθηση για την απομάκρυνση του ξηραντικού και τέλος απομάκρυνση του CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> με απόσταξη υπό κενό μέχρι όγκου 1 mL. Η απομάκρυνση του υπόλοιπου διαλύτη επιτεύχθηκε με ρεύμα N<sub>2</sub>. Το αιθέριο έλαιο που απομονώθηκε είχε βάρος 50 mg (απόδοση 0.1%) και φυλάχθηκε στους 4 °C μέχρι την ανάλυσή του.

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των συστατικών έγινε με ένα επιλεκτικό ανιχνευτή μάζας τύπου Shimadzu GCMS-QP 5050 συνδεδεμένο με σύστημα πληροφοριών. Ο αέριος χρωματογράφος (Shimadzu GC-17A), ήταν ενωμένος με μία τριχοειδή στήλη (στατική φάση 5% supelco, SBP-5, διαστάσεων 30m x 0,25 mm x 0,25 μm film thickness) και με την πηγή των ιόντων. Για την μεταφορά του δείγματος στην στήλη, χρησιμοποιήθηκε auto-injector τύπου Shimadzu AOC - 20i. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο (He), υπό πίεση 0,8 atm. Οι συνθήκες ιονισμού και περίθλασης των ηλεκτρονίων ήταν οι ακόλουθες: ενέργεια ιόντων 70 eV, θερμοκρασία πηγής ιόντων 195°C, εύρος μάζας 35 - 450 m/z, χρόνος σάρωσης 1,4 /decade, ηλεκτρονικός πολλαπλασιαστής τάσης 1680 mV.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της θερμοπρογραμματιζόμενης χρωματογραφίας. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το προγράμματα

ανάλυσης PHYTO.MET: Αρχικά η στήλη είχε θερμοκρασία 50 °C, και παρέμεινε σε αυτήν για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία αυξάνονταν με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 150 °C. Από τους 150 °C μέχρι τους 290 °C, ο ρυθμός αύξησης ελαττώθηκε σε 4 °C/ min. Τέλος, η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε στους 290 °C για 20 min. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 67 min. Οι συνθήκες του χρωματογράφου ήταν οι ακόλουθες: θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος (injector) 250 °C, θερμοκρασία ανίχνευσης 230 °C. Η ταχύτητα ροής της φέρουσας φάσης κατά τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες ανάλυσης, ήταν 0,9 mL/ min. Το σύστημα GC/MS είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή που περιέχει το κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα (CLASS 5000), με το οποίο προγραμματίζεται το όργανο και καταγράφονται τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα μάζας. Σε αυτό το πρόγραμμα υπάρχει και η βιβλιοθήκη πληροφοριών η οποία είναι χρήσιμη στην ταυτοποίηση των συστατικών (NIST 64 και NIST 120).

Για την παρασκευή του προς ανάλυση δείγματος, χρησιμοποιήθηκε 1 mg αιθέριου ελαίου διαλυμένο σε 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### *Αποτελέσματα της μελέτης της σύστασης του αιθέριου ελαίου*

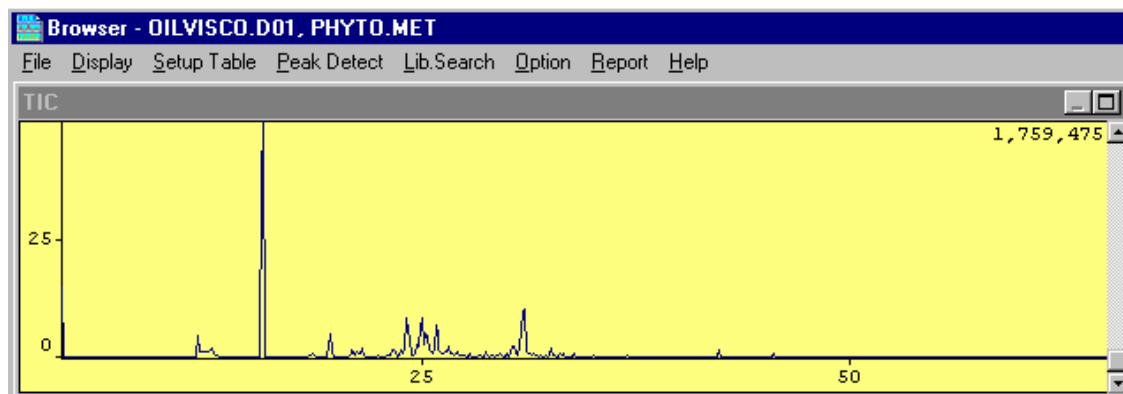
Ακολούθως παρατίθεται ο συνολικός πίνακας των συστατικών της ανάλυσης του αιθέριου ελαίου των φύλλων του φυτού *Dittrichia viscosa* (L.) σύμφωνα με τις αναλυτικές τεχνικές της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας, οι οποίες περιγράφηκαν παραπάνω (Πίνακας 10). Η ταυτοποίηση της δομής των συστατικών του δείγματος έγινε με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης (Rt) και των φασμάτων μάζας με τα αντίστοιχα πρότυπων δειγμάτων, με σύγκριση των τιμών από την βιβλιογραφία και με βάση την βιβλιοθήκη πληροφοριών του λογισμικού του οργάνου.

Πίνακας 10. Ανάλυση των συστατικών της *D. viscosa*.

Peak No	Compounds <sup>a</sup>	R.T.	HD (%)
1	Benzyl benzoate	6,51	TR
2	Terpinen-4-ol	9,71	TR
3	Linalool	11,39	1.72
4	$\alpha$ -Terpineol	12,76	0.81
5	Bornyl acetate	15,91	52.30
6	$\alpha$ -Cadinene	16,06	0.48
7	$\alpha$ -Amorphene	16,07	0.35
8	$\gamma$ -Cadinene	16,08	0.40
9	$\alpha$ -Copaene	16,09	0.25
10	$\alpha$ -Ylangene	16,11	TR
11	trans- $\beta$ -Guaiene	18,41	0.17
12	Aromadendrene	18,43	0.19
13	8-Cedren-13-ol	18,46	0.12
14	Tridecane	18,72	0.23
15	trans-Vetrocitral C	19,44	1.60
16	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	19,74	1.70
17	(E)-Nerolidol	21,02	0.46
18	p-Mentha-1(7),2-dien-8-ol	21,86	0.43
19	Globulol	22,06	0.74
20	Viridiflorene	22,07	0.11
21	$\gamma$ -Gurjunene	22,08	0.11
22	Geranial	22,21	TR
23	$\delta$ -Cadinene	22,46	TR
24	Viridiflorol	23,58	0.38
25	Caryophyllene oxide	24,09	3.28
26	Nerol	25,02	3.56
27	cis-Carveol	25,04	0.87
28	(Z,E)-Farnesyl acetate	25,05	0.80
29	$\alpha$ -Terpinyl acetate	25,07	3.56
30	Germacrene D (isomer)	25,51	2.36
31	Limonene	26,38	0.49
32	cis- $\beta$ -Guaiene	27,65	0.22
33	Neomenthol	28,66	0.28
34	Napthalenone	30.34	1.89
35	Eugenol methyl ether	31.04	8.25
36	$\alpha$ -Humulene	33,55	0.25
37	$\beta$ -Selinene	34,82	0.32
38	$\alpha$ -Selinene	34,93	0.32
39	$\alpha$ -Muurolene	35,16	0.25
40	Pentacosane	39,62	0.40
41	Tricosane	39,63	0.32
42	Tetracosane	39,64	0.38
43	Hexacosane	39,68	0.50
45	Heneicosane	42,73	0.48
44	Docosane	42,75	0.56
46	Geranyl acetone	44,71	0.25
	<b>Total identified (%)</b>		<b>92.13</b>

<sup>a</sup> Αναφέρονται με αυξανόμενο χρόνο κατακράτησης  
TR: Ίχνη (< 0.1 %)

Ακολούθως παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του αιθέριου ελαίου του φυτού *Dittrichia viscosa* :



Μεταξύ των 46 συστατικών που αναγνωρίστηκαν (αποτελούσαν το 92.13 % της συνολικής σύστασης του αιθέριου ελαίου), τα κυριότερα ήταν: bornyl acetate (52.30%) και eugenol methyl ether (8.25%).

Ανάλογες αναλύσεις του αιθέριου ελαίου των φύλλων του φυτού *Dittrichia viscosa* (*L.*) αναφέρθηκαν από τους B. Marongiu et al<sup>78</sup> και M.Blanc et al,<sup>79</sup> τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στους πίνακες 11 και 12.

Πίνακας 11.

Peak No	Compounds <sup>a</sup> <i>B. Marongiu et al. 2003</i> <sup>75</sup>	HD (%)
1	1,8-Dehydro-cineole	—
2	1,8-Cineole	—
3	$\gamma$ -Terpinene	TR
4	trans-Vetrocitral C	—
5	Octanol acetate	—
6	Cis-Carveol	—
7	Geranial	—
8	(E)-Caryophyllene	—
9	NI	—
10	Vestitenone	1.5
11	9-epi-(E)-Caryophyllene	2.3
12	NI	—
13	$\gamma$ -Gurjunene	2.2
14	$\gamma$ -Himachalene	1.3
15	trans- $\beta$ -Guaiene	1.3
16	(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	TR
17	Lavandulyl isovalerate	—
18	(E)-Nerolidol	2.9
19	Longipinanol	1.5
20	Caryophyllene oxide	6.2
21	Globulol	2.2
22	Viridiflorol	5.8
23	1,10-di-epi-Cubenol	10.3
24	(E)-Sesquilavandulol	2.3
25	Cedr-8(15)-en-9- $\alpha$ -ol	10.3
26	Himachalol	2.4
27	NI	—
28	$\alpha$ -Eudesmol	TR
29	Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	14.1
30	(Z)-Nerolidol acetate	5.9
31	NI	0.7
32	Juniper camphor	5.8
33	Oplopanone	—
34	Guaiol acetate	1.9
35	8- $\alpha$ -11-Elemodiol	1.0
36	$\beta$ -Bisabolenal	3.4
37	NI	TR
38	Crypto-acorone	5.1
39	Cyclopentadecanolide	1.9
40	NI	2.0
41	Laurenene	4.1
42	NI	—
43	8-Isobutyryloxy isobornyl isobutyrate	—
44	NI	0.9
45	NI	0.7

<sup>a</sup> Αναφέρονται με αυξανόμενο χρόνο κατακράτησης  
 TR: Ίχνη (< 0.1 %)

**Πίνακας 12.**

<b>Peak No</b>	<b>Compounds<sup>a</sup> <i>M. Blanc et al. 2006</i><sup>76</sup></b>	<b>Percentage (%)</b>
1	p-Cymene	0.5
2	Cineole	1.7
3	Limonene	0.4
4	p-Cymenene	0.2
5	Linalool	1.0
6	p-Cymen-8-ol	0.6
7	Terpinen-4-ol	} 1.0
8	Neomenthol	
9	p-Mentha-1(7),2-dien-8-ol	0.9
10	$\alpha$ -Terpineol	0.8
11	Nerol	0.1
12	Tridecane	TR
13	$\alpha$ -Terpinyl acetate	0.3
14	Eugenol methyl	0.4
15	$\alpha$ -Ylangene	0.4
16	$\alpha$ -Copaene	0.2
17	Sativene	0.1
18	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	0.7
19	Geranyl acetone	0.1
20	3,6;6,9-Bisepoxyfarnesa-1,7(14),10-triene	1.7
21	9-epi-3,6;6,9-Bisepoxyfarnesa-1,7(14),10-triene	0.9
22	3-epi-3,6;6,9-Bisepoxyfarnesa-1,7(14),10-triene	1.4
23	3,9-diepi-3,6;6,9-Bisepoxyfarnesa-1,7(14),10-triene	0.3
24	$\gamma$ -Muurolene	0.2
25	$\alpha$ -Amorphene	1.1
26	$\beta$ -Selinene	0.2
27	$\alpha$ -Muurolene	0.6
28	$\alpha$ -Selinene	0.1
29	$\gamma$ -Cadinene	0.2
30	trans-Calamenene	} 0.2
31	cis-Calamenene	
32	$\delta$ -Cadinene	0.2
33	7,10-Epoxyfarnesa-1,5,11-trien-3-ol	0.1
34	(E)-Nerolidol	8.6
35	trans-Bejarol	0.6
36	cis-Bejarol	0.4
37	Caryophyllene oxide	2.5
38	Fokienol	21.1
39	3-epi-6,9-Epoxyfarnesa-1,7(14),10-trien-3-ol	1.9
40	6,9-Epoxyfarnesa-1,7(14),10-trien-3-ol	1.8
41	Humulene oxide II	0.3
42	Eudesm-6-en-4 $\alpha$ -ol	6.2
43	6-epi-6,9-Epoxyfarnesa-1,7(14),10-trien-3-ol	1.3
44	3,6-diepi-6,9-Epoxyfarnesa-1,7(14),10-trien-3-ol	0.9
45	$\gamma$ -Eudesmol	0.1
46	Alismol	0.3
47	Caryophylla-4(14),8(15)-dien-5 $\alpha$ -ol	1.9
48	$\tau$ -Muurolol	0.1

49	$\tau$ -Cadinol	0.1
50	1-epi-Cubenol	0.1
51	$\beta$ -Eudesmol	} 1.0
52	$\alpha$ -Cadinol	
53	Selin-11-en-4 $\alpha$ -ol	1.6
54	$\alpha$ -Eudesmol	2.2
55	Porosadien-7-one	1.5
56	Benzyl benzoate	0.4
57	$\beta$ -Cyperone	0.2
58	3-Hydroxy-3,7,11-trimethyldodeca-1,6(E),10-trien-9-yl propanoate	0.3
59	3-Hydroxy-3,7,11-trimethyldodeca-1,6(E),10-trien-9-yl isobutyrate	0.6
60	Cadalene	0.2
61	Heneicosane	0.4
62	Docosane	0.1
63	Tricosane	0.5
64	Tetracosane	0.4
65	Pentacosane	0.3
66	Hexacosane	0.1
67	3,7,11-Trimethyldodeca-1,6(E),9-trien-3,11-diol (Triendiol)	—
68	Monoterpene hydrocarbons	1.1
69	Oxygenated monoterpenes	6.5
70	Sesquiterpene hydrocarbons	4.4
71	Oxygenated sesquiterpenes	60.0
72	Others	2.7
	<b>Acidic part</b>	
73	Eudesma-3,11(13)-dien-12-oic acid	43.7
74	Eudesma-4,11(13)-dien-12-oic acid	10.9
75	Costic acid	4.8
76	Eudesma-2,4(15),11(13)-trien-12-oic acid	1.9

<sup>a</sup> Αναφέρονται με αυξανόμενο χρόνο κατακράτησης  
TR: Ίχνη (< 0.1 %)

Ανάμεσα στα συστατικά του αιθερίου ελαίου που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και τα συστατικά που αναφέρουν οι δύο συγγραφείς υπάρχουν αρκετές διαφορές, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό τόπο καλλιέργειας του φυτού, στην διαφορετική χρονική στιγμή κοπής και ξήρανσής του, καθώς και στη χρήση διαφορετικών οργάνων ανάλυσης. Παρ' όλα αυτά τα κοινά συστατικά που αναφέρθηκαν και στις τρεις μελέτες, είναι τα ακόλουθα (Πίνακας 13):

Πίνακας 13.

	<i>M. Blanc et al.</i> 2006 <sup>76</sup>	<i>B. Marongiu et al.</i> 2003 <sup>75</sup>	<i>K. Sofou et al</i> 2007
<b>Compounds<sup>a</sup></b>	<b>Percentage (%)</b>	<b>Percentage (%)</b>	<b>Percentage (%)</b>
Terpinen-4-ol	1.0	0.3	TR
α-Ylangene	0.4	TR	TR
(E)-β -Caryophyllene	0.7	1.9	1.70
α-Selinene	0.1	0.6	0.32
γ -Cadinene	0.2	1.4	0.40
δ -Cadinene	0.2	3.9	TR
(E)-Nerolidol	8.6	1.9	0.46
Caryophyllene oxide	2.5	8.0	3.28
Benzyl benzoate	0.4	0.6	TR

<sup>a</sup> Αναφέρονται με αυξανόμενο χρόνο κατακράτησης  
TR: Ίχνη (< 0.1 %)



## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η απομόνωση και ταυτοποίηση του costic acid ως συστατικού των εκχυλισμάτων του φυτού *Dittrichia viscosa* πραγματοποιήθηκε με σκοπό την χρήση του στην καταπολέμηση της βαρρόωσης, μιας σοβαρής ασθένειας των μελισσών, που οφείλεται στο εκτοπαράσιτο *Varroa destructor*.

Η φασματοσκοπική μελέτη του μορίου αποκάλυψε ότι υπάρχουν σφάλματα στα δεδομένα φασματοσκοπίας  $^{13}\text{C}$  NMR που αφορούν στον χαρακτηρισμό της ένωσης αυτής και αναφέρονται σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες.

Η δραστηριότητα του costic acid κατά του παρασίτου αποδείχθηκε μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του ολικού αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *D. viscosa*. Η μεγαλύτερη διαφορά επίδρασης εμφανίζεται στις 8 ώρες. Η βέλτιστη δόση διαλύματος costic acid φάνηκε να είναι αυτή των 60 μl ανά φιαλίδιο, με απόδοση 48% στις 8 ώρες, σε σύγκριση με αυτή του εκχυλίσματος η οποία είναι 4%.

Σημαντικό στοιχείο της έρευνάς μας ήταν η παρατήρηση ότι το costic acid καθώς και το ολικό εκχύλισμά του φυτού *D. viscosa*, δεν έχουν καμία τοξικότητα ή παράπλευρη επιμόλυνση τόσο στις μέλισσες όσο και στο μέλι, γεγονός το οποίο θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου ότι το φυτό αυτό αποτελεί πηγή τροφής των μελισσών.

Στο παρελθόν έγιναν πολλές προσπάθειες για την καταπολέμηση της βαρρόα, χρησιμοποιώντας για παράδειγμα σκευάσματα με οξαλικό οξύ. Οι προσπάθειες αυτές δεν απέβησαν αποτελεσματικές εξαιτίας του γεγονότος ότι ανιχνεύονταν υπολείμματα του οξέος στο μέλι.

**Μελλοντικός στόχος** εκμετάλλευσης των προαναφερθέντων ιδιοτήτων του costic acid είναι η βιομηχανική παρασκευή ενός οικολογικού, ασφαλούς, οικονομικού και εύκολου στη χρήση για τους μελισσοκόμους προϊόντος, με σκοπό την καταπολέμηση της βαρρόωσης, μίας από τις σοβαρότερες ασθένειες των μελισσών.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- <sup>1</sup> Otis, G. W. *A Review of the Diversity of Species Within Apis*. In: *Diversity in the Genus Apis* by D.R **1991**.
- <sup>2</sup> Tingek, S.; Koeniger, N.; Koeniger, G. *Senckenbergiana Bio* **1996**, 76, 115-119.
- <sup>3</sup> Ruttner, F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Springer – Verlag, Berlin **1988**.
- <sup>4</sup> Ruttner, F. *Naturgeschichte der Honigbienen* Ehrenwirth Verlag, München, Germany. **1992**.
- <sup>5</sup> Sheppard, W. S.; Arias, M. C.; Greech, A. Meixner, M. D. *Apidologie* **1997**, 28, 287-293.
- <sup>6</sup> Sheppard, W. S.; Meixner, M. D. *Apidologie* **2003**, 34, 367-375.
- <sup>7</sup> Ruttner, F.; Tassencourt, L.; Louveaux, J. *Apidologie* **1978**, 9, 363-381.
- <sup>8</sup> Ifantidis, M. D. *XXVIIth Congress International Apicultural, Athens, Greece* **1979**, 271-277.
- <sup>9</sup> Badino, G.; Celebrano, G.; Manino A.; Ifantidis, M. D. *Apidologie* **1988**, 19, 377-386.
- <sup>10</sup> Bouga M.; Harizanis, P.; Kiliyas, G.; Alahiotis S. *Apidologie* **2005**, 36, 344-353.
- <sup>11</sup> Τσίπη, Μ. *Οι μοριακοί και μορφομετρικοί δείκτες στη διαπίστωση υβριδικών πληθυσμών μελισσών στην Ελλάδα*. Μεταπτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών **2004**.
- <sup>12</sup> Μπουγά, Μ. *Μελέτη της γενετικής δομής πληθυσμών της μέλισσας *Apis mellifera**. Διδακτορική διατριβή. Εργαστήριο Γενετικής, Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κνυτάρου & Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών **2002**.
- <sup>13</sup> Πορίχη, Α. Ε. *Συγκριτική Μελέτη της Γενετικής Δομής Πληθυσμών Μελισσών Ηπειρωτικής και Νησιωτικής Ελλάδας: Μοριακή και Μορφομετρική Προσέγγιση*. Μεταπτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών **2002**.
- <sup>14</sup> Τσίπη, Μ. *Μορφομετρικά χαρακτηριστικά της μέλισσας της Πελοποννήσου*. Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών **2002**.

- <sup>15</sup> Γκαραγκάνη, Π. *Μορφομετρικά χαρακτηριστικά της μακεδονικής μέλισσας *Apis mellifera macedonica**. Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών **2001**.
- <sup>16</sup> Σούλα, Ο. *Μορφομετρικά χαρακτηριστικά της κρητικής μέλισσας *Apis mellifera adami**. Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών **2001**.
- <sup>17</sup> Hatjina, F.; Haristos, L.; Bouga, M. *Geometric morphometrics analysis of honey bee populations from Greek mainland, Ionian islands and Crete island. Poster in Proceedings of the First European Conference of Apidology, 19-23 September, Udine, 2004, 44.*
- <sup>18</sup> Hatjina, F.; Baylac, M.; Haristos, L.; Garnery, L.; Arnold, G.; Tselios, D. *VIIIth European Congress of Entomology, Thessaloniki, Greece 2002.*
- <sup>19</sup> Wallner, K.; Fries, I. *Pesticide Outlook*, 80-84, **2003**.
- <sup>20</sup> Chandler, D.; Sunderland, K. D.; Ball, B. V.; Davidson, G. *Biocontrol Science and Technology* **2001**, 11, 429-448.
- <sup>21</sup> Ball, B. V. *International Bee Research Association*. Cardiv, UK **1993**, 9-16.
- <sup>22</sup> Ball, B. V. *Pests & Diseases* **1994**, 569-576.
- <sup>23</sup> Ball, B. V. *International Bee Research Association*, Cardiv, UK, **1994**, 5-11.
- <sup>24</sup> Martin, S. J. *International Bee Research Association*, Cardiv, UK, **1997**, 3-10.
- <sup>25</sup> Bowen-Walker, P. L.; Martin, S. J.; Gunn, A. *Journal of Invertebrate Pathology* **1999**, 73, 101-106.
- <sup>26</sup> Rosenkranz, W. *Apidologie* **1992**, 23, 4, 379.
- <sup>27</sup> Rickli, M.; Imdorf A.; Kilchenmann V. *Apidologie* **1991**, 22, 417.
- <sup>28</sup> Bakandritsos, N.; Papanastasiou, J.; Rinioti E. *3<sup>rd</sup> Hellenic Scientific Conference In Apiculture- Sericulture, Thessaloniki, Greece 2007.*
- <sup>29</sup> Nanetti, A.; Büchler, R.; Charriere, J-D.; Fries, I.; Helland, S.; Imdorf, A.; Korpela, S.; Kristiansen, P. *Apiacta* **2003**, 38, 81-87.
- <sup>30</sup> Rademacher, E.; Harz, M. *Apidologie* **2006**, 37, 98-120.
- <sup>31</sup> Stavrianakou, S.; Liakopoulos, G.; Karabourniotis, G. *Environmental and Experimental Botany* **2006**, 56, 293-300.
- <sup>32</sup> Καββάδας Δ. Σ. *Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν*. Εκδοτικός οίκος Γ. Π. Ξένου, Αθήνα, **1956**, Τόμος Δ.

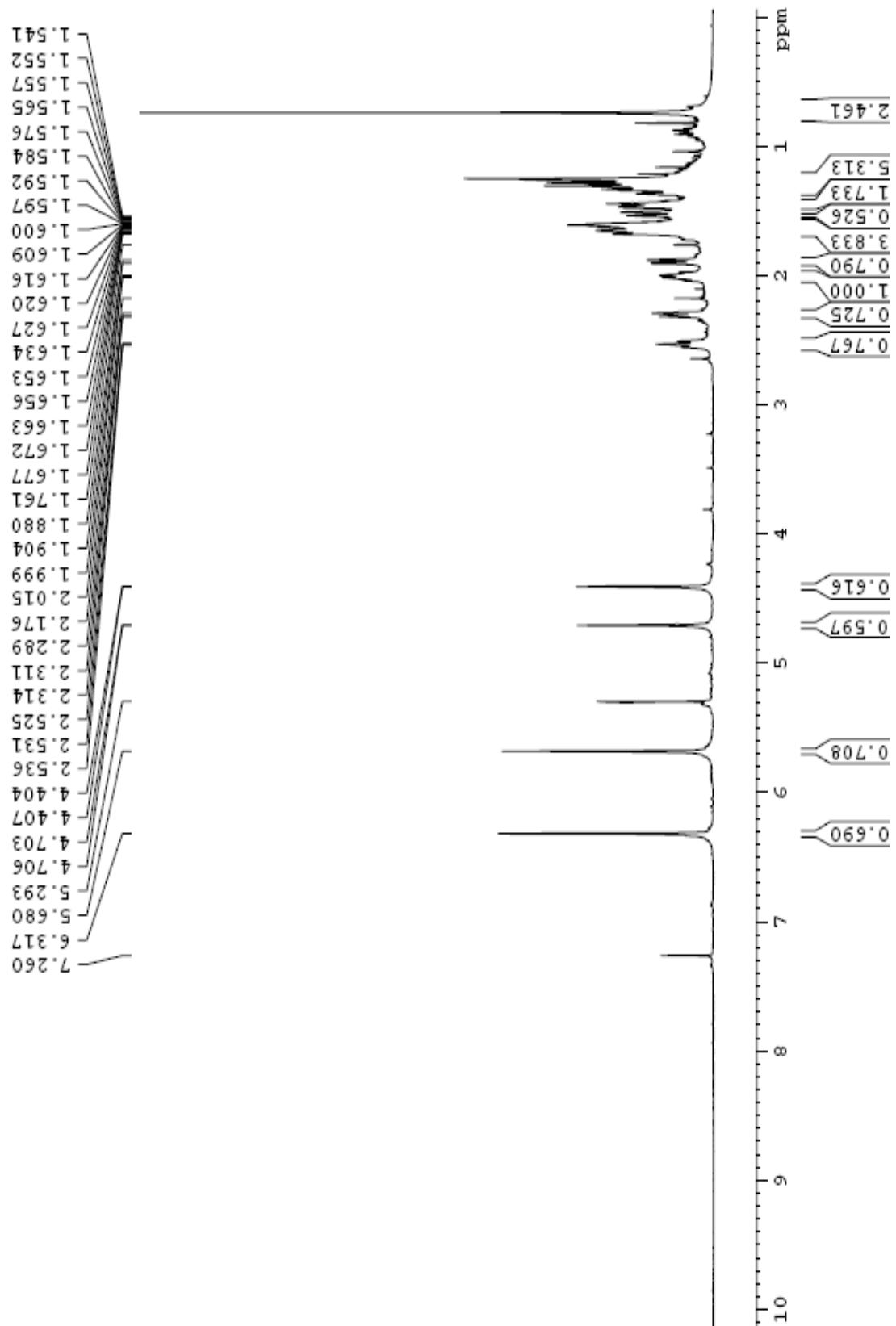
- <sup>33</sup> Σταυριανάκου, Σ. Β. Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών στα φύλλα του φυτού *Dittrichia viscosa*. Μεταπτυχιακή Εργασία. Εργαστήριο φυσιολογίας και μορφολογίας φυτών. Τμήμα γεωπονικής βιοτεχνολογίας Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών **2000**.
- <sup>34</sup> Χατζήνα, Φ.; Γούναρη, Σ.; Θρασυβούλου, Α.; Καλαπανίδα, Μ.; Τσέλιος, Δ. *Τα μελιτογόνα έντομα της πέυκης*. Πρακτικά του 1<sup>ου</sup> Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας - Σηροτροφίας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 29 Νοεμβρίου - 1 Δεκεμβρίου **2002**.
- <sup>35</sup> Ceccherelli, P.; Curini, M.; Marcotullio, M. C.; Menghini, A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2987-2989.
- <sup>36</sup> Wollenweber, E.; Mayer, K.; Roitman, J. N. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2445-2446.
- <sup>37</sup> Werker, E.; Hallahan D. L.; Gray J. C. *Advances in Botanical Research* **2000**, *31*, 1-36.
- <sup>38</sup> Werker E.; Fahn A. *Botanical Gazette* **1981**, *142*, 461-476.
- <sup>39</sup> Stephanou, M.; Manetas, Y. *Journal of Experimental Botany* **1997**, *48*, 1977-1985.
- <sup>40</sup> Stephanou, M.; Manetas, Y. *Australian Journal of Plant Physiology* **1995**, *22*, 755-759.
- <sup>41</sup> Bohlmann, F.; Gupta, K. R. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1443-1445.
- <sup>42</sup> Maoz, M.; Kashman, Y.; Neeman, I. *Planta Medica* **1999**, *65*, 281-282.
- <sup>43</sup> Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Gören, N. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1223-1224.
- <sup>44</sup> Ceccherelli, P.; Curini, M.; Marcotullio, M. C. *Journal of Natural Products* **1988**, *51*, 1006-1009.
- <sup>45</sup> Sanz, J. F.; Ferrando, C.; Marco, J. A. *Phytochemistry* **1991**, *33*, 3653-3655.
- <sup>46</sup> Abu Zarga, M. H.; Hamed, E. M.; Sabri, S. S.; Voelter, W.; Zeller, K-P. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 798-800.
- <sup>47</sup> Grande, M.; Torres, P.; Piera, F.; Bellido, S. I. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1826-1828.
- <sup>48</sup> Chiappini, I.; Fardella, G.; Menghini, A.; Rossi, C. *Planta Medica* **1982**, *44*, 159-161.
- <sup>49</sup> Grande, M.; Piera, F.; Guenca, A.; Torres, P.; Bellido, I. S. *Planta Medica* **1985**, *51*, 414- 419.
- <sup>50</sup> Wollenweber, E.; Mayer, K.; Roitman, J. N. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2445-2446.
- <sup>51</sup> Bohlmann, F.; Czerson, H.; Schöneweid, S. *Chemische Berichte* **1977**, *110*, 1330-1334.

- <sup>52</sup> Sanz, J. F.; Ferrando, C.; Marco, J. A. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3653-3655.
- <sup>53</sup> Rustaiyan, A.; Jakupovic, J.; Chau-Thi, T. V.; Bohlmann, F.; Sadjadi, A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2603-2606.
- <sup>54</sup> Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Gören, N. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1223-1224.
- <sup>55</sup> Ceccherelli, P.; Curini, M.; Marcotullio, M. C.; Menghini, A. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2987-2989.
- <sup>56</sup> Öksüz, S.; Topcu, G. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 195-197.
- <sup>57</sup> Fardella, G. *Fitoterapia* **1979**, *50*, 3-4.
- <sup>58</sup> Al-Khalil, S.; Al-Eisawi, D.; Fisher, N. A. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1992**, *6*, 307-309.
- <sup>59</sup> Kumari, G. N.; Rao, L. J. M.; Rao, N. S. P. *Proceedings of Indian Academy of Sciences* **1986**, *97*, 171.
- <sup>60</sup> Jakupovic, J.; Schuster, A.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Lander, N. S. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3181-3185.
- <sup>61</sup> Σταυριανάκου Σ.; Καπαξίδη, Ε.; Λιάκουρα, Β.; Μάρκογλου, Α.; Παπαδούλης, Γ.; Καραμπουρνιώτης, Γ. *Dittrichia viscosa: Η τέχνη της αλληλοπάθειας. Πόστερ στο 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 24-27 Μαΐου, Χίος, **2001**.
- <sup>62</sup> Καραγεώργου Π.; Λεβίζου Ε.; Ψαράς Γ.; Μανέτας Ι. *Αλληλοπαθητικές επιδράσεις του επεφουμενιδικού υδατοδιαλυτού εκπλύματος της dittrichia viscosa σε άγρια γειτονικά της φυτά και πιθανοί μηχανισμοί δράσης. Πόστερ στο 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 24-27 Μαΐου, Χίος, **2001**.
- <sup>63</sup> Χατζηιωάννου Θ. Π.; Κουμπάρης Μ. Α.; *Ενόργανη Ανάλυση*, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, **1997**.
- <sup>64</sup> Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, **2002**.
- <sup>65</sup> Van der Dool, H.; Kratz, P. D. *Journal of Chromatography*, **1963**, *11*, 463-471.
- <sup>66</sup> Mc Murry, J. *Οργανική Χημεία, Τόμος I*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο, **1998**.
- <sup>67</sup> Sanders, J. K. M.; Hunter, B. K. *Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists*, 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford University Press, New York, **1994**.
- <sup>68</sup> Gunter, H. *NMR Spectroscopy. Basic principles, concepts and applications in chemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed., Wiley Interscience, New York, **1996**.

- <sup>69</sup> Martin, G. E.; Zektzer, A. S. *Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity*, VCH Publishers, New York, **1988**.
- <sup>70</sup> Harris, R. K. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Physicochemical View*, Longman Scientific & Technical, Essex, UK, **1994**.
- <sup>71</sup> Lewis, W. J.; Sheehan, W.; Tumlinson, J. H. Pest Management in the Subtropics: Biological Control—A Florida Perspective In *Unraveling the story of how parasitoids find their hosts*; Ed.: Rosen, D.; Bennett, F. D.; Capinera, F. L., Intercept Press, Andover, Hamshire **1994**, 671–680.
- <sup>72</sup> Derome, A. E. In *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Oxford **1987**.
- <sup>73</sup> Delgado-Castro, R. A. M. T.; Cardona, W.; Weiss-López, B. E. *Current Organic Chemistry* **2001**, 2, 253-263.
- <sup>74</sup> Ardeshir, A.; Rahim, E.; Gholamhosein, T. *Experimental and Applied Acarology* **2002**, 27, 319–327.
- <sup>75</sup> Blanc, M. C.; Bradesi, P.; Casanova, J. *Phytochemical Analysis* **2005**, 16, 150–154.
- <sup>76</sup> Watanabe, Y.; Mihara, R.; Mitsunaga, T.; Yoshimura, T. *Journal of Wood Science* **2005**, 51, 514–519
- <sup>77</sup> Bawdekar, A. S.; Kelkar, G. R. *Tetrahedron* **1965**, 21, 1521-1528.
- <sup>78</sup> Marongiu, B.; Piras, A.; Pani, F.; Porcedda, S.; Ballero, M. *Flavour and Fragrances Journal* **2003**, 18, 505–509.
- <sup>79</sup> Blanc, M. C.; Bradesi, P.; Gonçalves, M. J.; Salgueiro, L.; Casanova, L. *Flavour and Fragrances Journal* **2006**, 21, 324–332.

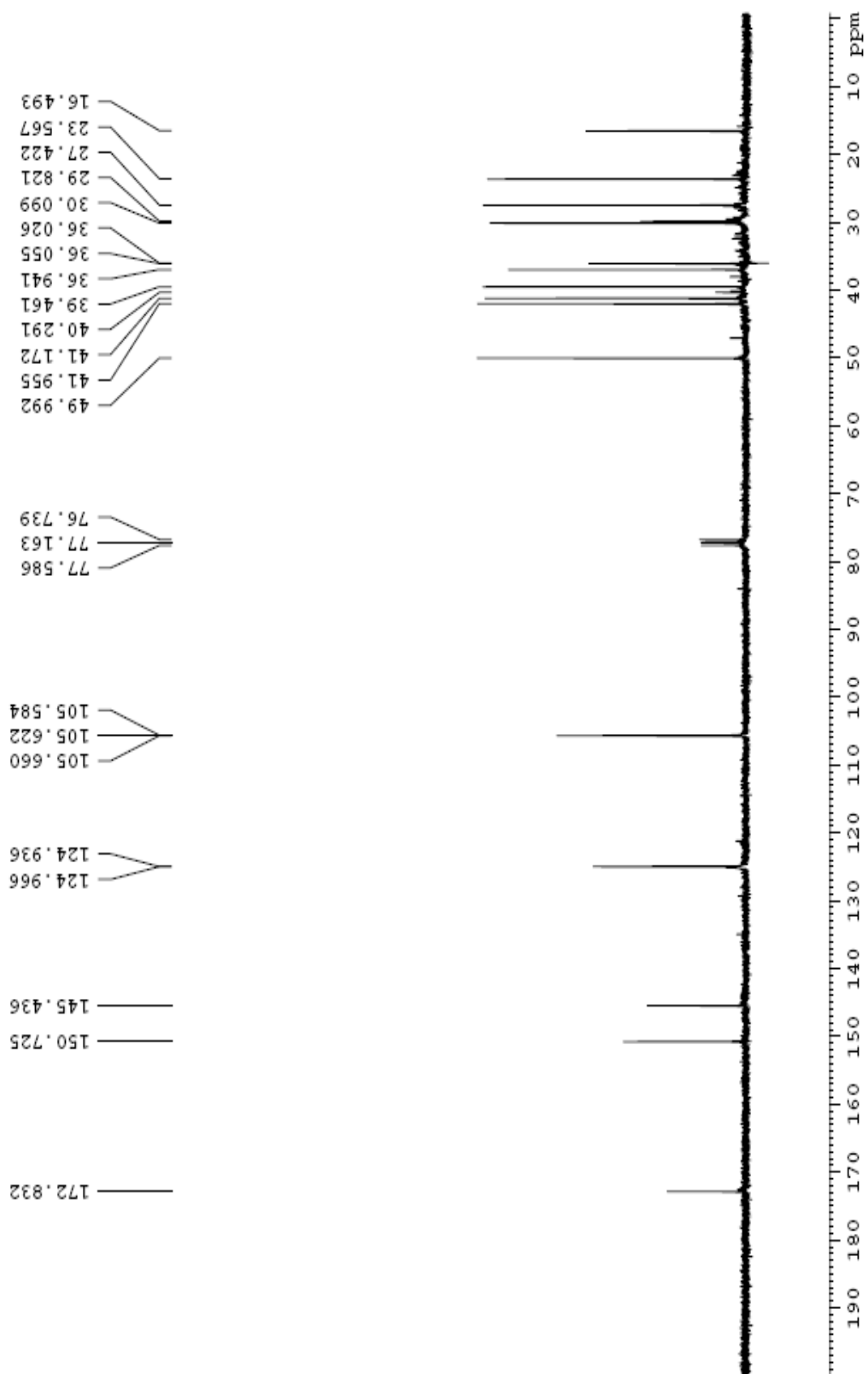
# **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ**

Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του costic acid.

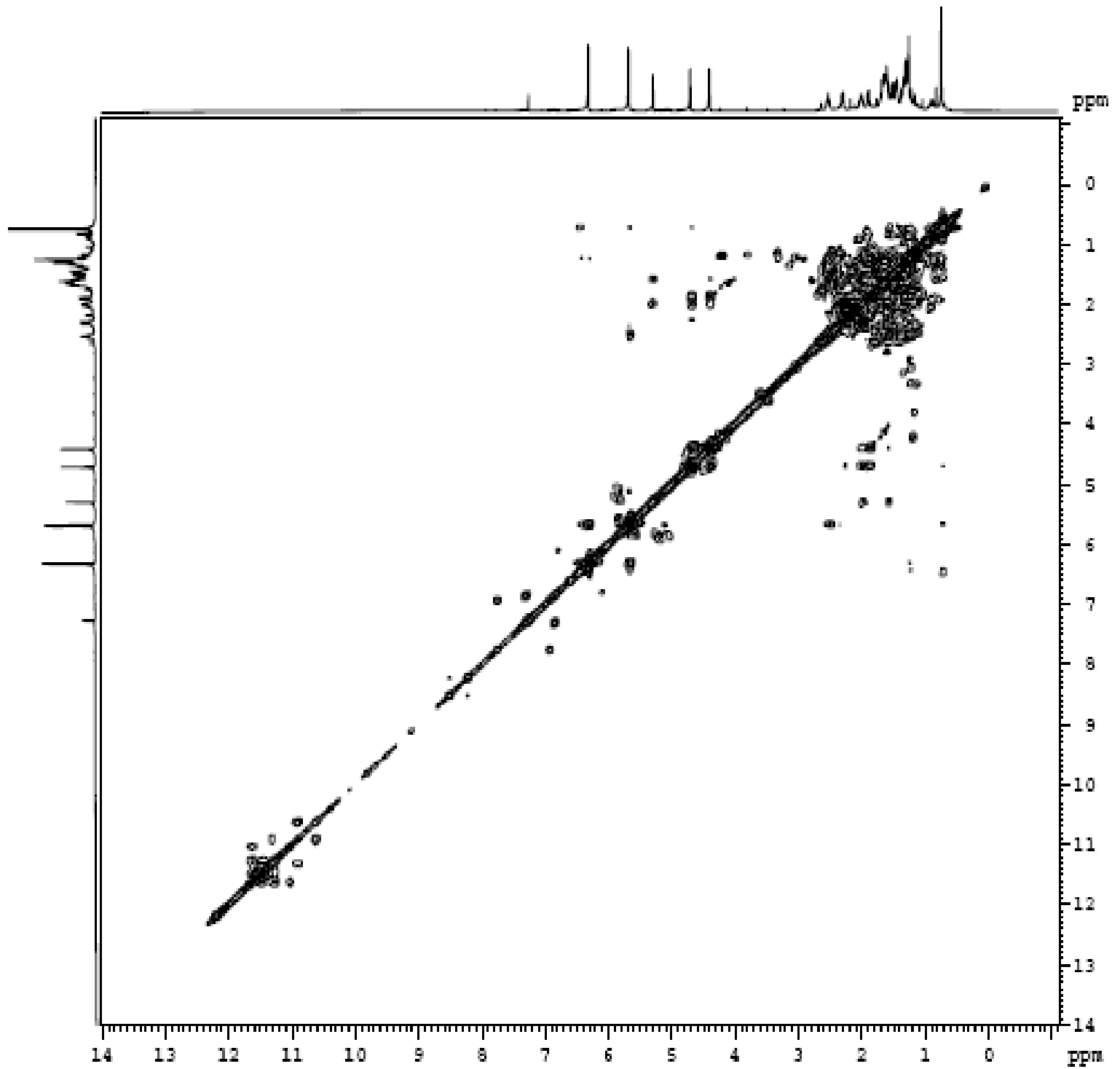




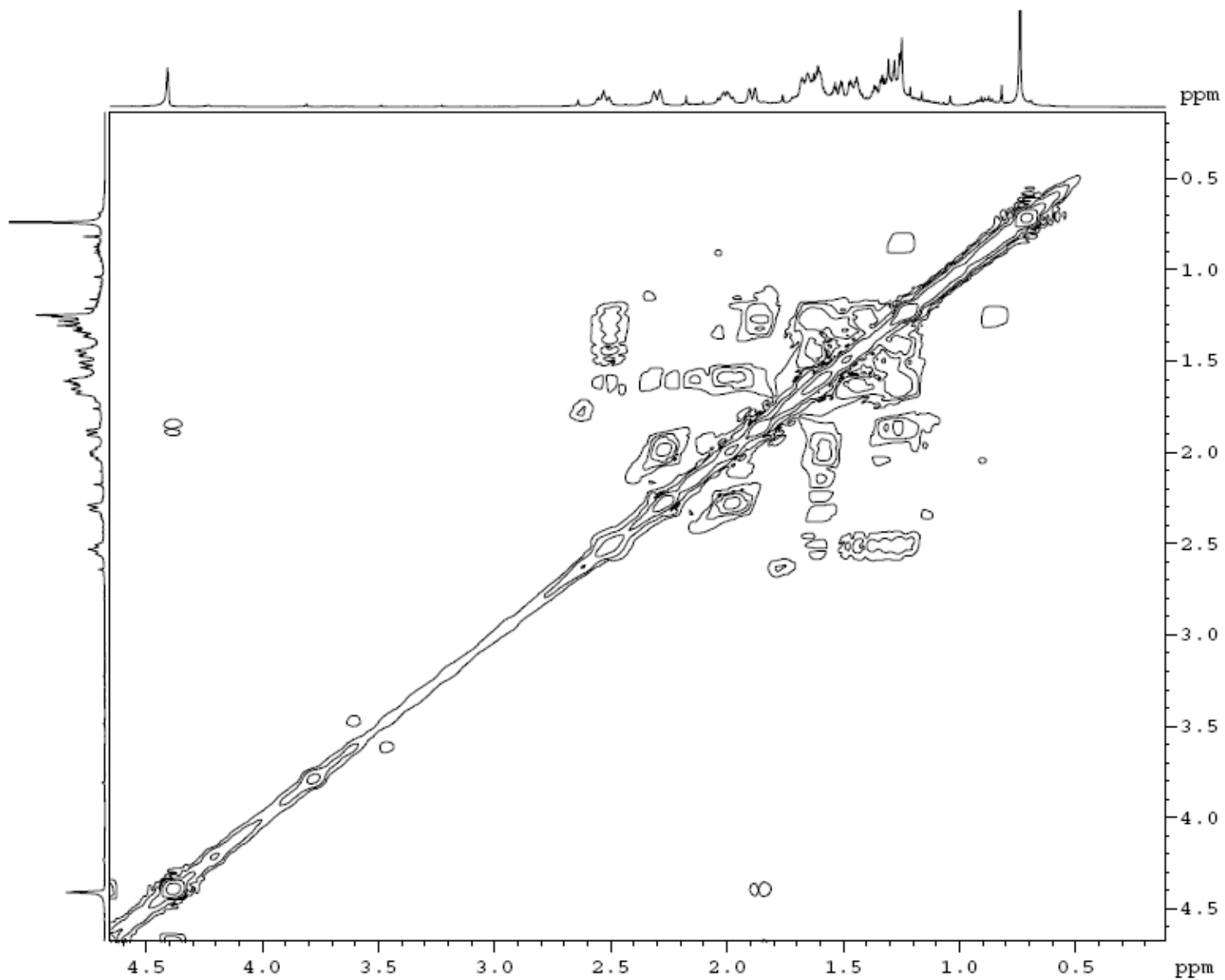
Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR του costic acid.



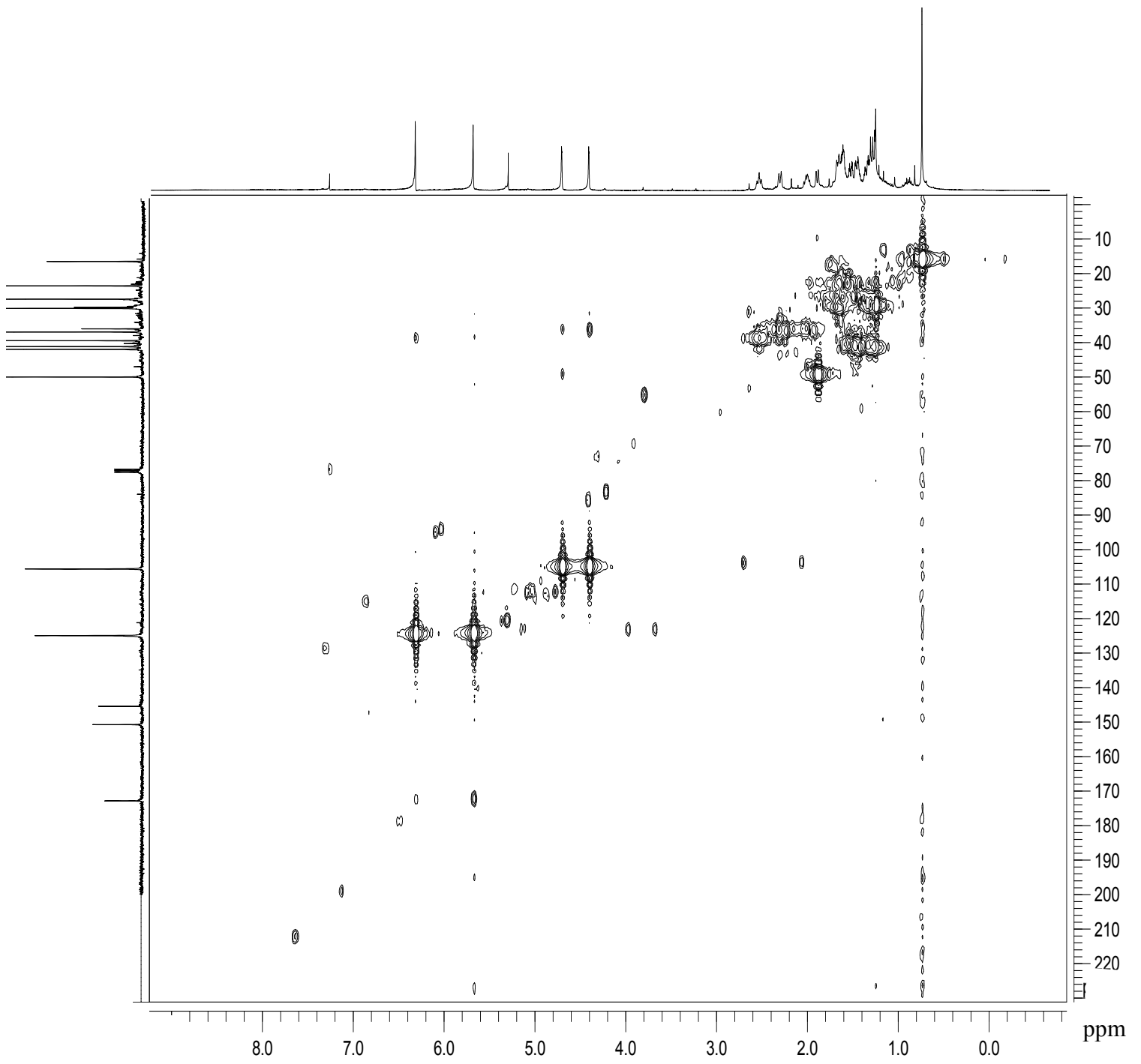
Φάσμα COSY του costic acid.



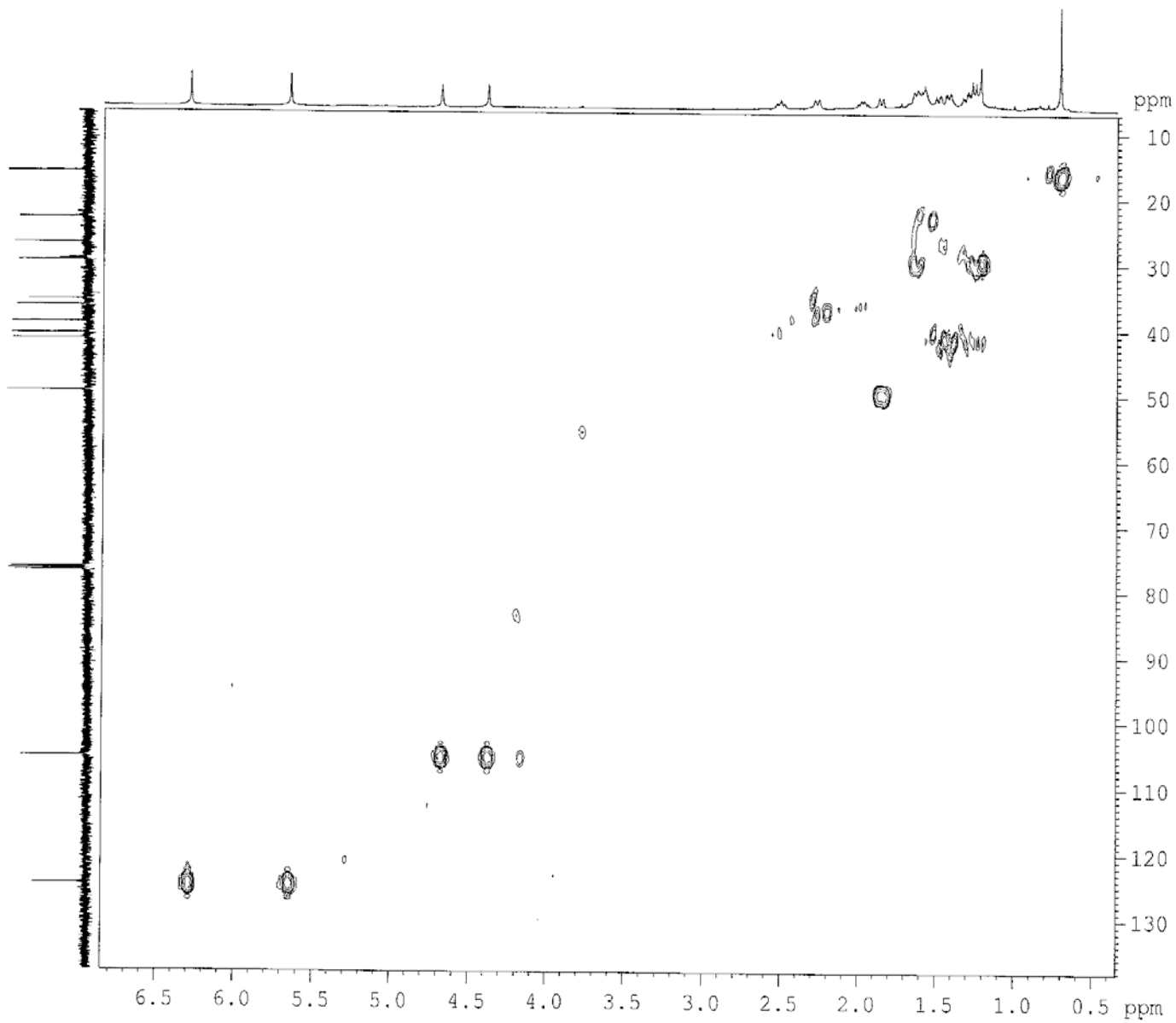
Φάσμα COSY του costic acid (περιοχή 0 - 4.5 ppm).



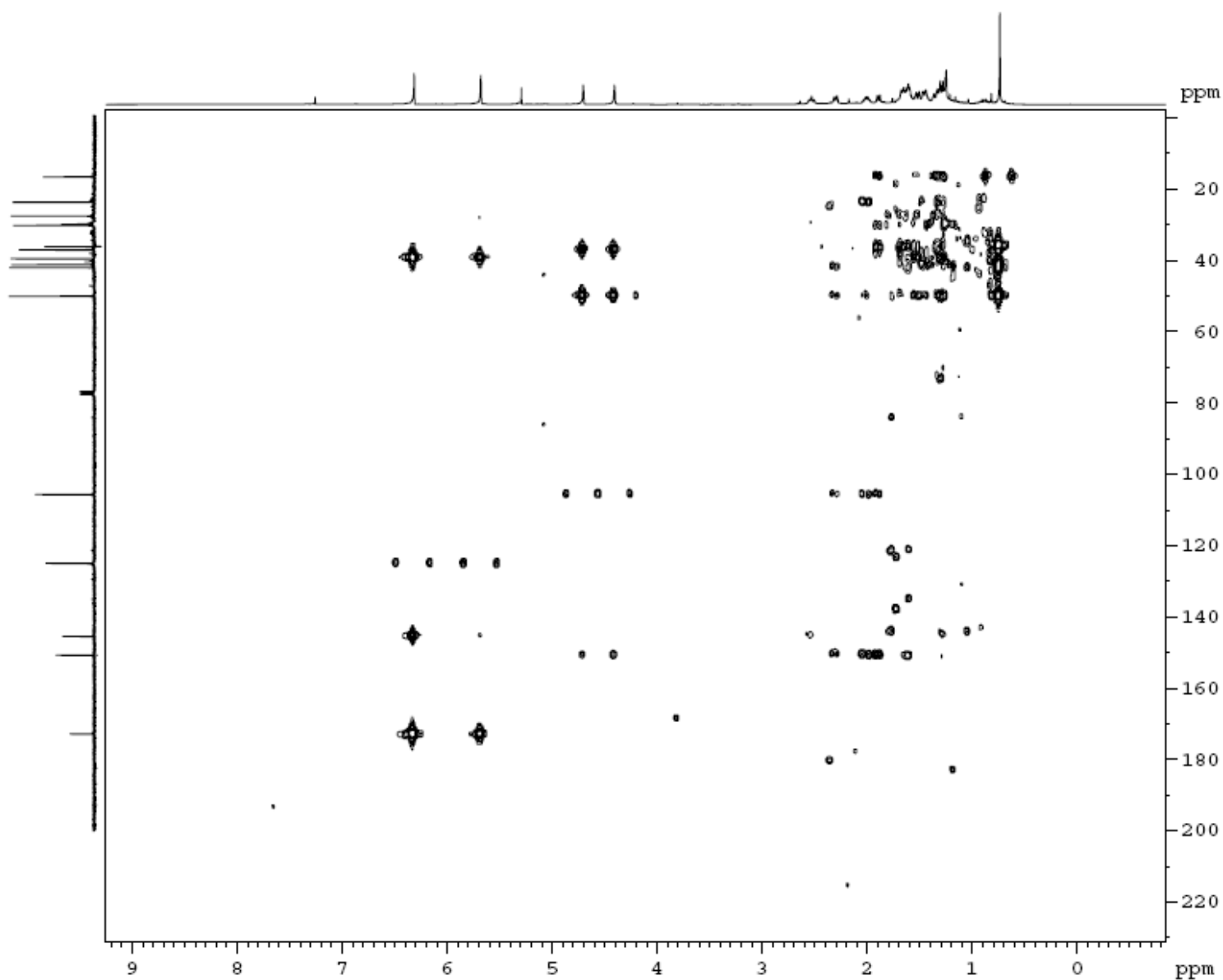
Φάσμα ΗΜQC του costic acid.



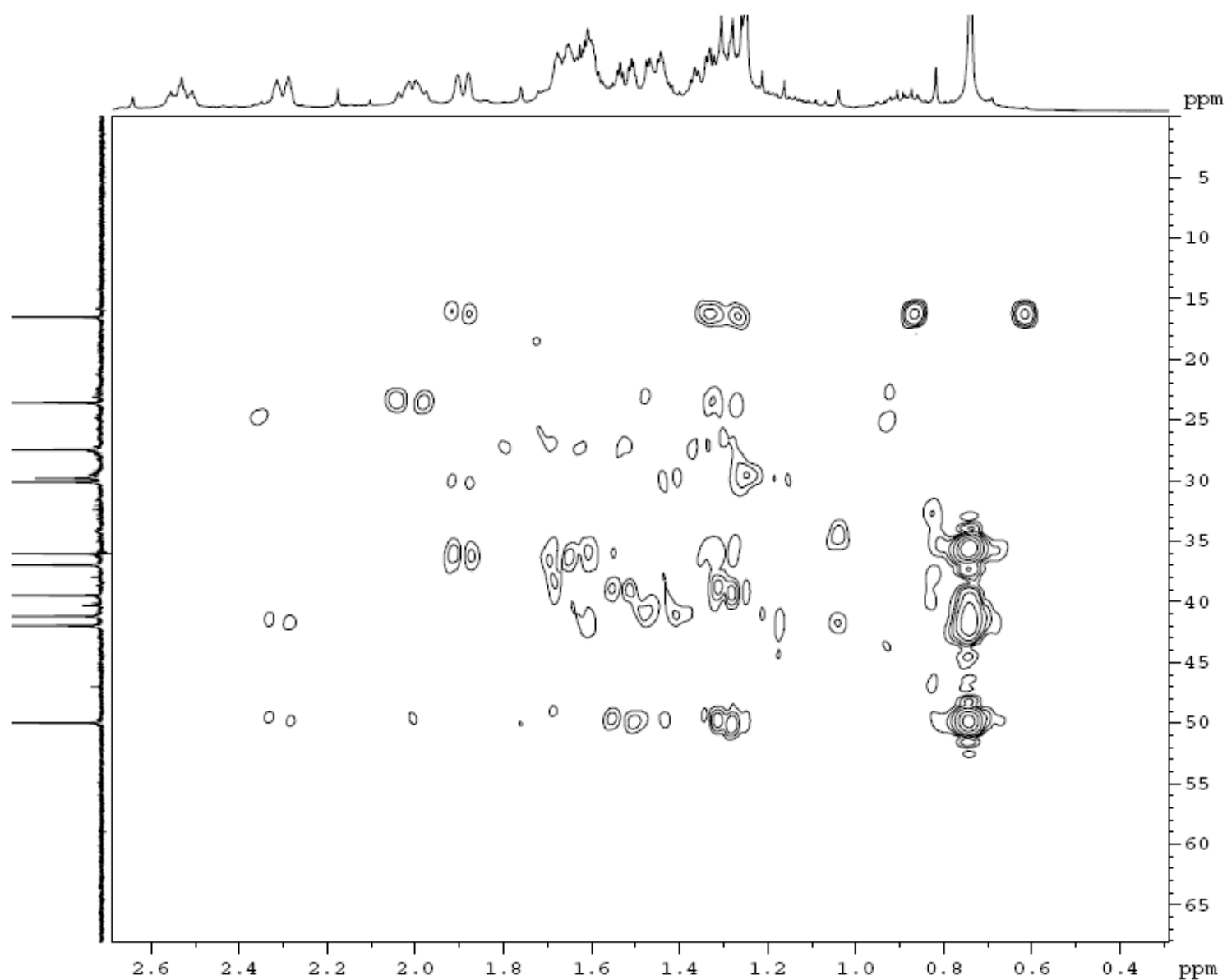
Φάσμα ΗΜQC του costic acid(περιοχή  $^{13}\text{C}$  : 0 - 130 ppm,  $^1\text{H}$  : 0 – 6.5 ppm).



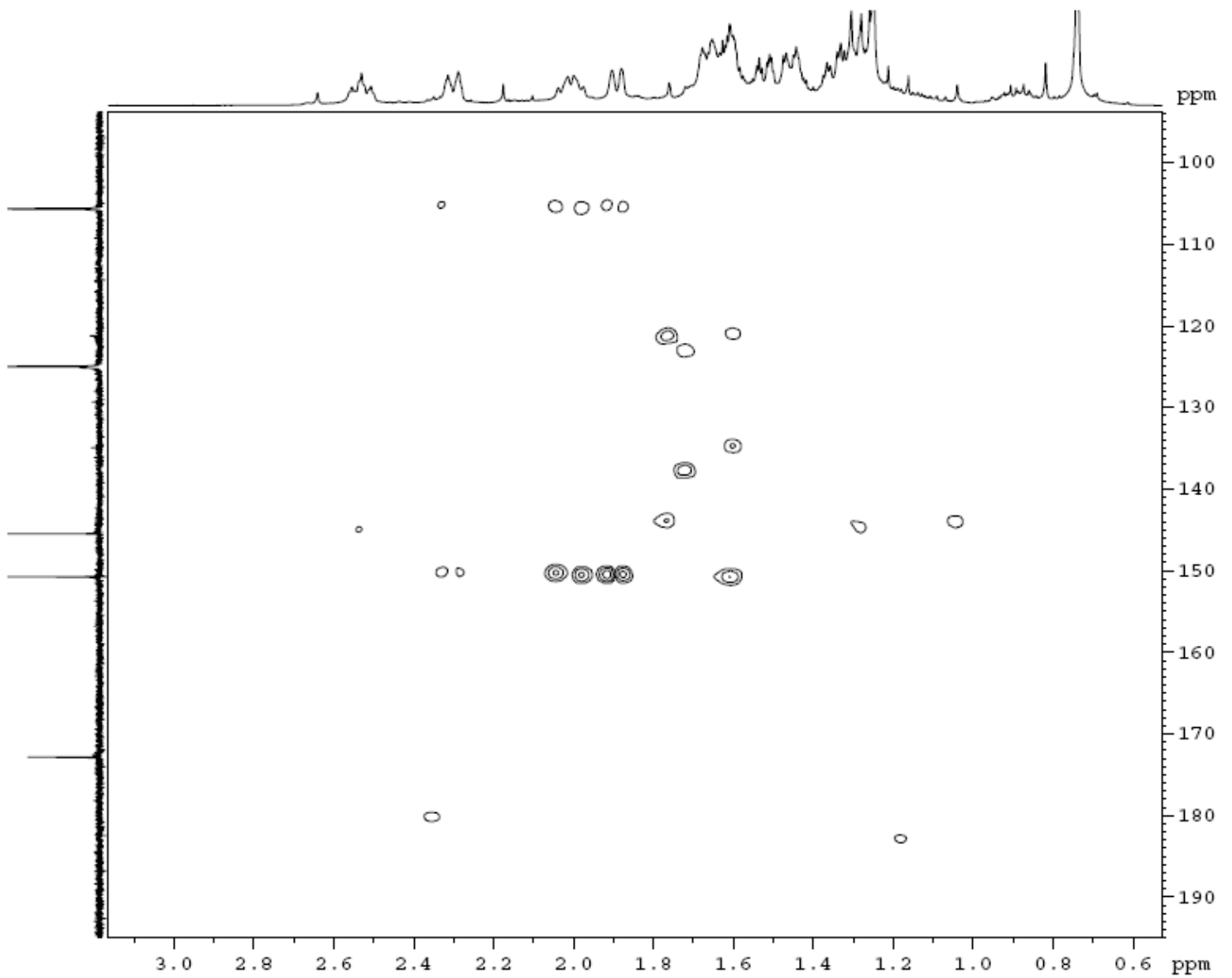
Φάσμα HMBC του costic acid.



Φάσμα HMBC του costic acid (περιοχή  $^{13}\text{C}$  : 0 - 65 ppm,  $^1\text{H}$  : 0 - 2.6 ppm).

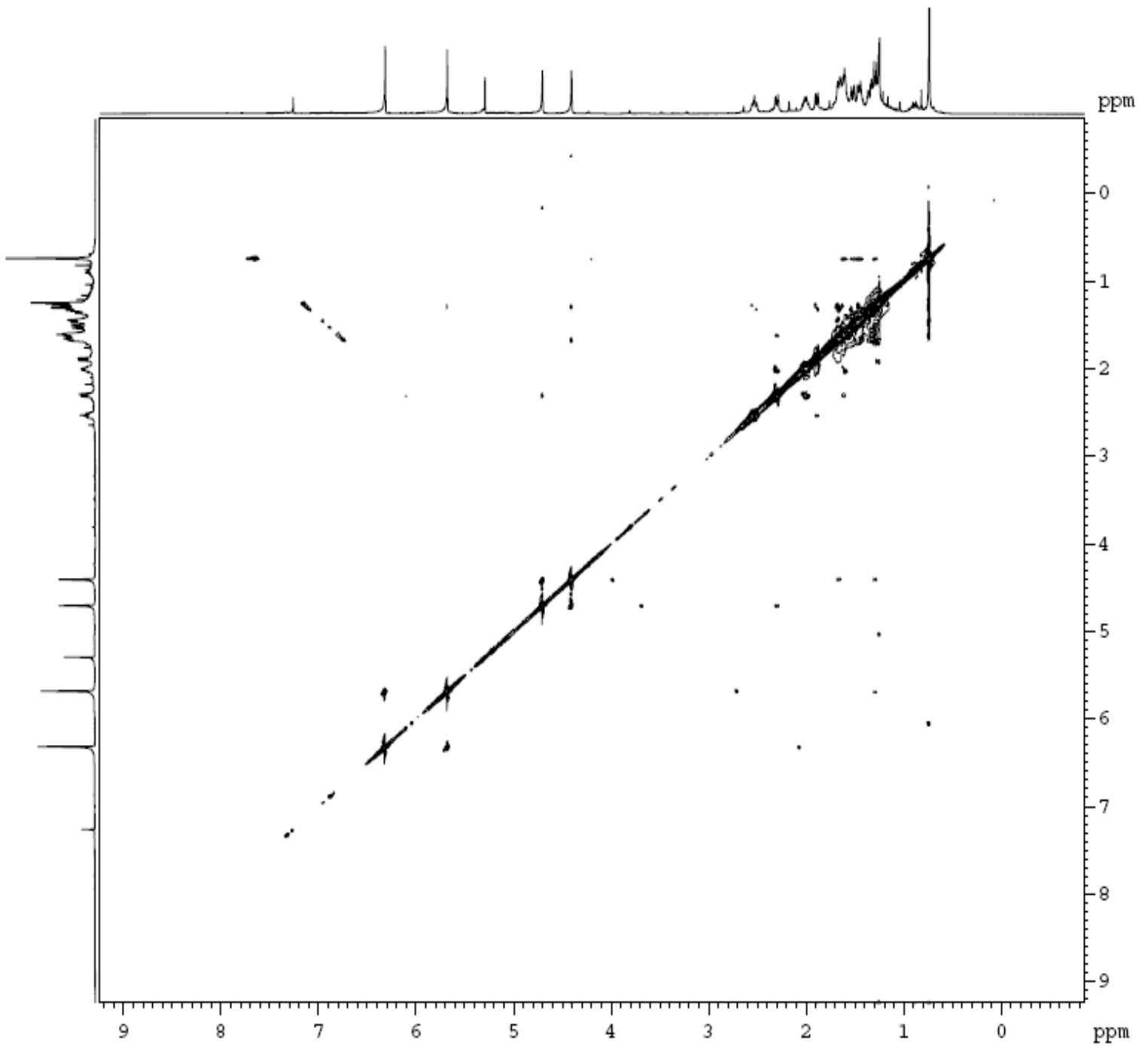


Φάσμα HMBC του costic acid (περιοχή  $^{13}\text{C}$  : 95 - 190 ppm,  $^1\text{H}$  : 0 - 3.0 ppm).





**Φάσμα NOESY του costic acid.**



Φάσμα NOESY του costic acid (περιοχή 0 – 3.0 ppm).

