



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΡΟΔΟΦΥΚΟΣ *LAURENCIA GLANDULIFERA*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΗ

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2017**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Επίκ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί, λόγω της μοναδικότητας του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν, αποτελούν πηγή ιδιαίτερων δευτερογενών μεταβολιτών που πολλές φορές εμφανίζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις.

Είδη του γένους *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae) συναντώνται σε πληθώρα ενδιαιτημάτων και έχουν αποτελέσει σπουδαία πηγή φυσικών προϊόντων, κυρίως αλογονωμένων τερπενίων και C₁₅ ακετογενινών. Ιδιαιτερότητα του γένους αποτελεί και η ποικιλομορφία στο χημικό προφίλ των πληθυσμών, ανάλογα με τη τοποθεσία και τον χρόνο της δειγματοληψίας.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση του οργανικού εκχυλίσματος του ροδοφύκου *Laurencia glandulifera* Kützinger, δείγματα του οποίου συλλέχθηκαν από την περιοχή Βάτσα της Κεφαλονιάς σε βάθος 0.5-2 m τον Ιούνιο του 2015.

Έπειτα από εξαντλητική εκχύλιση του οργανισμού με οργανικούς διαλύτες, το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών και απομονώθηκαν 31 μεταβολίτες, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπικές μεθόδους (NMR και MS) 13 μεταβολίτες. Εξ αυτών, ένας μεταβολίτης αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

Συγκεκριμένα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν:

- I. Τέσσερις C₁₅ ακετογενίνες:
 - τρεις με οκταμελή δακτύλιο με σκελετό λαουρενανίου
 - μια με επταμελή δακτύλιο και διακλαδισμένη ανθρακική αλυσίδα
- II. Τρία σεσκιτερπένια:
 - ένα μπραζιλανικού σκελετού
 - ένα νέο φυσικό προϊόν με πρωτότυπο ανθρακικό σκελετό *seco*-μπρασιλανίου
 - ένα κυκλολαουρανικού σκελετού
- III. Έξι διτερπένια:
 - δυο με σκελετό νεοροτζίολανίου
 - τρία με σκελετό πρεβεζόλης A
 - ένα με σκελετό πρεβεζόλης D.

ABSTRACT

Marine organisms, having to cope with demanding conditions in a unique environment, produce chemically interesting secondary metabolites, which often exhibit significant bioactivities.

Members of the genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae) are thalloid algae comprising approximately 145 species that occur worldwide in different marine habitats. They have been proven a rich source of bioactive natural products, especially of halogenated sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes and non-terpenoid C₁₅-acetogenins. Moreover, the chemistry of this genus is intriguing as it varies according to the site and the time of collection.

In the framework of the present thesis, specimens of the red alga *Laurencia glandulifera* Kützinger were collected from Vatsa bay at Kefalonia island at a depth of 0.5-2 m in June of 2015, in order to study the chemical composition of its organic extract.

After exhaustive extraction of the algal specimens, the organic extract was subjected to chromatographic separations to afford 31 metabolites, out of which 13 were identified by spectroscopic methods (NMR and MS). Among these, one is a new natural product.

Specifically, the isolated metabolites include:

- I. Four C₁₅ acetogenins:
 - three of laurenane type with an eight-membered ring
 - one branched oxepane
- II. Three sesquiterpenes:
 - one of the brasilane class
 - one new natural product featuring a novel *seco*-brasilane framework
 - one of laurane type
- III. Six diterpenes:
 - two neorogiolanes
 - three of prevezol A class
 - one of prevezol D class.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ για την επιλογή και την ανάθεση του θέματος, την υποστήριξη, την καθοδήγηση και τη διάθεσή τους να μοιραστούν τις γνώσεις τους μαζί μου, καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου και Επίκουρη Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου για την ανάγνωση και αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαρία-Μαρίνα Κουλάδη για τη βοήθειά της κατά την πορεία της εργασίας μου.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Χαριζάνη για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξή της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς και την προθυμία της να απαντήσει σε πρακτικά ζητήματα του εργαστηρίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες, μεταδιδακτορικούς ερευνητές και τεχνικούς του εργαστηρίου για τη φιλία τους και τη βοήθεια τους καθόλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και τους φίλους μου, που βρίσκονται πάντα δίπλα μου, προσφέροντάς τη βοήθεια και την συμπαράστασή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ix
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.1.1. Φυσικά προϊόντα.....	1
1.1.2. Η χρησιμότητα των φυσικών προϊόντων στη φαρμακευτική	1
1.2. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία	4
1.2.1. Γενικά	4
1.2.2. Προκλήσεις στον τομέα της Θαλάσσιας Φαρμακογνωσίας.....	6
1.3. Η θεραπευτική αξία των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων.....	8
1.3.1. Εγκεκριμένα φάρμακα θαλάσσιας προέλευσης.....	9
1.3.2. Μόρια θαλάσσιας προέλευσης σε κλινικές δοκιμές	12
1.4. Άλλες εφαρμογές θαλάσσιων προϊόντων	14
1.5. Φύκη	17
1.5.1. Γενικά	17
1.5.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες μακροφυκών.....	18
1.5.3. Ροδοφύκη.....	20
1.6. Το γένος <i>Laurencia</i>	20
1.6.1. Ταξινόμηση και το «σύμπλεγμα» <i>Laurencia</i>	22
1.6.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους <i>Laurencia</i>	23
1.7. Σκοπός της μελέτης	31
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	33
2.1. Οργανολογία	33
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια.....	33
2.3. Συλλογή οργανισμού	34
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το ροδοφύκος <i>Laurencia glandulifera</i>	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71

3.1. Μεταβολίτης 1	72
3.2. Μεταβολίτης 2	75
3.3. Μεταβολίτης 3	78
3.4. Μεταβολίτης 4	81
3.5. Μεταβολίτης 5	84
3.6. Μεταβολίτης 6	87
3.7. Μεταβολίτης 7	90
3.8. Μεταβολίτης 8	95
3.9. Μεταβολίτης 9	98
3.10. Μεταβολίτης 10	101
3.11. Μεταβολίτης 11	104
3.12. Μεταβολίτης 12	107
3.13. Μεταβολίτης 13	110
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D NMR	πείραμα NMR μίας διάστασης
2D NMR	πείραμα NMR δύο διαστάσεων
^1H NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
^{13}C NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
br	ευρεία (NMR)
CDCl_3	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH_2Cl_2	διχλωρομεθάνιο
CHCl_3	χλωροφόρμιο
cHex	κυκλοεξάνιο
COSY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^1H για 2J και 3J (Correlated Spectroscopy)
d	διπλή (NMR)
EIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact Mass Spectrometry)
ESIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
GCC	χρωματογραφία στήλης βαρύτητας (Gravity Column Chromatography)
HMBC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^{13}C για 2J και 3J (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^{13}C για 1J (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
<i>i</i>-Prop	ισοπροπανόλη (2-προπανόλη)
<i>J</i>	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
m	πολλαπλή (NMR)
Me_2CO	ακετόνη
MeOH	μεθανόλη
MS	φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry)
<i>m/z</i>	λόγος μάζας προς φορτίο
<i>n</i>-Hex	κανονικό εξάνιο
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)
RI	δείκτης διάθλασης (Refractive Index)
q	τετραπλή (NMR)
s	απλή (NMR)
SPE	εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)
t	τριπλή (NMR)
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)
VLC	χρωματογραφία στήλης υπο κενό (Vacuum Liquid Chromatography)
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Εισαγωγή

1.1.1. Φυσικά προϊόντα

Ο όρος «φυσικά προϊόντα» καλύπτει μια ιδιαιτέρως μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα χημικών ενώσεων που προέρχεται και έχει απομονωθεί από βιολογικές πηγές. Το ενδιαφέρον για τα φυσικά προϊόντα ξεκινά χιλιάδες χρόνια πριν και συνεχίζεται μέχρι σήμερα, λόγω της χρησιμότητας που έχουν για τον άνθρωπο. Μόρια φυσικής προέλευσης και εκχυλίσματα βρίσκουν εφαρμογές στην ιατρική, στη γεωργία, στις βιομηχανίες καλλυντικών και τροφίμων παγκοσμίως. Γι'αυτό άλλωστε και η δυνατότητα πρόσβασης στα φυσικά προϊόντα, η κατανόηση της χρησιμότητάς τους και η εξαγωγή συμπερασμάτων για την εφαρμογή τους αποτελούν κινητήριες δυνάμεις στον αντίστοιχο ερευνητικό τομέα.

Πιο συγκεκριμένα, αν και ο όρος «φυσικά προϊόντα» αναφέρεται σε όλες τις χημικές ενώσεις που βρίσκονται στη φύση, έχει επικρατήσει να χαρακτηρίζονται έτσι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, δηλαδή τα μόρια που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς για συγκεκριμένους λόγους, χωρίς όμως να είναι αυστηρώς απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Οι ενώσεις αυτές παράγονται είτε ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικής προσαρμογής του οργανισμού, είτε ως αμυντικός μηχανισμός (Dewick 2002, Colegate & Molyneux 2007). Τα φυσικά προϊόντα μπορεί να προέρχονται από οποιαδήποτε θαλάσσια ή χερσαία πηγή, φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς.

Καθώς οι δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν προκύψει ως αποτέλεσμα εκατομμυρίων ετών εξέλιξης και προσαρμογής των χερσαίων και θαλάσσιων οργανισμών σε ποικίλους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες στρες, συνήθως παρουσιάζουν βιοδραστικότητα. Για χρόνια χρησιμοποιούνταν για τη θεραπεία νοσημάτων και διαταραχών και την ανακούφιση των ασθενών και σήμερα εξακολουθούν να αποτελούν μια «δεξαμενή» πιθανών φαρμάκων (Lamottke et al. 2011).

1.1.2. Η χρησιμότητα των φυσικών προϊόντων στη φαρμακευτική

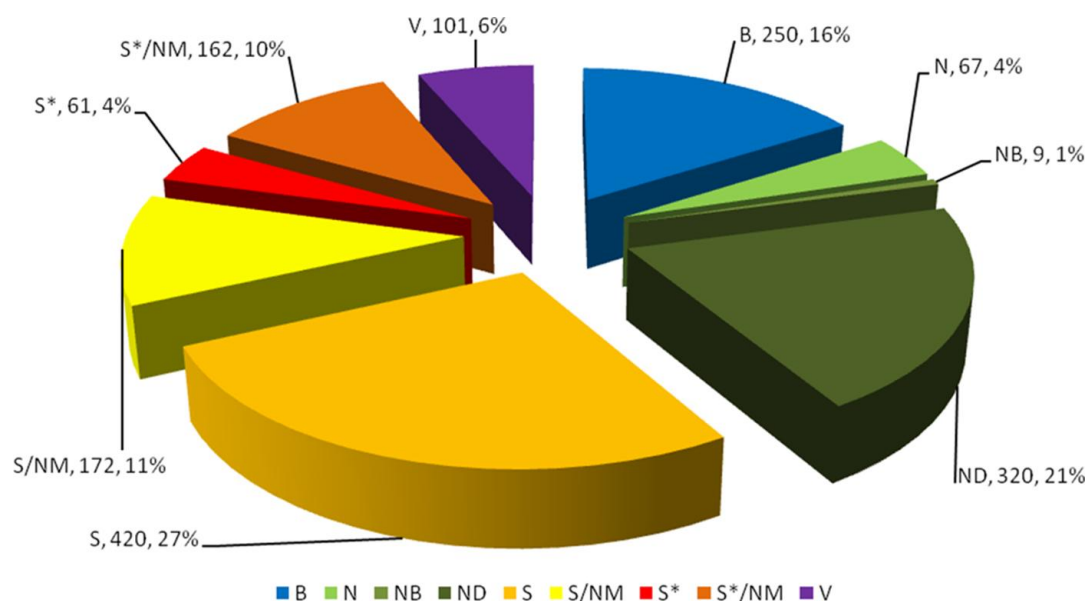
Η χρήση φυσικών προϊόντων, ιδιαιτέρως φυτών, με σκοπό την ίαση είναι τόσο παλιά και καθολική όσο και η ίδια η ιατρική. Από την εποχή των Σουμερίων και την αρχαία Ελλάδα με τον Ιπποκράτη, τον Θεόφραστο και το «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς» του

Διοσκουρίδη, έχουμε αναφορές για χρήση εκατοντάδων διαφορετικών φυτών για ιατρικούς σκοπούς. Τα φυσικά προϊόντα έπαιξαν πρωταγωνιστικό ρόλο στα αρχαία συστήματα παραδοσιακής ιατρικής, όπως η Κινεζική και η Ayurveda, στα οποία ακόμη και σήμερα καταφεύγουν πολλοί άνθρωποι (Sarker et al. 2006). Πέραν όμως από τις ευεργετικές ιδιότητες ορισμένων φυσικών προϊόντων, οι άνθρωποι είχαν αναγνωρίσει και την επικινδυνότητα κάποιων άλλων. Παράδειγμα αποτελεί το κουράριο, ένα πολύπλοκο εκχύλισμα που χρησιμοποιούνταν από τους Ινδιάνους της Ν. Αμερικής ως δηλητήριο των βελών.

Η πρόοδος στον τομέα της χημείας στις αρχές του 19^{ου} αιώνα είχε σαν αποτέλεσμα να γίνει η αρχή για τη σε βάθος μελέτη των φυτών και των θεραπευτικών τους δυνατοτήτων (Beutler 2009). Σταδιακά, από τον 20^ο αιώνα, άρχισε να παρατηρείται αυξανόμενη χρήση των φυσικών προϊόντων σε φαρμακευτικά σκευάσματα, όμως στις αρχές του 2000 αρκετές φαρμακοβιομηχανίες περιόρισαν σημαντικά την έρευνά τους στον τομέα των φυσικών προϊόντων και στράφηκαν σε άλλες μεθοδολογίες, θεωρώντας ότι θα αποβούν περισσότερο αποδοτικές. Ωστόσο, η μη αναμενόμενη αποτελεσματικότητα του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων (rational drug design) και της συνδυαστικής χημείας (combinatorial Chemistry), έφερε και πάλι στο προσκήνιο τη φαρμακογνωσία, που συνεχίζει εν τω μεταξύ να αναπτύσσεται σε ακαδημαϊκό επίπεδο (David et al. 2015).

Μέχρι σήμερα ένας εντυπωσιακός αριθμός φαρμάκων έχουν προκύψει από φυσικές πηγές, πολλά βασισμένα στη χρήση τους στην παραδοσιακή ιατρική. Αξιοσημείωτα παραδείγματα είναι η μορφίνη από το *Papaver somniferum*, η βινκριστίνη από το *Vinca rosea* και η ταξόλη από το *Taxus brevifolia* (Dewick 2002).

Πέρα όμως από τη δομική ποικιλομορφία και τη φαρμακολογική δράση που μπορεί να παρουσιάζουν οι ενώσεις φυσικής προέλευσης, τα φυσικά προϊόντα μπορούν να συμβάλουν στην έρευνα για νέα φάρμακα και με έμμεσους τρόπους. Μπορούν να αποτελέσουν δομικούς λίθους για τη σύνθεση πιο πολύπλοκων, δραστικότερων ή λιγότερο τοξικών μορίων ή να οδηγήσουν στη δημιουργία συνθετικών αναλόγων (Newman & Cragg 2016b). Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί ανιχνευτές για την ταυτοποίηση στόχων που σχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες (Schmitt et al. 2011). Σε κάθε περίπτωση ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων βασίζεται ή προέρχεται είτε άμεσα, είτε έμμεσα από φυσικά προϊόντα (Εικ. 1) (Newman & Cragg 2016b).



Εικόνα 1: Κατηγοριοποίηση των εγκεκριμένων φαρμάκων (1981-2014) με βάση την πηγή προέλευσης, $n = 1562$ (Newman & Cragg 2016b).
(N=φυσικό προϊόν, NB=«βοτανικό» φυσικό προϊόν, ND=παράγωγο φυσικού προϊόντος, NM=«μυμητικό» φυσικού προϊόντος, S= Συνθετικό φάρμακο, S*=Συνθετικό φάρμακο με φυσικό φαρμακοφόρο τμήμα, V=Εμβόλια, B= Βιολογικά μακρομόρια)

Εκτός από τα φυσικά προϊόντα που κυκλοφόρησαν στην αγορά ως δραστικό συστατικό φαρμακευτικών σκευασμάτων, ιδιαίτερη ανάπτυξη παρουσιάζει και η φυτοθεραπευτική, τα φυτοφαρμακευτικά προϊόντα και η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής. Η ανάπτυξη αυτή μπορεί να σχετίζεται με το ενδιαφέρον των εταιρειών για την αντιμετώπιση μικρών διαταραχών, όπως ψυχοσωματικών ή μεταβολικών προβλημάτων και την ικανοποίηση μιας μερίδας ανθρώπων που μπορεί να θεωρούν ότι τα «φυσικά» προϊόντα είναι λιγότερο επιβλαβή. Σίγουρα όμως παίζει ρόλο και το γεγονός ότι ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού, περίπου το 70% σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), που δεν έχει πρόσβαση στη δυτική ιατρική, βασίζεται στα φαρμακευτικά φυτά και την παραδοσιακή ιατρική για την εύρεση οικονομικών θεραπευτικών λύσεων σε μικρότερα προβλήματα ή και σοβαρότερες ασθένειες (David et al. 2015).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι λιγότερο από το 10% της παγκόσμιας βιοποικιλότητας έχει ελεγχθεί ως προς την ύπαρξη πιθανής βιοδραστικότητας, η πρόκληση παραμένει στο πώς θα αξιολογηθεί όλη αυτή η χημιοποικιλότητα επαρκώς και αποτελεσματικά (Cragg & Newman 2005).

Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία επιλογής οργανισμού, απομόνωσης και ταυτοποίησης πιθανών «μορίων-οδηγών» έχουν παίξει οι ταχύτατες τεχνολογικές

εξελίξεις, η ανάπτυξη των βιοδοκιμών, των χρωματογραφικών μεθόδων και της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Επιπλέον, η σύζευξη χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών (πχ. GC-MS, LC-MS, HPLC-NMR-MS/HPLC-NMR, κ.α.) προσφέρει την γρήγορη αξιολόγηση ακατέργαστων εκχυλισμάτων (Urban & Separovic 2005). Στην αξιολόγηση της περαιτέρω μελέτης ενός οργανισμού και την αναγνώριση γνωστών μεταβολιτών χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωσή τους (dereplication) έχει συμβάλλει και η ανάπτυξη της μεταβολομικής, η οποία συνδυάζοντας διαφορετικά πεδία και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση διευκολύνει την αναλυτική διαδικασία πολύπλοκων μειγμάτων (Roessner et al. 2011). Τέλος, η καταχώρηση των διαθέσιμων δεδομένων σε βιβλιοθήκες και βάσεις δεδομένων για χερσαίους και θαλάσσιους οργανισμούς έχει διευκολύνει σημαντικά την πορεία προς την εύρεση νέων βιοδραστικών φυσικών προϊόντων.

1.2. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία

1.2.1. Γενικά

Η θαλάσσια φαρμακογνωσία αποτελεί κλάδο της φαρμακογνωσίας και ασχολείται κυρίως με την απομόνωση βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών από θαλάσσιους οργανισμούς. Παράλληλα, διερευνά την χημική οικολογία των θαλάσσιων οργανισμών και μελετά τις βιοτοξίνες θαλάσσιας προέλευσης.

Αν και η μελέτη οργανισμών χερσαίας προέλευσης για την απομόνωση φυσικών προϊόντων έχει υπάρξει πολύ πιο εντατική στο πέρας των χρόνων κυρίως λόγω της εύκολης πρόσβασης και συλλογής του βιολογικού υλικού, το θαλάσσιο περιβάλλον που μέχρι πρότενος έμοιαζε απροσπέλαστο, αποτελεί επίσης μια πηγή νέων χημικών δομών. Αυτό δεν φαντάζει και τόσο παράξενο αν αναλογιστούμε την έκταση των ωκεανών, οι οποίοι καλύπτουν το 70% της επιφάνειας του πλανήτη, καθώς και τη βιοποικιλότητα που παρουσιάζουν (Haefner 2003). Χαρακτηριστικά, από τα 36 φύλα που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, βρίσκουμε τουλάχιστον 32 στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ περίπου τα μισά είναι αποκλειστικά υδρόβια (Martins et al. 2014, Jaspars et al. 2016).

Η εξερεύνηση του θαλάσσιου περιβάλλοντος που ξεκίνησε πιο μεθοδευμένα από τη δεκαετία του 1970, διευκολύνθηκε από την τεχνολογική πρόοδο στις τεχνικές κατάδυσης. Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη συσκευών αυτόνομης κατάδυσης (SCUBA: Self Contained Underwater Breathing Apparatus), η χρήση επανδρωμένων

βαθυσκάφων, και τηλεκατευθυνόμενων υποβρύχιων οχημάτων (ROVs:-Remotely Operated Vehicles), άνοιξαν το δρόμο προς την μελέτη του ωκεανού ως πηγή φυσικών προϊόντων (Dias et al. 2012).

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί πάνω από 30.000 φυσικά προϊόντα από θαλάσσιους οργανισμούς (MarinLit 2017) και έχουν επιδείξει δυνατότητες για εφαρμογή σε πολλά πεδία, ιδιαίτερα ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες για πληθώρα ασθενειών.

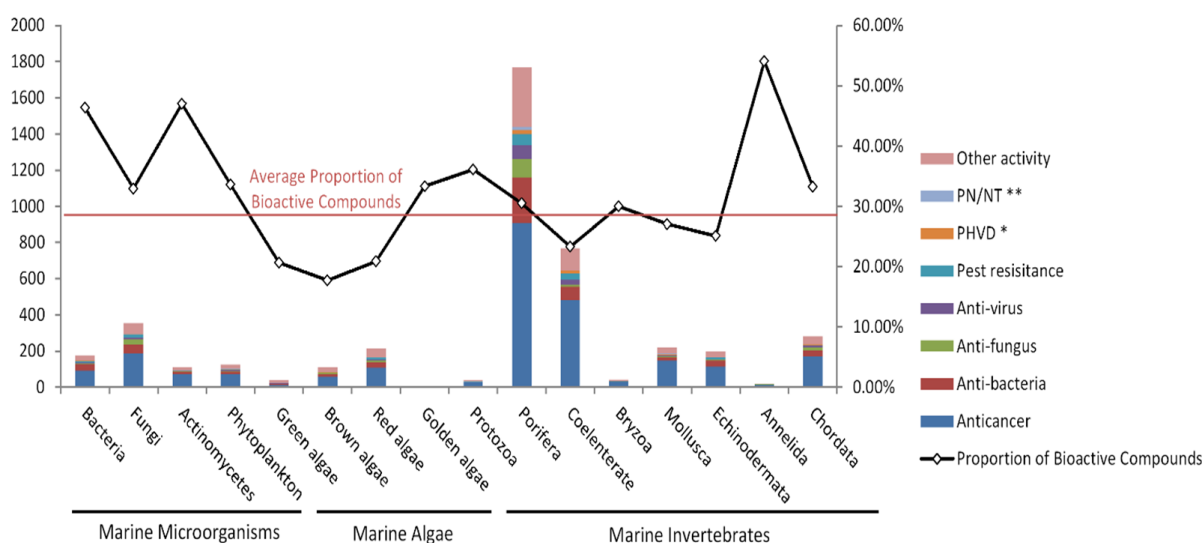
Οι χημικές δομές των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων είναι διαφοροποιημένες και πιο πολύπλοκες σε σχέση με τις δομές χερσαίας προέλευσης. Μπορεί να εμφανίσουν χημικούς σκελετούς και δραστικές ομάδες, αντίστοιχες των οποίων δεν υπάρχουν στα χερσαία φυσικά προϊόντα (Carte 1996), ενώ πολλές φορές παρουσιάζουν εντονότερες και πιο εξειδικευμένες βιολογικές δράσεις. Επιπλέον, οι υψηλές συγκεντρώσεις αλογόνων στο θαλάσσιο περιβάλλον και η μικρή διαθεσιμότητα αζωτούχων αλάτων έχει ως συνέπεια την παρουσία πληθώρας αλογονωμένων μορίων και τη σχετική σπανιότητα αζωτούχων δομών, αντίστοιχα.

Η ιδιαιτερότητα των θαλάσσιων δευτερογενών μεταβολιτών θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν εξελιχθεί ώστε να εποικίζουν μια μεγάλη ποικιλία οικοθέσεων. Πιο συγκεκριμένα, στο θαλάσσιο περιβάλλον απαντάται μεγάλο εύρος πίεσης (1-1.000 atm), ενώ υπάρχουν διακυμάνσεις και στη διαθεσιμότητα φωτός, οξυγόνου και τροφής-θρεπτικών στοιχείων, για την οποία ανταγωνίζεται ένας εντυπωσιακά μεγάλος αριθμός ειδών (~240.000) (Lindequist 2016). Για να ανταπεξέλθουν σε ένα τόσο μεγάλο εύρος ενδιατημάτων, οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει διαφοροποιημένες δευτερογενείς μεταβολικές οδούς που παράγουν έναν μεγάλο αριθμό ασυνήθιστων χημικών ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις καλύπτουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών ομάδων, όπως τερπένια, προϊόντα από το μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος, πολυκετίδια, ακετογενίνες, πεπτίδια, αλκαλοειδή, κ.α. (Sarker et al. 2006).

Επιπλέον, η διάρκεια της εξελικτικής πορείας των θαλάσσιων οργανισμών, καθώς και η απουσία εμφανών μηχανισμών φυσικής αμύνας, όπως δυνατότητα μετακίνησης, ιστολογική εξειδίκευση και πιο εξελιγμένες ανοσολογικές αποκρίσεις, είχε σαν συνέπεια πολλοί από αυτούς (π.χ. ασπόνδυλα με μαλακό σώμα) να αναπτύξουν ένα εντυπωσιακό χημικό «οπλοστάσιο». Στόχος είναι η χημική προστασία από τη θήρευση, τον ανταγωνισμό, την προσβολή από μικροοργανισμούς, ή ακόμη κι από αβιοτικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, αλλά και η διευκόλυνση

της επικοινωνίας (χημική επικοινωνία) (Halvorson 1998, Lindequist 2016). Αν και η ύπαρξη χημικής άμυνας σε έναν οργανισμό δεν συνεπάγεται άμεσα δευτερογενείς μεταβολίτες με φαρμακολογική δράση, είναι εμφανές ότι υπάρχει συσχέτιση (Faulkner 2000). Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι τα μόρια αυτά ως μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί είναι πιθανότερο να στοχεύουν σε γενικές διαδικασίες ζωτικής σημασίας (Dančik et al. 2010). Πολλές φορές έχουν ως στόχους ένζυμα, υποδοχείς, διαύλους και μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες (David et al. 2015).

Ανάμεσα στα πολλά φύλα που συναντάμε στο θαλάσσιο περιβάλλον, «πλουσιότερες» πηγές για βιοδραστικά μόρια θεωρούνται τα βακτήρια, τα κυανοβακτήρια, οι μύκητες, ορισμένα φύκη, οι σπόγγοι, τα μαλακά κοράλλια, τα μαλάκια, τα βρυόζωα και τα ουροχορδωτά. Ορισμένοι θαλάσσιοι οργανισμοί που ανήκουν στα δινομαστιγωτά, εχινόδερμα και κάποια ψάρια είναι γνωστοί για την παραγωγή τοξινών (Faulkner 2000). Στην Εικ. 2 φαίνεται η κατανομή των βιοδραστικών μορίων στους διάφορους οργανισμούς.



Εικόνα 2. Αριθμός και ποσοστό των βιοδραστικών μορίων που απομονώθηκαν την χρονική περίοδο 1985-2012 από θαλάσσιους οργανισμούς (Hu et al. 2015).
(* PHVD: Πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων ** PN/NT: Προστασία των νευρώνων/Νευροτοξικότητα)

1.2.2. Προκλήσεις στον τομέα της Θαλάσσιας Φαρμακογνώσιδας

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες θαλάσσιας προέλευσης παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των πρωτότυπων και πολύπλοκων χημικών τους δομών, καθώς και των αξιοσημείωτων φαρμακολογικών δράσεων που αυτές μπορεί να έχουν, ωστόσο

αρκετές παράμετροι μπορεί να περιπλέξουν την απομόνωσή τους.

Η άγνοια ως προς την συστηματική κατάταξη ορισμένων θαλάσσιων ειδών, καθώς και το γεγονός ότι πολλά είδη και στελέχη εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστα, μπορεί να αποτελέσει σημαντική τροχοπέδη. Η δυσκολία της ταξινόμησης των θαλάσσιων οργανισμών μπορεί να δυσκολέψει την βιβλιογραφική αναζήτηση για τις χημικές κατηγορίες των μεταβολιτών που παράγει το υπό εξέταση είδος. Μπορεί ακόμα να οδηγήσει σε λανθασμένες υποθέσεις για το χημικό του προφίλ και κατά συνέπεια να επηρεάσει την επιλογή της καταλληλότερης προσέγγισης στην πορεία απομόνωσης των μεταβολιτών (Martins et al. 2014), ενώ η χρήση της χημειοταξινομικής για την πρόβλεψη της παρουσίας συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών σε έναν οργανισμό δεν είναι πάντοτε επιτυχής.

Η δειγματοληψία από το θαλάσσιο περιβάλλον είναι εκ φύσεως πιο δύσκολη, ενώ επίσης μπορούν να παρατηρηθούν μεταβολές στην παραγωγή μεταβολιτών μεταξύ δειγμάτων του ίδιου οργανισμού που όμως έχει συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές ή ακόμη και από διαφορετικά βάθη (Mendola 2003). Πολλές φορές απαιτείται η συλλογή μεγάλης ποσότητας του υπό μελέτη οργανισμού για την απομόνωση φυσικών προϊόντων σε πολύ μικρή ποσότητα, ενώ η γεωγραφική και εποχιακή διακύμανση στην παρουσία και συγκέντρωση των μεταβολιτών δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο την συλλογή της επιθυμητής ποσότητας από τον εκάστοτε μεταβολίτη.

Σε περίπτωση που ένας μεταβολίτης παρουσιάσει ενδιαφέρον, η διαθεσιμότητά του μπορεί να εξασφαλιστεί με τη βοήθεια της συνθετικής χημείας, αν και η ολική σύνθεση τόσο πολύπλοκων δομών μπορεί να αποβεί αρκετά δύσκολη, ή μέσω βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων εφόσον είναι γνωστά τα απαραίτητα γονίδια για τη βιοσύνθεση του μεταβολίτη (Salomon et al. 2004). Η καλλιέργεια (mariculture/aquaculture/cultivation) του παραγωγού οργανισμού, εφόσον είναι δυνατή, θα μπορούσε να αποτελεί επίσης μια λύση, θα πρέπει όμως να ληφθεί υπόψη ότι στη θαλάσσια φαρμακογνωσία υπάρχει το ενδεχόμενο, ο παραγωγός οργανισμός και ο οργανισμός από τον οποίο απομονώθηκε ο μεταβολίτης να μην ταυτίζονται. Η αρχική υπόθεση ότι οι πραγματικές πηγές πολλών ενώσεων που έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ασπόνδυλα αναμένεται να είναι μικροοργανισμοί, είτε λόγω προσβολής, είτε ως συμβιωτικοί (Faulkner 2000), αρχίζει να επιβεβαιώνεται (Piel 2009, Penesyan et al. 2010).

Παρά τις πιθανές δυσκολίες που μπορεί να αντιμετωπίζει η θαλάσσια φαρμακογνωσία, εξακολουθεί να προσελκύει το ενδιαφέρον ερευνητών από την

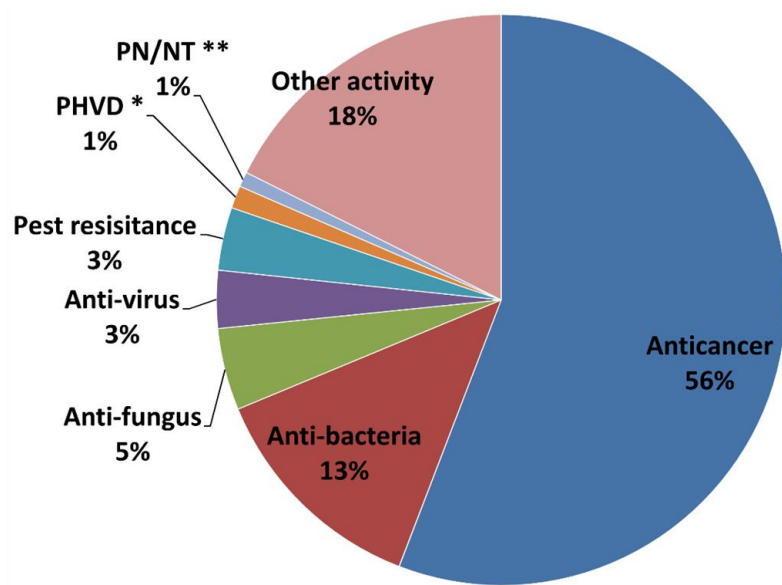
παγκόσμια επιστημονική κοινότητα και να αποτελεί έναν καίριο ερευνητικό τομέα με πολλά κοινωνικά και οικονομικά οφέλη.

1.3. Η θεραπευτική αξία των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων

Αν και το θαλάσσιο περιβάλλον στερείται εκτεταμένης εθνοφαρμακολογικής ιστορίας, υπάρχουν αναφορές που αποδεικνύουν ότι οι άνθρωποι κατανοούσαν τη σημασία και προσπαθούσαν να χρησιμοποιήσουν τους θαλάσσιους οργανισμούς για ιατρικούς σκοπούς. Αφεψήματα των ροδοφυκών *Chondrus crispus* και *Mastocarpus stellatus* χρησιμοποιούνταν ως «γιατρικό» για το κρυολόγημα, τον πονόλαιμο και τις λοιμώξεις του αναπνευστικού για αιώνες στην Ιρλανδία (Dias et al. 2012), ενώ στην Κορνουάλη θεωρούσαν ότι ο «χυμός» από το ροδοφύκος *Porphyra umbilicalis* θα μπορούσε να αντιμετωπίσει τον καρκίνο (Borlase 1758).

Πλέον απομονώνονται εκατοντάδες νέα μόρια κάθε χρόνο από θαλάσσιους οργανισμούς. Η μελέτη των ενώσεων αυτών μπορεί να ικανοποιήσει την ανθρώπινη περιέργεια, αλλά και την επιτακτική ανάγκη για εύρεση μορίων-οδηγών που θα συμβάλλουν στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων, όπως αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιπηκτική, κ.α.

Πιο συγκεκριμένα, όπως φάνηκε σε στατιστική ανάλυση των νέων θαλάσσιων φυσικών προϊόντων που ανακαλύφθηκαν μεταξύ 1985-2012, περισσότερα από τα μισά παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση (Εικ. 3), ενώ υπάρχουν και αναφορές για μόρια που εμφανίζουν πολλαπλές δράσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι το ποσοστό των μορίων με αντικαρκινική δράση δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες διακυμάνσεις μεταξύ των διαφορετικών χημικών κατηγοριών. Στην κατανομή των βιοδραστικών μορίων ως προς την κατηγορία της χημικής δομής, το μεγαλύτερο ποσοστό βιοδραστικότητας εντοπίζεται στα πεπτίδια (Hu et al. 2015).



Εικόνα 3. Βιολογικές δράσεις νέων θαλάσσιων φυσικών προϊόντων (1985-2012) (Hu et al. 2015).

(* PHVD: Πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων ** PN/NT: Προστασία των νευρώνων/Νευροτοξικότητα)

1.3.1. Εγκεκριμένα φάρμακα θαλάσσιας προέλευσης

Παρά τον μεγάλο αριθμό των φυσικών προϊόντων που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς και τις αξιόλογες δράσεις που αρκετά εμφανίζουν, σχετικά λίγα βρίσκονται στο εμπόριο ως φαρμακευτικά προϊόντα. Αν κι ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων είναι φαινομενικά μικρός, το ποσοστό επιτυχίας για την εύρεση νέων φαρμάκων από τη θάλασσα είναι 1,2-2,5 φορές μεγαλύτερο από τον μέσο όρο της βιομηχανίας (1 φάρμακο ανά 5.000-10.000 δοκιμασμένων ενώσεων) (Gerwick & Moore 2012).

Σήμερα κυκλοφορούν στην αγορά οκτώ εγκεκριμένα φάρμακα (Εικ. 4 και Εικ. 5), εκ των οποίων το ένα είναι μη συνταγογραφούμενο, ενώ αρκετά μόρια βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών. Από αυτά τα οκτώ φάρμακα, μόνο τα τρία (Prialt®, Yondelis®, Carragelose®) έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά χωρίς να τροποποιηθεί το αρχικό φυσικό προϊόν, ενώ τα υπόλοιπα υπέστησαν δομικές τροποποιήσεις με σκοπό την βελτιστοποίηση της δράσης (lead optimization) (Martins et al. 2014).

Πιο συγκεκριμένα, τα φάρμακα που κυκλοφορούν στο εμπόριο είναι τα εξής:

- **Cytarabine (Ara-C), Cytosar-U® → αντικαρκινική δράση**

Είναι αραβινοσίδης της κυτοσίνης, συνθετικό ανάλογο του νουκλεοσιδίου σπογγοουριδίνη που απομονώθηκε από το σπόγγο *Tethya crypta* (ή *Cryptotethya crypta*

που πλέον ονομάζεται *Tectytethya crypta*) στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Η κυταραμπίνη είναι ένα προφάρμακο. Ενδοκυτταρικά μετατρέπεται στην ενεργή τριφωσφορική της μορφή και ανταγωνίζεται την τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη αναστέλλοντας έτσι τη δράση της DNA πολυμεράσης και επομένως την αντιγραφή του DNA. Έλαβε έγκριση το 1969 και από τότε χρησιμοποιείται για την θεραπεία της μυελώδους λευχαιμίας, της μηνιγγικής λευχαιμίας και του λεμφώματος non-Hodgkin (Martins et al. 2014).

- ο **Vidarabine (Ara-A), Vira-A® → αντιική δράση**

Είναι αραβινοσίδης της αδερίνης, συνθετικό ανάλογο του νουκλεοσιδίου σπογοθυμιδίνη που απομονώθηκε από το σπόγγο *T. crypta*. Ενδοκυτταρικά μετατρέπεται και αυτό στην τριφωσφορική ενεργή μορφή του αναστέλλοντας τη δράση της DNA πολυμεράσης και τη σύνθεση του DNA των ιών του έρπητος, της δαμαλίτιδας και του έρπητος ζωστήρος (Newman et al. 2009), ενώ εμφανίζει δράση έναντι και άλλων ιών (Martins et al. 2014). Έχει λάβει έγκριση από το 1976 ως αντιικός παράγοντας, όμως η κυκλοφορία του έχει πλέον σταματήσει στις ΗΠΑ (Mayer et al. 2010).

- ο **Ziconotide, Prialt® → αναλγητική δράση**

Είναι ένα πεπτίδιο, συνθετικό ανάλογο της ω-κωνοτοξίνης MVIIA από το γαστερόποδο *Conus magus*. Έχει πάρει έγκριση από το 2004 για την αντιμετώπιση χρόνιων πόνων σχετιζόμενων με νευροπάθειες, AIDS και καρκίνο (Martins et al. 2014), ειδικά σε ασθενείς που τα οπιοειδή δεν αποτελούν λύση. Δρα μπλοκάροντας ειδικά τους N-τασοεξαρτώμενους διαύλους ασβεστίου (Schmidt et al. 2010).

- ο **Αιθυλεστέρες ω-3 λιπαρών οξέων, Lovaza® / Omacor → υπολιπιδαιμικός παράγοντας**

Αποτελείται από μίγμα αιθυλεστέρων ω-3 λιπαρών οξέων, κυρίως εικοσαπεντανοϊκού και δοκοσαεξαενοϊκού (DHA), προερχόμενων από ιχθυέλαια (Martins et al. 2014). Δρα μειώνοντας τη σύνθεση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ. Έχει λάβει έγκριση από το 2004 και χορηγείται είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα όπως στατίνες, αντιυπερτασικούς και αντιθρομβωτικούς παράγοντες με σκοπό την μείωση και την εξομάλυνση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο αίμα (Lindequist 2016).

- ο **Eribulin mesylate/ E7389, Halaven® → αντικαρκινική δράση**

Αποτελεί απλοποιημένο συνθετικό ανάλογο που περιέχει το φαρμακοφόρο τμήμα της χαλιχονδρίνης B, ενός πολυαιθερικού μακρολιδίου που απομονώθηκε το

1986 από το σπόγγο *Halichondria okadae*. Προσδένεται στη β-τουμπουλίνη, αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο και έχει λάβει έγκριση αρχικά από τον FDA το 2010 για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντα μεταστατικού καρκίνου του μαστού (Lindequist 2016).

- **Brentuximab vedotin, Adcetris® → αντικαρκινική δράση**

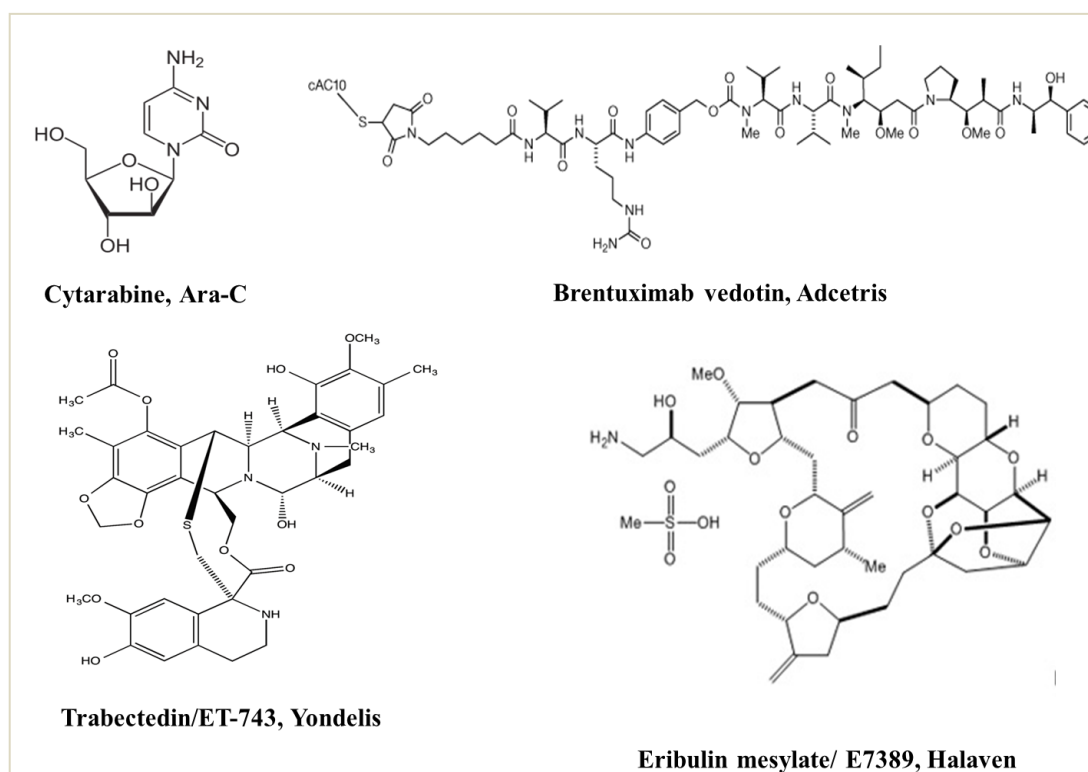
Αποτελείται από το συνθετικό ανάλογο του δεσμιπεπτιδίου δολαστατίνη 10, MMAE συζευγμένο με ένα anti-CD30 μονοκλωνικό αντίσωμα. Εγκρίθηκε αρχικά το 2011 από τον FDA για τη θεραπεία του ανθεκτικού ή υποτροπιάζοντος λεμφώματος Hodgkin και του αναπλαστικού μεγαλοκυτταρικού λεμφώματος (Martins et al. 2014). Το σύζευγμα προσδένεται ειδικά στη CD30 πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης και αφού ενδοκυττωθεί, η ελεύθερη πλέον MMAE προσδένεται στην τουμπουλίνη, αναστέλλοντας την μίτωση (Fromm et al. 2012).

- **Trabectedin/ET-743, Yondelis® → αντικαρκινική δράση**

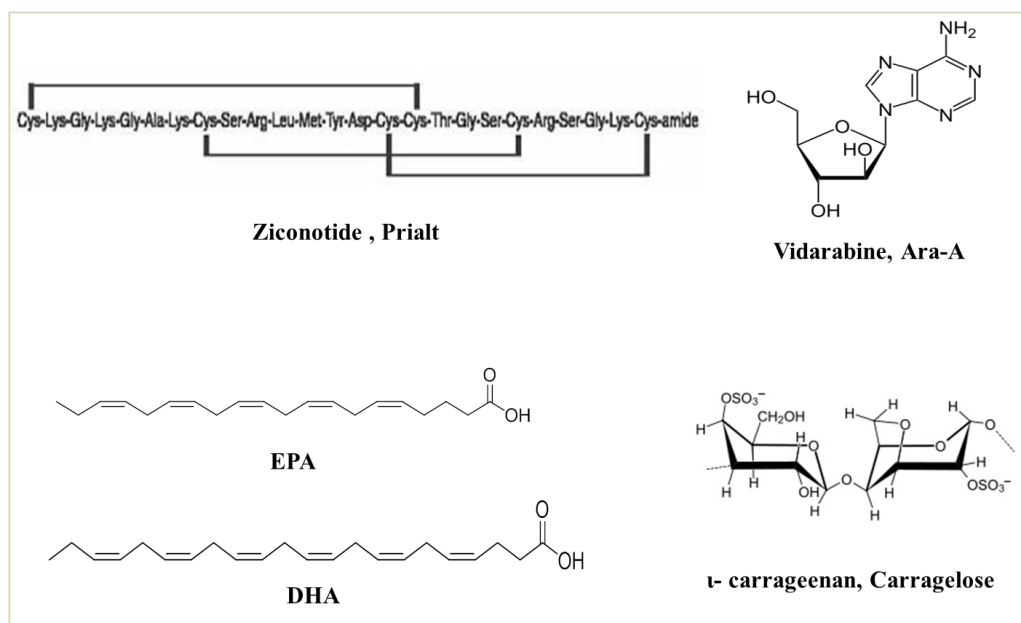
Πρόκειται για ένα αλκαλοειδές τετραϋδροϊσοκινολίνης που απομονώθηκε αρχικά από το ασκίδιο *Ecteinascidia turbinata* και πλέον παράγεται με μια ημισυνθετική μέθοδο. Πήρε έγκριση αρχικά από τον EMEA το 2007 για τη θεραπεία του σαρκώματος μαλακών ιστών και του καρκίνου των ωοθηκών (Schöffski et al. 2008). Είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας που προσδένεται εκλεκτικά στην μικρή αύλακα του DNA, διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Martins et al. 2014, Lindequist 2016). Βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία και άλλων τύπων καρκίνου.

- **ι-carrageenan, Carragelose® → αντιυική δράση**

Πρόκειται για ένα μη συνταγογραφούμενο αντιυικό ρινικό σπρέι για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της κοινής γρίπης. Δραστικό συστατικό είναι η ι-καρραγενάνη, ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης εστεροποιημένος με θεικές ρίζες που απομονώνεται από τα ροδοφύκη (Martins et al. 2014).



Εικόνα 4. Δραστικές ουσίες εγκεκριμένων φαρμάκων θαλάσσιας προέλευσης με αντικαρκινική δράση.



Εικόνα 5. Δραστικές ουσίες εγκεκριμένων φαρμάκων θαλάσσιας προέλευσης με άλλες δράσεις.

1.3.2. Μόρια θαλάσσιας προέλευσης σε κλινικές δοκιμές

Υπολογίζεται ότι αυτή τη στιγμή υπάρχουν πάνω από 20 υποψήφια μόρια σε κλινικές δοκιμές, με την πλειοψηφία να εξετάζεται για την ικανότητα τους να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Newman & Cragg 2016). Ενδεικτικά

παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα (Εικ. 6):

I. Αντικαρκινική δράση:

ο **Aplidine® (Plitidepsin Φάση II/III)**

Η πλιτιδεψίνη, γνωστή και ως δεϋδροδιδεμίνη B, είναι ένα δεψιπεπτίδιο που απομονώθηκε από το ασκίδιο *Aplidium albicans*. Εμφανίζει αντιμιτωτική δράση μπλοκάροντας τον κυτταρικό κύκλο και επάγοντας έτσι απόπτωση. Βρίσκεται στη φάση III κλινικών δοκιμών για την θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και στη φάση II για συμπαγείς και αιματολογικές κακοήθειες νεοπλασίες όπως το T-κυτταρικό λέμφωμα (Jaspars et al. 2016). Την ανάπτυξη του Aplidine® έχει αναλάβει η PharmaMar.

ο **Marizomib® (Salinosporamide A, CHI-0052, Φάση II/I)**

Το σαλινοσποραμίδιο A είναι ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας του 20S πρωτεασώματος και έχει δείξει δράση έναντι πολλών αιματολογικών κακοηθειών και όγκων, κυρίως έναντι του πολλαπλού μυελώματος (Fenical et al. 2009). Απομονώθηκε από το ακτινοβακτήριο *Salinispora tropica* και πλέον βρίσκεται στην φάση II/I κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, ενώ η ανάπτυξή του έχει περάσει πλέον στην Triphase Research and Development Corporation (Newman & Cragg 2016).

ο **Συζεύγματα φαρμάκου (MMAE/MMAF) -αντισώματος (διάφορες φάσεις)**

Επιπλέον υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός συζευγμάτων φαρμάκου-αντισώματος (ADC's: antibody-drug conjugate) σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου, στα οποία τα φάρμακα είναι συνθετικά ανάλογα φυσικών προϊόντων που ανήκουν στην οικογένεια των δολαστατινών πχ. το Glematumumab Vedotin (Φάση II) και το Pinatuzumab Vedotin (RG-7593) (Φάσεις I/II) (Newman & Cragg 2017).

II. Δράση κατά του Alzheimer:

ο **Bryostatin 1 (Φάση II)**

Η βρυστατίνη 1 είναι ένα μακρολίδιο που απομονώθηκε από το βρυόζωο *Bugula neritina*. Πριν ανακαλυφθεί η δράση του έναντι του Alzheimer, είχε δοκιμαστεί σε πολλές κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικός παράγοντας (Mayer et al. 2010). Σήμερα βρίσκεται στη φάση II των κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer από τη Neurotrope Bioscience (Newman & Cragg 2016a).

ο **DMXBA (GTS-21, Φάση II)**

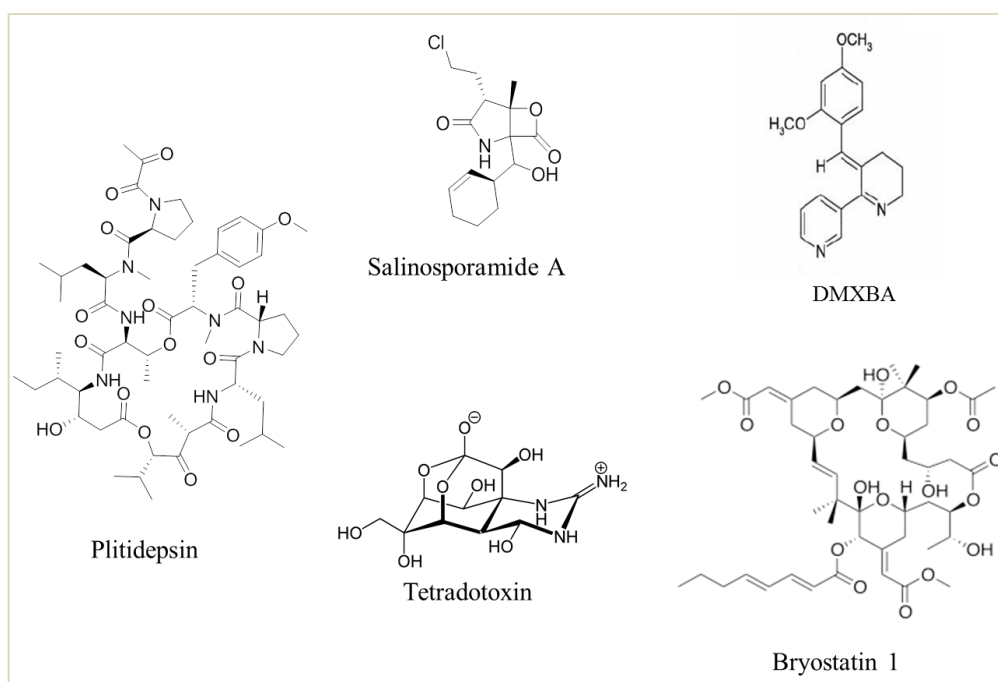
Είναι συνθετικό ανάλογο του αλκαλοειδούς αναβασείνη που έχει απομονωθεί

από πολλά είδη νημερτίνων. Ενεργοποιεί εκλεκτικά τους $\alpha 7$ νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (Kem et al. 2004). Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα έχουν δείξει σημαντική γνωσιακή βελτίωση σε υγιείς νέους και σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (Rangel & Falkenberg 2015). Η Comentis Inc. αναπτύσσει ένα φάρμακο για την αντιμετώπιση του Alzheimer και της σχιζοφρένειας (Jaspars et al. 2016).

III. Αναλγητική δράση:

ο **Tetrodotoxin (Φάση II/III)**

Η τετροδοτοξίνη είναι ένα αλκαλοειδές που έχει απομονωθεί από ψάρια της οικογένειας Tetraodontidae και προκαλεί αναστολή των τασοεξαρτώμενων διαύλων νατρίου. Η WEX Pharmaceuticals Inc. εξετάζει τη δράση της έναντι στο νευροπαθητικό άλγος που σχετίζεται με τον καρκίνο (φάση III) και έναντι της προκαλούμενης από χημειοθεραπεία περιφερικής νευροπάθειας (φάση II) (Jaspars et al. 2016, Newman & Cragg 2016).



Εικόνα 6. Θαλάσσια φυσικά προϊόντα σε κλινικές δοκιμές.

1.4. Άλλες εφαρμογές θαλάσσιων προϊόντων

ο **Στις βιομηχανίες καλλυντικών και τροφίμων**

Τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί οι όροι “nutraceuticals” και “cosmeceuticals”, περιγράφοντας μια νέα γενιά προϊόντων διατροφής και καλλυντικής

περιποίησης που περιέχουν βιοδραστικά συστατικά και έχουν ως στόχο να προσδώσουν θεραπευτικά οφέλη στους χρήστες. Πολλά φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης, είτε ως καθαρές ουσίες είτε ως εξευγενισμένα εκχυλίσματα, αποτελούν συστατικά διάφορων τέτοιων εμπορικών σκευασμάτων. Ευρεία εφαρμογή σε αυτές τις βιομηχανίες βρίσκουν και άλλα μόρια θαλάσσιας προέλευσης, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και λιπαρά οξέα. Ορισμένα παραδείγματα χρήσης θαλάσσιων προϊόντων είναι τα εξής (Martins et al. 2014, Suleria et al. 2015):

Πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη προερχόμενα από ψάρια αποτελούν λειτουργικά συστατικά τροφίμων και καλλυντικών. Το κολλαγόνο έχει δείξει αντιοξειδωτική, αντιυπερτασική, αντιγηραντική, αλλά και ενυδατική δράση (Noitup et al. 2005). Επίσης, ένζυμα θαλάσσιας προέλευσης χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για επεξεργασία ή ως συστατικά των τελικών προϊόντων.

Πολυσακχαρίτες όπως τα υδροκολλοειδή καρραγενάνη, άγαρ, αλγίνη και αλγινικά άλατα από ροδοφύκη και φαιοφύκη χρησιμοποιούνται ως πηκτικά μέσα και σταθεροποιητές, ενώ εφαρμογή βρίσκουν και η χιτίνη και τα παράγωγά της από διάφορα καρκινοειδή. Ενδιαφέροντα συστατικά στον τομέα της κοσμητολογίας είναι και οι εξωπολυσακχαρίτες (exopolysaccharides, EPS). Βρίσκονται σε εκχυλίσματα βακτηρίων και χρησιμοποιούνται στην κρεμική περιποίηση για την καταπράυνση του ευαίσθητου και ερεθισμένου δέρματος. Εκχυλίσματα μικροφυκών πλούσια σε πολυσακχαρίτες με θεικές ρίζες χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα συστατικά καλλυντικών για τις ενυδατικές, αναπλαστικές και αντιγηραντικές τους δράσεις.

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) χρησιμοποιούνται σε διάφορα προϊόντα κρεμικής περιποίησης. Στον τομέα των τροφίμων, ειδικά τα ω-3 λιπαρά οξέα απομονωμένα κυρίως από ιχθυέλαια και μικροφύκη, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως συμπληρώματα διατροφής, καθώς έχουν πολλαπλά οφέλη για την υγεία, όπως καρδιοπροστατευτική δράση και βελτίωση της υπέρτασης και των αρθρικών ισχυαλγιών (Sijtsma & De Swaaf 2004).

Καροτενοειδή κυρίως από φύκη χρησιμοποιούνται ως χρωστικές, αλλά και για την ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση (ασταξανθίνη, φουκοξανθίνη κ.ά). Φαινολικά όπως οι φλωροταννίνες από τα φαιοφύκη εμφανίζουν επίσης αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων.

Ακόμη, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία θαλάσσιας προέλευσης, όπως σίδηρος, ιώδιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρος βρίσκουν πολλές εφαρμογές.

Ιδιαίτερο παράδειγμα στον τομέα των καλλυντικών αποτελεί η χρήση των

ψευδοπτεροσινών ως προσθετικά σε δερμοκαλλυντικά προϊόντα. Πρόκειται για διτερπενικούς γλυκοσίδες από το μαλακό κοράλλι *Pseudopterogorgia elisabethae* που εμφανίζουν αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση.

- **Ως αντιβιοεπιστρωτικοί παράγοντες**

Η βιοεπίστρωση αναφέρεται στην εγκατάσταση και συσσώρευση οργανισμών σε εμβαπτισμένες στο νερό επιφάνειες. Είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που ξεκινά στο θαλάσσιο περιβάλλον με τη δημιουργία βιοϋμενίου αποτελούμενο κυρίως από μικροοργανισμούς και μικροφύκη, στο οποίο εποικίζουν στη συνέχεια μακροφύκη και ασπόνδυλα καταλήγοντας σε μια σύνθετη κοινωνία αποτελούμενη από χιλιάδες οργανισμούς (Satheesh et al. 2016). Η βιοεπίστρωση έχει σημαντικές οικολογικές και οικονομικές συνέπειες κυρίως στον τομέα της ναυσιπλοΐας. Η ανάγκη για εύρεση φιλικών προς το περιβάλλον ουσιών που αναστέλλουν την βιοεπίστρωση έχει έρθει στο προσκήνιο τα τελευταία χρόνια, ειδικότερα λόγω της περιβαλλοντικής ρύπανσης που έχει προκληθεί από τοξικά μόρια με αντιβιοεπιστρωτική δράση που χρησιμοποιούνταν στα υφαλοχρώματα.

Στη φύση πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί δεν αντιμετωπίζουν πρόβλημα βιοεπίστρωσης κυρίως λόγω της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Wahl 1997). Λαμβάνοντας αυτό υπόψη, πολλά θαλάσσια φυσικά προϊόντα από σπόγγους, φύκη, βρυόζωα και πληθώρα μικροοργανισμών, δοκιμάζονται ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

- **Ως πειραματικά και διαγνωστικά εργαλεία**

Τα ένζυμα *Taq* πολυμεράση και *Pfu* είναι DNA πολυμεράσες που απομονώθηκαν από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και το αρχαίο θερμοφίλο *Pyrococcus furiosus*, αντίστοιχα. Βρίσκουν και τα δυο εφαρμογή στην μοριακή τεχνική PCR (Mullis & Faloona 1987, Cline et al. 1996).

Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) από τη μέδουσα *Aequorea victoria* βρίσκει εφαρμογές στη βιολογία, στη μικροσκοπία φθορισμού ως μοριακός δείκτης και γονίδιο αναφοράς. Για παρόμοιους σκοπούς χρησιμοποιούνται και χρωστικές, όπως η φυκοερυθρίνη.

Στο αίμα του αρθροπόδου *Limulus polyphemus* υπάρχει ένα συστατικό πρωτεϊνικής φύσης το οποίο προκαλεί πήξη του αίματος όταν έρχεται σε επαφή με ενδοτοξίνες Gram-αρνητικών βακτηρίων. Το LAL test (Limulus Amoebocyte Lysate

test) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας ενδοτοξινών σε προϊόντα ιατρικής και φαρμακευτικής χρήσης. Τέλος, τοξίνες θαλάσσιας προέλευσης χρησιμοποιούνται για την μελέτη του νευρικού συστήματος (Lindequist 2016).

1.5. Φύκη

1.5.1. Γενικά

Τα φύκη αποτελούν μια μεγάλη, ετερογενή και πολυφυλετική ομάδα σχετικά απλών στην οργάνωση οργανισμών. Είναι αυτότροφοι, υδρόβιοι ή ημιυδρόβιοι και χαρακτηρίζονται από έλλειψη αγγειώδους διαφοροποίησης που οδηγεί σε σύνθετες ανατομικές δομές. Το φυτικό σώμα ονομάζεται θαλλός (thallus) και στερούνται εξωτερικής διαμόρφωσης σε ρίζα, βλαστό και φύλλα (Γαλάτης et al. 1998).

Παρουσιάζουν διαφοροποίηση από τα ανώτερα φυτά και ως προς τα αναπαραγωγικά όργανα, καθώς στερούνται του προστατευτικού καλύμματος από άγονα κύτταρα που περιβάλλει τους αναπτυσσόμενους γαμέτες. Αναπαράγονται αγενώς, βλαστικά ή με σπόρια και εγγενώς.

Η εξωτερική μορφολογία ποικίλει από σφαιρικά μεμονωμένα κύτταρα (κινητά ή ακίνητα), αποικιακές μορφές, νηματοειδείς (διακλαδιζόμενες και μη διακλαδιζόμενες) και θαλλοειδείς μορφές, οι οποίες και θεωρούνται οι πλέον διαφοροποιημένες μέσα στα φύκη.

Όσον αφορά την εξέλιξη και τη συστηματική κατάταξη των φυκών υπάρχουν διάφορες απόψεις. Η ταξινόμηση των φυκών είναι δύσκολη, λόγω της ποικιλομορφίας στη μορφολογία, στη χημεία τους (π.χ. χρωστικές) και τις αναπαραγωγικές λειτουργίες. Οι διαφοροποιήσεις που παρουσιάζονται στη χημεία και στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά αντικατοπτρίζουν τις διαφοροποιήσεις στο γενετικό υπόβαθρο των ταξινομικών ομάδων και συνδέονται με την εξελικτική τους πορεία στην προσαρμογή σε περιβαλλοντικές και βιολογικές πιέσεις (Stengel & Connan 2015). Η ηλεκτρονική μικροσκοπία και η χρήση βιοχημικών και μοριακών αναλύσεων συμβάλλουν στην κατάταξη και αναθεώρηση αρκετών ομάδων.

Σύμφωνα με ένα από τα κλασικά συστήματα ταξινόμησης (Cronquist 1971), τα φύκη διακρίνονται σε επτά αθροίσματα: Chlorophyta (Χλωροφύκη), Chrysophyta (Χρυσοφύκη), Phaeophyta (Φαιοφύκη), Euglenophyta (Ευγληνοφύκη), Cryptophyta (Κρυπτοφύκη), Pyrrhophyta (Πυρροφύκη), Rhodophyta (Ροδοφύκη).

Από αυτά τα αθροίσματα, τα χλωροφύκη, τα φαιοφύκη και τα ροδοφύκη

αποτελούν τα μακροφύκη, ενώ τα υπόλοιπα αθροίσματα συγκαταλλέγονται στα μικροφύκη.

Ένα χαρακτηριστικό όλων των φυκών είναι ότι χρησιμοποιούν τη χλωροφύλλη α ως φωτοσυνθετική χρωστική. Παρόλο που η φωτοσύνθεση λαμβάνει χώρα πάντα με την χλωροφύλλη α, η εξαιρετική ποικιλία χρωστικών στα πλαστίδια συνδέεται με αντίστοιχη ποικιλία προϊόντων μεταβολισμού και προσδίδει στις διάφορες ομάδες των φυκών χαρακτηριστικό χρωματισμό.

Από οικολογική άποψη τα φύκη αποτελούν τους πλέον εξαπλωμένους φωτοσυνθετικούς οξυγονοπαραγωγούς οργανισμούς και απαντούν σχεδόν παντού. Βρίσκονται σε θάλασσες, λίμνες, ποταμούς, επιπλέοντα ως φυτοπλαγκτόν ή βενθικά σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων όπως υδρόβια φυτά, βράχοι και άμμος. Απαντώνται και ως εδαφικά να εποίκουν το έδαφος, κορμούς δέντρων και βράχους, ιδιαίτερα σε υγρές περιοχές, σχηματίζοντας μεγάλους πληθυσμούς, συνήθως ορατούς με γυμνό οφθαλμό, με τη μορφή λεπτής επικάλυψης. Μερικά ζουν συμβιωτικά με άλλους οργανισμούς, ζωικούς ή φυτικούς. Πολλές φορές ζουν σε δυσμενείς συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, νερά με υψηλή αλατότητα, ή σε μεγάλα βάθη όπου η ένταση του φωτός είναι πολύ χαμηλή.

Η σημασία των φυκών είναι πολύ μεγάλη στην πρωτογενή παραγωγή οργανικού υλικού και στην οξυγόνωση των νερών. Ως πηγή τροφής από τους ζωικούς οργανισμούς, πέρα από τα ίδια τα φύκη, χρησιμοποιούνται και πολλά προϊόντα (αμινοξέα, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες) που αυτά εκκρίνουν στο περιβάλλον.

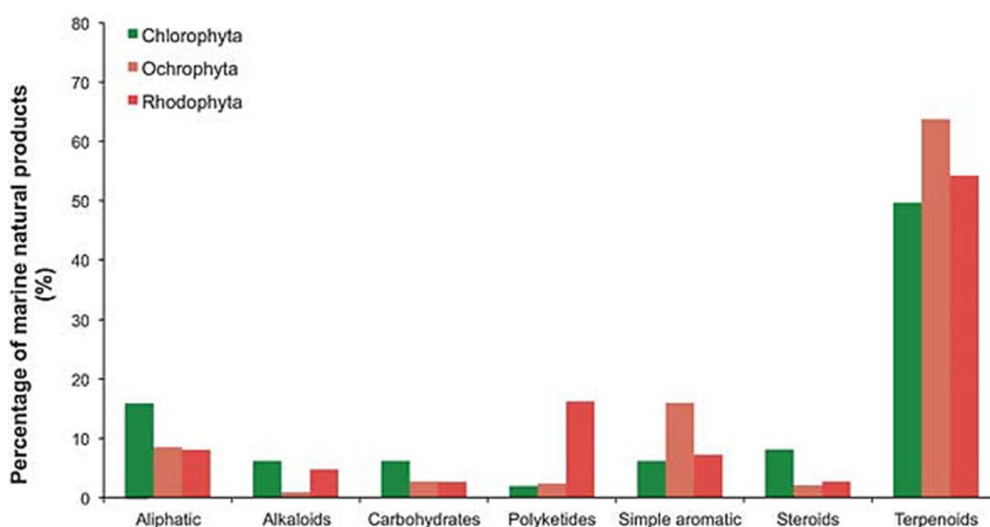
Εκτός της βιολογικής τους σημασίας, τα φύκη έχουν και πολύ μεγάλη εμπορική σημασία. Πολλά είδη μακροφυκών έχουν χρησιμοποιηθεί σαν τροφή από τον άνθρωπο, κυρίως στις χώρες της Ασίας. Τα ροδοφύκη και τα φαιοφύκη αποτελούν πηγή υδροκολλοειδών (καρραγενάνη, άγαρ, αλγινικά άλατα) που βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών. Επιπλέον, οι αποθέσεις των πυριτικών κελυφών νεκρών διατόμων, γνωστές και ως «γη διατόμων» βρίσκουν χρήσεις σε πολλές βιομηχανίες. Ακόμη, πολλά φύκη χρησιμοποιούνται σε εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού και ως βιολογικοί δείκτες περιβαλλοντικής μόλυνσης.

1.5.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες μακροφυκών

Ως προς το χημικό τους προφίλ, τα μακροφύκη παράγουν μια μεγάλη ποικιλία απλών και πιο πολύπλοκων φυσικών προϊόντων, πολλά από τα οποία έχουν λειτουργικό ρόλο για τον παραγωγό οργανισμό.

Στα μακροφύκη, κυρίως στο άθροισμα των ροδοφυκών, συναντάμε πολυαλογονωμένα μόρια, τα οποία πιθανώς συντίθενται για να διευκολύνουν την περιβαλλοντική προσαρμογή του οργανισμού, παρέχοντας προστασία και βοηθώντας τον να ανταπεξέλθει στον ανταγωνισμό και τη θήρευση (Stengel & Connan 2015). Η αφθονία των αλογονωμένων μορίων αντανακλά την διαθεσιμότητα των ιόντων χλωρίου και βρωμίου στο θαλασσινό νερό και παρόλο που το χλώριο εντοπίζεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, το βρώμιο χρησιμοποιείται περισσότερο από τα φύκη για την παραγωγή αλογονωμένων οργανικών ενώσεων (Cabrita et al. 2010). Πιο σπάνιες είναι οι δομές με ιώδιο ή φθόριο (Neumann et al. 2008). Σχεδόν το 60% των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων από τα μακροφύκη ανήκει στην χημική κατηγορία των τερπενίων (Leal et al. 2013), ενώ η «κυριαρχία» των τερπενίων παρατηρείται και στα τρία αθροίσματα (Εικ. 7). Αντίθετα, οι αζωτούχες δομές, όπως πεπτίδια και αλκαλοειδή, είναι πιο σπάνιες.

Ωστόσο, κάθε άθροισμα τείνει να έχει το δικό του ξεχωριστό χημικό προφίλ. Τα ροδοφύκη ενδεχομένως να είναι το άθροισμα με την πιο πλούσια χημεία ως προς την αφθονία και ποικιλία χημικών δομών. Πιο συγκεκριμένα, περίπου το 50% των φυσικών προϊόντων από μακροφύκη έχει απομονωθεί από τα ροδοφύκη (Leal et al. 2013). Επιπλέον, πάνω από το 70% των απομονωμένων φυσικών προϊόντων από ροδοφύκη περιέχουν αλογόνα (βρώμιο, χλώριο και ιώδιο), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στα χλωροφύκη και φαιοφύκη είναι 11% και 4%, αντιστοίχως (Harper et al. 2001). Η πλειοψηφία της χημείας των ροδοφυκών εντοπίζεται στην οικογένεια Rhodomelaceae με περίπου το 85% να προέρχεται από το γένος *Laurencia* (Maschek & Baker 2008).



Εικόνα 7. Κατανομή των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων από τα αθροίσματα των μακροφυκών σε χημικές κατηγορίες. Οι χημικές ομάδες που παρουσιάζονται αποτελούν το 95% των θαλάσσιων προϊόντων από φύκη (Leal et al. 2013).

1.5.3. Ροδοφύκη

Τα ροδοφύκη είναι μια εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα. Τα περισσότερα είναι θαλάσσια και μάλιστα των θερμών περιοχών, σπανιότερα απαντώνται στα γλυκά νερά. Εκμεταλλεύονται με τα χρωμοφόρα τους, κυρίως με τη φυκοερυθρίνη, το μικρό μήκους κύματος φως και γι' αυτό πολλά είδη αναπτύσσονται σε μεγαλύτερα βάθη σε σχέση με άλλα μακροφύκη (Cole & Sheath 1990). Χρωστικές που συναντώνται στα ροδοφύκη είναι οι χλωροφύλλες α και δ, τα καροτένια α και β, οι ξανθοφύλλες και οι φυκομπιλίνες (φυκοκυανίνη, φυκοερυθρίνη).

Επί του παρόντος, υπάρχουν περισσότερα από 7.000 αναγνωρισμένα είδη σε αυτό το άθροισμα, αριθμός μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο στα φαιφύκη και χλωροφύκη (Guiry & Guiry 2017). Πάνω από 400 είδη ροδοφυκών χαρακτηρίζονται ως «κοραλλιοειδή» φύκη, μια ομάδα που έχει την ιδιότητα της απασβέστωσης του θαλλού. Πολλά δε από αυτά υφίστανται τέτοια απασβέστωση, ώστε να εκλαμβάνονται εσφαλμένα ως κοράλλια.

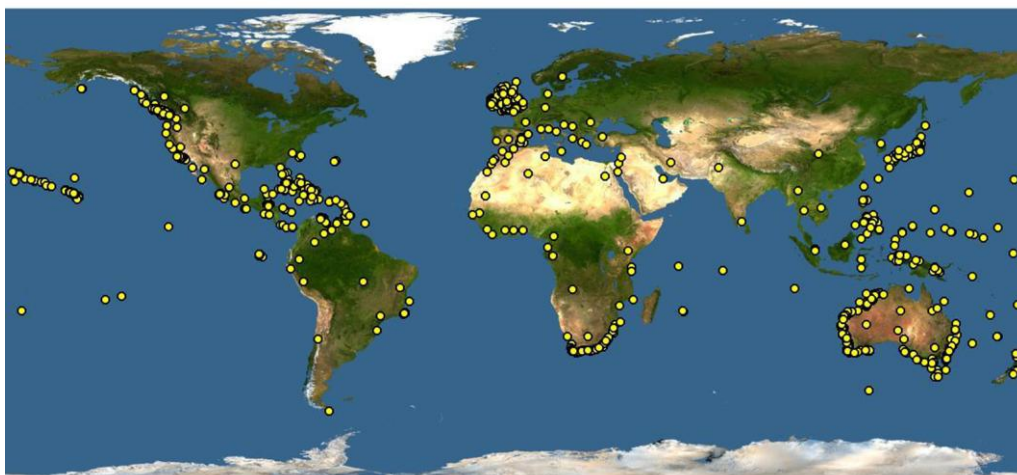
Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ροδοφυκών είναι ότι κατά την αναπαραγωγή ουδέποτε σχηματίζονται μαστιγοφόρα κύτταρα, ενώ εμφανίζουν πολύπλοκους κύκλους ζωής.

1.6. Το γένος *Laurencia*

Τα είδη του γένους *Laurencia* έχουν θαλλό κατά συστάδες, διακλαδισμένο, χρώματος ρόδινου έως και ελαιοπράσινου, ύψους 5-15 cm. Ο κύριος άξονας είναι κυλινδρικός, σαρκώδης, με πλάγιους κλάδους και κλαδίσκους, πυκνούς στα ανώτερα τμήματα του θαλλού που διαιρούνται σε κοντά μικροκλάδια.

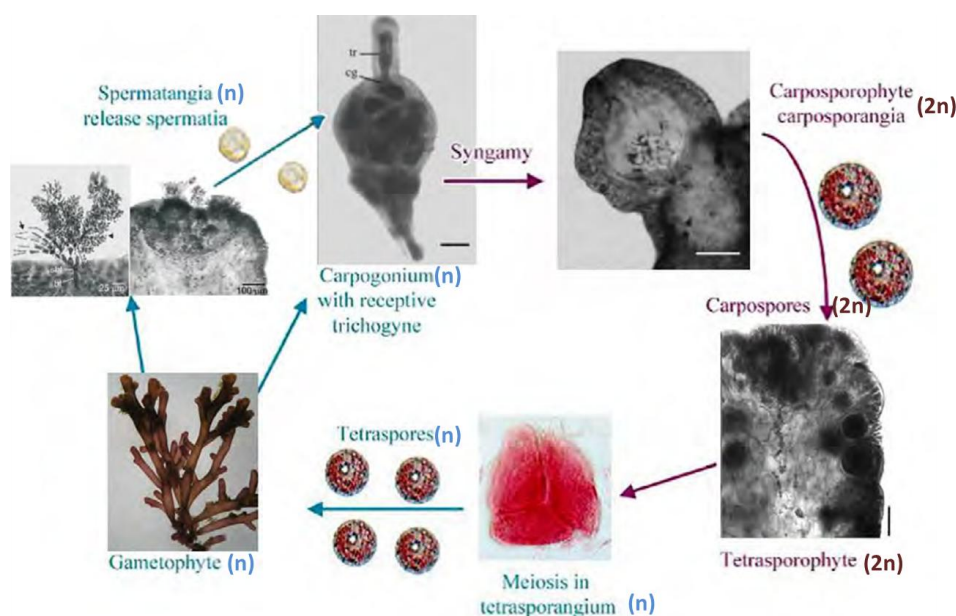
Είναι βενθικό γένος και αναπτύσσεται σε βραχώδεις ακτές στην ευπαράλια περιοχή και στο βυθό ως επίφυτο επί άλλων φυκών. Απαντάται σε βάθη ως τα 65 m. Είναι κοσμοπολίτικο και εντοπίζεται κυρίως στις τροπικές και εύκρατες περιοχές (McDermid 1988). Η παγκόσμια εξάπλωσή του φαίνεται στην Εικ. 8.

Παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, η θερμοκρασία, η αλατότητα των νερών και ο φωτοπεριοδισμός, μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό ανάπτυξης του φύκου. Υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να σχηματίσει πυκνούς πληθυσμούς και «δάση» στα οποία βρίσκουν καταφύγιο πολλοί ζωϊκοί οργανισμοί (Harizani et al. 2016). Εκτός από καμουφλάζ χρησιμεύει και ως πηγή τροφής για μια μερίδα οργανισμών που δεν επηρεάζονται από το χημικό «οπλοστάσιο» της *Laurencia*.



Εικόνα 8. Εξάπλωση του γένους *Laurencia*.

Τα είδη του γένους *Laurencia* αναπαράγονται εγγενώς και έχουν τριφασικούς ισομορφικούς βιολογικούς κύκλους. Πιο συγκεκριμένα, ο τριφασικός βιολογικός κύκλος περιλαμβάνει το απλοειδές γαμετόφυτο (αρσενικό ή θηλυκό φυτό), το διπλοειδές καρποσποριόφυτο, το οποίο είναι συνήθως προσκολλημένο στο θηλυκό γαμετόφυτο και το διπλοειδές τετρασποριόφυτο (Francis 2014). Ο χαρακτηρισμός «ισομορφικός» προκύπτει από το γεγονός ότι το τετρασποριόφυτο είναι μορφολογικά όμοιο με το καρποσποριόφυτο και τα γαμετόφυτα. Ο κύκλος του γένους *Laurencia sensu stricto* και η εναλλαγή των τριών γενεών φαίνεται στην Εικ. 9.



Εικόνα 9. Κύκλος ζωής του γένους *Laurencia s.s.*

Με μπλε βέλη φαίνονται τα απλοειδή στάδια και με τα μωβ τα διπλοειδή (Τροποποιημένη εικόνα από Francis 2014).

Στην εικόνα του κορπογονίου tr= τριχογόνιο & cg = καρπογόνιο

1.6.1. Ταξινόμηση και το «σύμπλεγμα» *Laurencia*

Το γένος *Laurencia* σήμερα περιλαμβάνει 145 είδη (Guiry & Guiry 2017). Ανήκει στην τάξη Ceramiales, οικογένεια Rhodomelaceae, ομάδα Laurencieae. Η συστηματική του κατάταξη φαίνεται στον Πίν. 1.

Πίνακας 1. Η συστηματική κατάταξη του γένους *Laurencia*.

Βασίλειο: Plantae
Άθροισμα: Rhodophyta
Κλάση: Rhodophyceae
Υποκλάση: Florideophycideae
Τάξη: Ceramiales
Οικογένεια: Rhodomelaceae
Ομάδα: Laurencieae
Γένος: <i>Laurencia</i>

Το όνομα του γένους αποδόθηκε από τον Lamouroux το 1813 προς τιμήν του φίλου του M. de Lalaurencie, ενός αξιωματικού του πολεμικού ναυτικού και λάτρη των φυσικών επιστημών. Η αρχική περιγραφή του Lamouroux (1813) αφορούσε μόνο οχτώ είδη. Η ετερογένεια του γένους διαπιστώθηκε σε μεταγενέστερες μελέτες που οδήγησαν στην επαναξιολόγηση της ομάδας και στην περαιτέρω διάσπασή της τελικά σε έναν αριθμό διακριτών γενών που αποτελούν πλέον το «σύμπλεγμα» *Laurencia*. Η διάκριση έγινε με βάση ανατομικές διαφοροποιήσεις και αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά (Saito 1967, Nam et al. 1994, Nam 1999), αλλά και φυλογενετικές αναλύσεις βάσει μοριακών δεδομένων (Garbary & Harper 1998, Nam 2006, Martin-Lescanne et al. 2010, Cassano et al. 2012, Metti et al. 2015).

Το «σύμπλεγμα» *Laurencia* είναι σήμερα αποδεκτό ότι αποτελείται από τα εξής επτά γένη: *Laurencia* (*Laurencia sensu stricto*), *Chondrophycus*, *Osmundea*, *Palisada*, *Yuzurua*, *Laurenciella* και *Coronaphycus* (Francis et al. 2017).

Η ταξινόμηση του «συμπλέγματος» *Laurencia* έχει βελτιωθεί σημαντικά με τη συνδυασμένη χρήση της ανατομίας και της γενετικής αλληλουχίας *rbcL* (γονίδιο που κωδικοποιεί τη μεγάλη υπομονάδα του ενζύμου RuBisCO:καρβοξυλάση της 1,5 διφωσφορικής ριβουλόζης) που εκφράζεται στους χλωροπλάστες. Ωστόσο, εξακολουθεί να παρεμποδίζεται από την έλλειψη σαφώς καθορισμένων

χαρακτηριστικών στο επίπεδο του είδους (Francis et al. 2017). Την κατάσταση δυσχεραίνει το γεγονός ότι η πλειονότητα των ειδών στο «σύμπλεγμα» *Laurencia* παρουσιάζει ποικιλότητα ως προς τη μορφολογία (Metti et al. 2015). Ένα παράδειγμα αποτελεί ο πολυμορφισμός ως προς το χρώμα του θαλλού που εμφανίζουν άτομα του γένους *Laurencia*, ακόμα κι όταν αναπτύσσονται στο ίδιο υπόστρωμα (Harizani et al. 2016). Αυτές οι δυσκολίες αναγνώρισης ενδέχεται να αποτελέσουν ένα σημαντικό εμπόδιο λαμβάνοντας υπόψη τον αυξανόμενο αριθμό μελετών σχετικά με τα φυσικά προϊόντα και τις χημικές ιδιότητες της *Laurencia*.

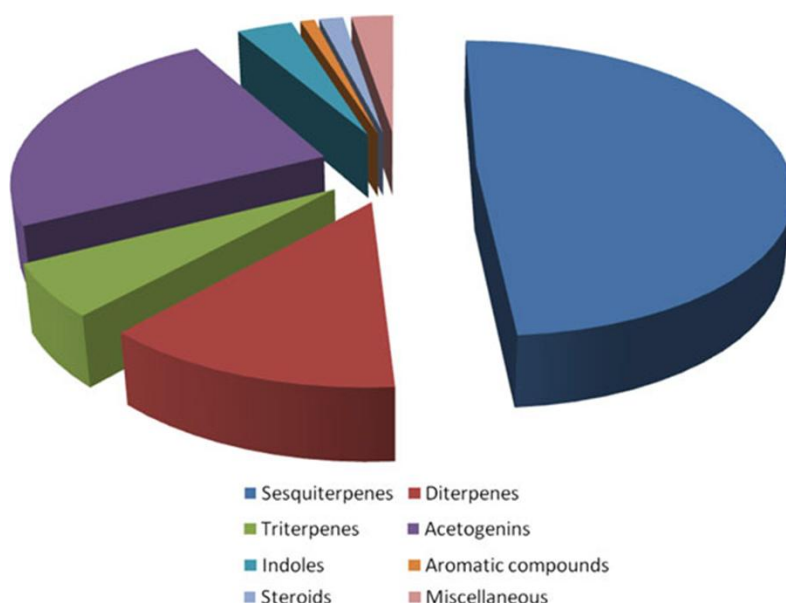
1.6.2. Δευτερογενείς μεταβολίτες του γένους *Laurencia*

Το γένος *Laurencia* έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς το χημικό προφίλ του για πάνω από μισό αιώνα και παρόλα αυτά εξακολουθεί να αποτελεί μια αστείρευτη πηγή δευτερογενών μεταβολιτών (Cabrita et al. 2010). Για τη χημική ποικιλομορφία της *Laurencia*, που μπορεί να παρατηρηθεί ακόμη και εντός μορφολογικά ίδιων πληθυσμών, έχουν γίνει πολλές έρευνες χωρίς να έχει εξαχθεί ομόφωνο συμπέρασμα. Πιθανοί παράγοντες που θα μπορούσαν να εξηγήσουν το φαινόμενο αυτό ενδεχομένως να σχετίζονται με το γενετικό υπόβαθρο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Harizani et al. 2016).

Η ανάγκη για προστασία από τη θήρευση έχει οδηγήσει στη βιοσύνθεση πολύπλοκων δευτερογενών μεταβολιτών. Αν και η ύπαρξη χημικής άμυνας αναχαιτίζει πολλά από τα θαλάσσια ασπόνδυλα, μερικά τρέφονται εκλεκτικά με *Laurencia*, χωρίς να επηρεάζονται από τα βιοδραστικά μόρια. Υπάρχουν περιπτώσεις που αυτοί οι μεταβολίτες, μέσω της τροφικής αλυσίδας περνούν και χρησιμοποιούνται από τα μαλάκια που τρέφονται με φύκη του γένους *Laurencia*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα γαστερόποδα του γένους *Aplysia*, που αποτελούν και τους κύριους θηρευτές της *Laurencia* (Kladi et al. 2014). Οι «λαγοί της θάλασσας» όπως αλλιώς λέγονται, φαίνεται να συσσωρεύουν τους βιοδραστικούς μεταβολίτες από αυτή και από τα άλλα φύκη με τα οποία τρέφονται, και να τους χρησιμοποιούν για τη δική τους χημική προστασία είτε άμεσα είτε έπειτα από μικρές δομικές τροποποιήσεις (Rogers et al. 2000, Harizani et al. 2016).

Η πλειοψηφία των μεταβολιτών που έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Laurencia* και των γαστερόποδων που τρέφονται από αυτά ανήκει στις χημικές κατηγορίες των τερπενίων, με τα σεσκιτερπένια να αφθονούν, και των C₁₅ ακετογενινών. Σε μικρότερο βαθμό έχουν απομονωθεί ινδολοπαράγωγα, αρωματικά

μόρια και στεροειδή. Η κατανομή των μεταβολιτών στις διάφορες χημικές κατηγορίες φαίνεται στην Εικ. 10.



Εικόνα 10. Κατανομή των μεταβολιτών από το γένος *Laurencia* σε χημικές κατηγορίες (Harizani et al. 2016).

Κοινό χαρακτηριστικό των περισσότερων δευτερογενών μεταβολιτών του γένους *Laurencia*, ασχέτως χημικής κατηγορίας, είναι η παρουσία αλογόνων η οποία σχετίζεται και με ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις. Κατά κύριο λόγο τα μόρια αυτά μπορεί να έχουν ένα ή δυο άτομα βρωμίου, ή ένα βρώμιο και ένα χλώριο. Πιο σπάνια συναντάται και ιώδιο (Harizani et al. 2016). Οι αλογονωμένοι μεταβολίτες φαίνεται να βιοσυσσωρεύονται σε ενδοκυτταρικά οργανίδια που ονομάζονται “*corps en cerise*” (ή cherry body). Είναι μεμβρανο-συνδεδεμένα κυστίδια (membrane-bound vesicles), σφαιρικού, νεφροειδούς έως ροπαλοειδούς σχήματος και εντοπίζονται κυρίως στα κύτταρα του φλοιού του θαλλού και στους τριχοβλάστες (Fujii et al. 2012). Η παραγωγή και αποθήκευση των αλογονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με αυτά τα οργανίδια. Στις περιπτώσεις που δεν παρατηρούνται τα “*corps en cerise*” στα δείγματα, δεν ανιχνεύονται αλογονωμένοι μεταβολίτες (Suzuki & Kurosawa 1979, Suzuki et al. 1987, Vairappan et al. 2001).

Ακολουθούν παραδείγματα από τις κυριότερες κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από το γένος *Laurencia*.

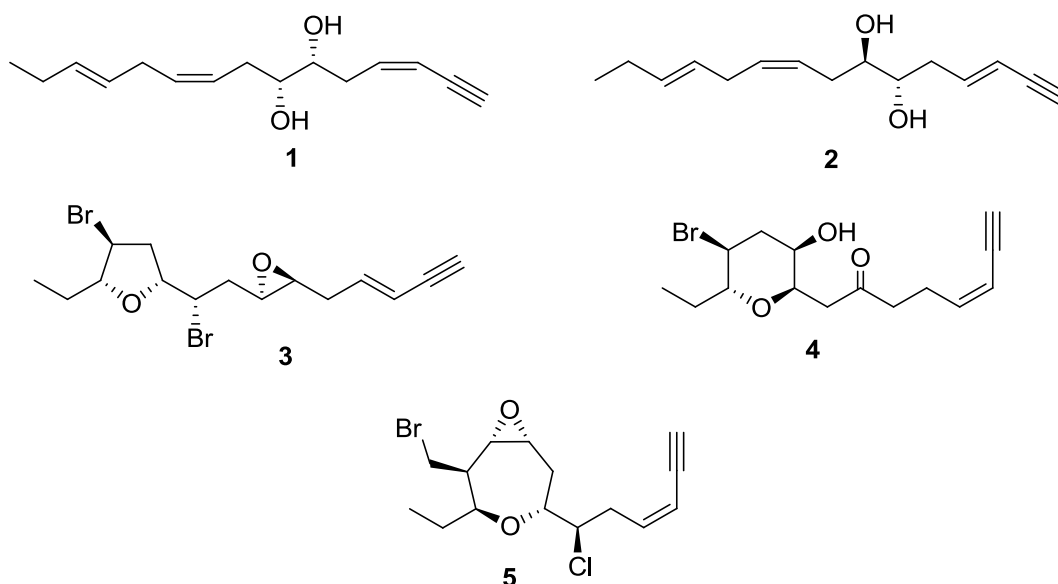
- **Μη τερπενικοί C₁₅ κυκλικοί αιθέρες (C₁₅ ακετογενίνες)**

Οι ακετογενίνες είναι ως επί το πλείστον αλογονωμένες και γενικά πιστεύεται

ότι προέρχονται από ένα κοινό C₁₅ πρόδρομο, προερχόμενο από ένα C₁₆ λιπαρό οξύ (Wang et al. 2013). Οι ακετογενίνες αναγνωρίζονται ως χημειοταξινομικοί δείκτες για τα ροδοφύκη της οικογένειας Rhodomelaceae, και συγκεκριμένα του γένους *Laurencia* (Stout & Kubanek 2010).

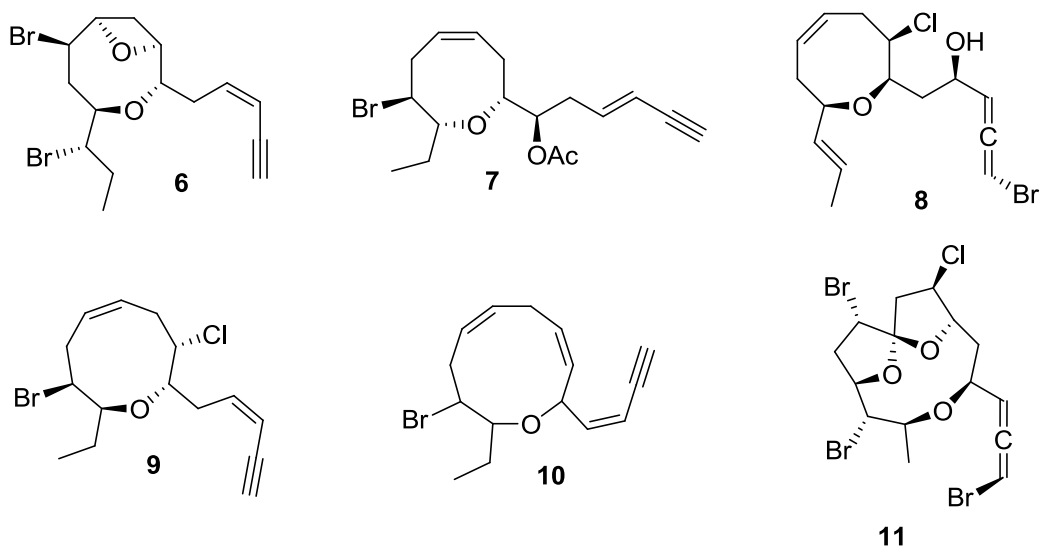
Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται ενώσεις γραμμικές ή με διαφορετικού μεγέθους αιθερικούς δακτυλίους που συνήθως διαθέτουν μια συζευγμένη βινυλοακετυλενική ή αλλυλική πλευρική αλυσίδα. Οι περισσότερες είναι αλογονωμένες με το βρώμιο να κυριαρχεί σαν ετεροάτομο.

Τα γραμμικά μόρια *cis* και *trans* λαουρεδιόλη (laurediol) (1) και (2), αντίστοιχα, που έχουν απομονωθεί από τη *Laurencia nipponica* (Kurosawa et al. 1972) φαίνεται να αποτελούν βιοσυνθετικά πρόδρομες ενώσεις για αρκετές ακετογενίνες. Η πλειοψηφία όμως των ακετογενινών από *Laurencia* spp. είναι κυκλικοί αιθέρες. Έχουν απομονωθεί ενώσεις με τετραϋδροφουρανικό δακτύλιο, όπως το λαουρεεποξίδιο (laureepoxide) (3) (Fukuzawa & Kurosawa 1980), και με τετραϋδροπυρανικό δακτύλιο, όπως η σκανλονενίνη (skanlonenyne) (4) από τη *Laurencia obtusa* (Suzuki et al. 1997). Στις ακετογενίνες με επταμελή αιθερικό δακτύλιο ξεχωριστό παράδειγμα αποτελούν οι ροτζιολενίνες, όπως η ροτζιολενίνη Α (rogioleenyne A) (5) (Guella & Pietra, 1991) που εμφανίζουν διακλαδισμένη ανθρακική αλυσίδα, σε αντίθεση με την ενιαία που έχουν οι υπόλοιπες C₁₅ ακετογενίνες.

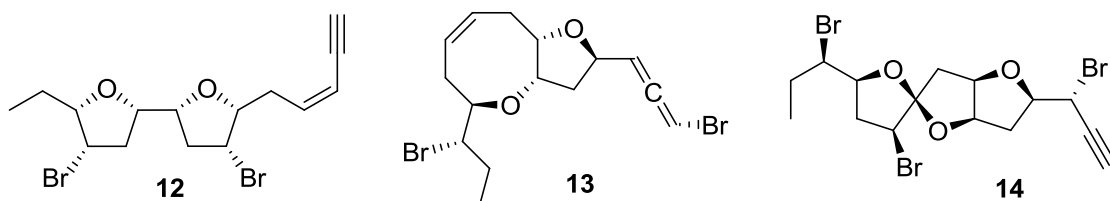


Η πλειοψηφία των ενώσεων αποτελείται από οκταμελείς κυκλικούς αιθέρες, οι οποίοι χωρίζονται σε δύο γενικές κατηγορίες τα λαουρενάνια (laurenane), όπως η

λαουρεατίνη (laureatin) (**6**) (Irie et al. 1968a) και τα λαουθισάνια (lauthisane), όπως η λαουρενσίνη (laurencin) (**7**) (Irie et al. 1965, Irie et al. 1968b) και το μαριλζαλλένιο (marilzallene) (**8**) από τη *Laurencia marilzae* (Gutiérrez-Cepeda et al. 2011). Σε μικρότερο βαθμό έχουν απομονωθεί μόρια με εννιαμελή αιθερικό δακτύλιο, όπως η ομπτουςενίνη (obtusenyne) (**9**) που ήταν και η πρώτη εννιαμελής ακετογενίνη που απομονώθηκε από τη *L. obtusa* (King et al. 1979, Howard et al. 1980), ενώ υπάρχει μια μόνο ένωση με δεκαμελή δακτύλιο (**10**) κι έχει απομονωθεί από τη *Laurencia implicata* (Coll & Wright 1989). Το ομπτουςαλλένιο V (obtusallene V) (**11**) (Guella et al. 2000) ανήκει σε μία ιδιαίτερη υποκατηγορία ακετογενινών, γνωστή με το όνομα ομπτουςαλλένια, η οποία περιλαμβάνει δωδεκαμελείς κυκλικούς αιθέρες με αλλυλική πλευρική αλυσίδα.



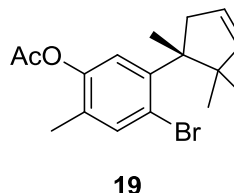
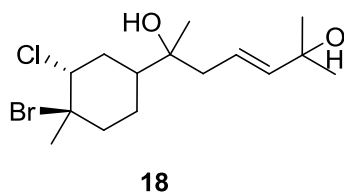
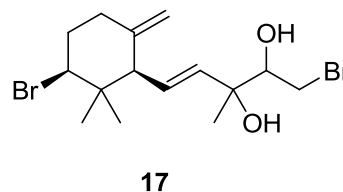
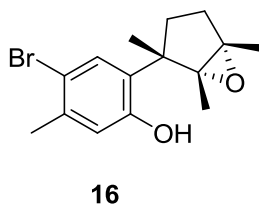
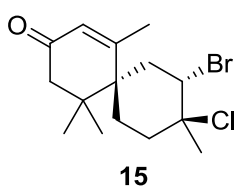
Επιπλέον, έχουν απομονωθεί και πολυκυκλικές ακετογενίνες με διάφορους συνδιασμούς δακτυλίων, όπως οι δικυκλικές ελατενίνη (elatenyne) (**12**) (Hall & Reiss 1986, Ji et al. 2007a) και το λαουραλλένιο (laurallene) (**13**) (Fukuzawa & Kurosawa 1979) και η τρικυκλική ομπτουςίνη (obtusin) (**14**) (Howard et al. 1979) που έχει μια βρωμοπροπαργιλική τελική ομάδα.



ο Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια είναι η μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από το γένος *Laurencia* και τα μαλάκια που τρέφονται από τα φύκη του γένους.

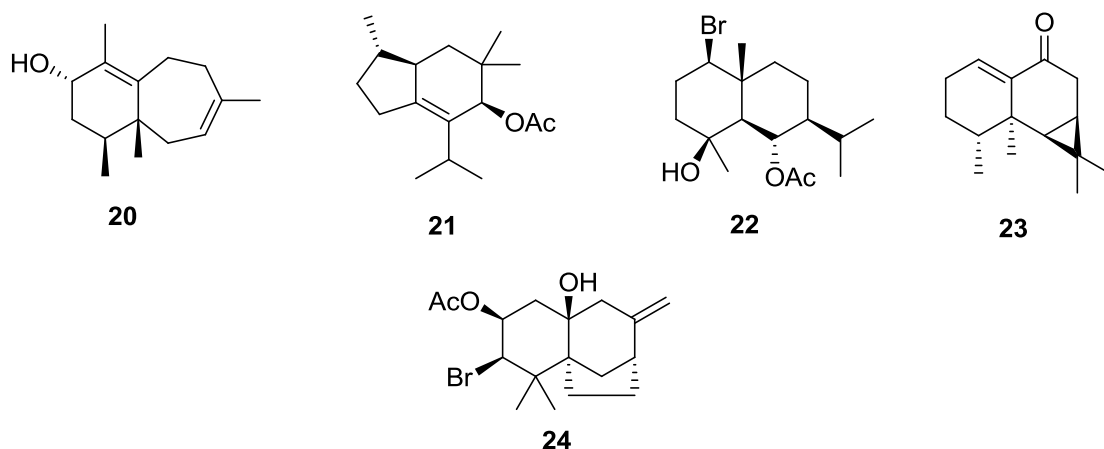
Πολύ συχνά απαντώνται σεσκιτερπένια με σκελετό τσαμιγκρανίου (chamigrane), όπως η λαουρενσενόνη D (laurencenone D) (**15**) (Kennedy et al. 1988) που συγκαταλέγεται στα α-τσαμιγκρένια (α-chamigrene). Το λαουρεποξυένιο (laurepoxylene) (**16**) (Yu et al. 2014) από τη *Laurencia okamurai* ανήκει σε μια επίσης πολυπληθή κατηγορία, τα λαουρανικού τύπου σεσκιτερπένια. Επίσης, έχουν απομονωθεί μόρια με σκελετούς σνυδερανίου (snyderane) και μπισαμπολανίου (bisabolane) όπως τα μόρια (**17**) (Su et al. 2009) και (**18**) (Norte 1992) από τη *Laurencia similis* και *Laurencia caespitosa*, αντίστοιχα. Με περαιτέρω κυκλοποίηση του μπισαμπολανικού σκελετού προκύπτουν τα κουπαράνια (cuparane), όπως η κουπαλαουρενόλη (cupalaurenol) (**19**) που απομονώθηκε αρχικά την *Aplysia dactylomela*, επιδεικνύοντας ιχθυοτοξική δράση (Ichiba & Higa 1986) και στη συνέχεια και από είδη του γένους *Laurencia* (Masuda et al. 2002, Vairappan et al. 2010).



Ακόμη, μια κατηγορία σεσκιτερπενίων είναι τα περφορανικού τύπου (perforane), όπως η περφορενόλη (perforenol) (**20**) που απομονώθηκε αρχικά από τη *Laurencia perforata* (González et al. 1978). Το 4-υδρόξυ-5-μπραζιλένιο (4-hydroxy-5-brasilene) (**21**) είναι ένα παράδειγμα τερπενίου με σκελετό μπραζιλανίου, που έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Laurencia* (Amico et al. 1991, Wright et al. 1991) αλλά και από το γαστερόποδο *Aplysia fasciata* (Ioannou et al. 2009). Το 9-βρώμο-σελίν-4(14),11-διένιο (9-bromo-selin-4(14),11-diene) (**22**), ένα ευδεσμανικού τύπου σεσκιτερπένιο από τη *Laurencia composita*, που εμφάνισε ισχυρή τοξικότητα έναντι

στην *Artemia salina* (Li et al. 2012). Πιο σπάνια απαντώνται σεσκιτερπένια με σκελετό αριστολενίου στα οποία συνήθως παρατηρείται απουσία αλογόνων, όπως η αριστολενόλη (aristol-1(10)-en-9 β -ol) (**23**) (Ji et al. 2007b) που έχει δείξει κυτταροτοξική δράση (Sun et al. 2011).

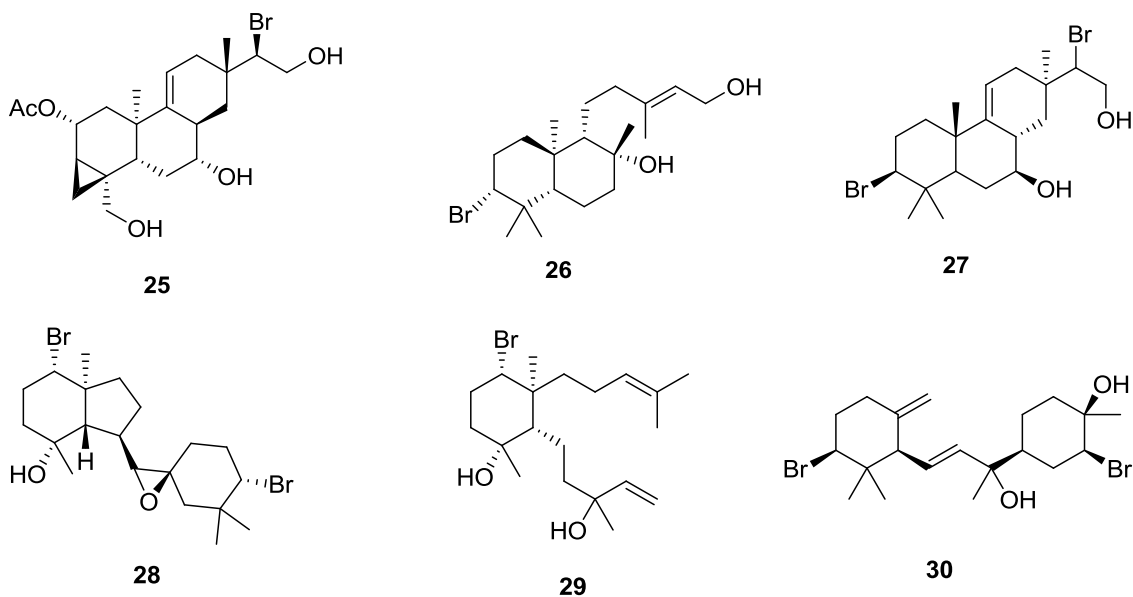
Έχουν απομονωθεί και άλλου τύπου σεσκιτερπένια, μερικές φορές λιγότερο αναμενόμενα για το θαλάσσιο περιβάλλον, όπως η γκουιμαρεδιόλη (guimarediol) (**24**) που αποτελεί ένα από τα πρώτα τρικυκλικά σεσκιτερπένια με σκελετό ομφαλανίου (omphalane) θαλάσσιας προέλευσης (Gonzalez et al. 1984).



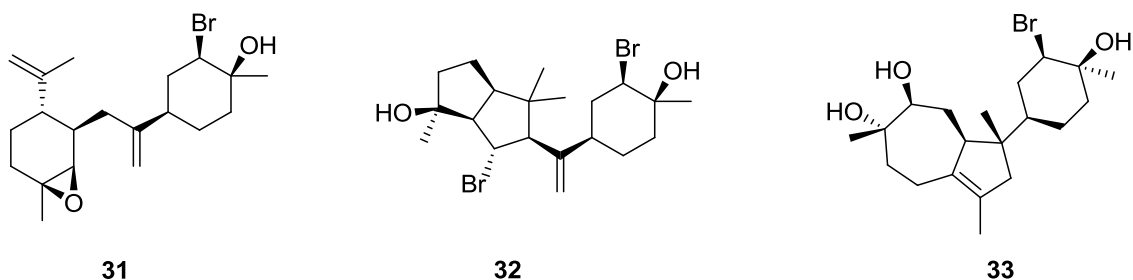
ο Διτερπένια

Στο γένος *Laurencia* απαντώνται διτερπένια τύπου παργκουερανίου (parguerane), όπως η παργκουερόλη (parguerol) (**25**) που απομονώθηκε αρχικά από την *A. dactylomela* (Schmitz et al. 1981) και μετέπειτα από τη *Laurencia saitoi* (Kurata et al., 1998) και εμφάνισε κυτταροτοξική δράση (Schmitz et al. 1982). Αρκετά συχνά απομονώνονται και διτερπένια με σκελετό λαβδανίου (labdane), όπως η απλυσίνη-20 (aplysin-20) (**26**) (Yamamura & Hirata 1971, Suzuki et al. 1988), και πιμαρανίου (pimarane), όπως το πιμαρανικό παράγωγο (**27**) (Gonzalez et al. 1985).

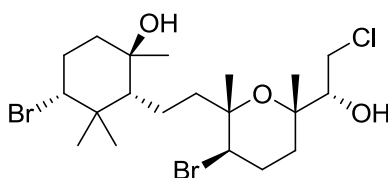
Τα διτερπένια με σκελετό ιριεόλης (irieane), όπως η ιριεόλη Α (irieol A) (**28**) (Fenical et al. 1975), αποτελούν ένα ξεχωριστό παράδειγμα καθώς μέχρι τώρα έχουν απομονωθεί μόνο από είδη του γένους *Laurencia* και των μαλακίων που τρέφονται με αυτό. Η λουζοδιόλη (luzodiol) (**29**) από το φύκος *Laurencia luzonensis* (Kuniyoshi et al. 2005) και η ομπτουςαδιόλη (obtusadiol) (**30**) από τη *L. obtusa* (Howard & Fenical 1978) είναι διτερπένια με σκελετούς δακτυλομελανίου (dactylomelane) και ομπτουςανίου (obtusane), αντιστοίχως.



Ξεχωριστή ομάδα αποτελούν και οι πρεβεζόλες και τα νεοροτζιολιάνια (prevezanes & neorogiolanes) που εμφανίζουν τρεις σπάνιους ανθρακικούς σκελετούς, που έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από είδη του γένους *Laurencia* και μερικές από αυτές έχουν επιδείξει κυτταροτοξική δράση. Η πρεβεζόλη Α (prevezol A) (**31**), η νεοροτζιολδιόλη Β (neorogioldiol B) (**32**) και η πρεβεζόλη D (prevezol D) (**33**), αποτελούν μόρια που έχουν απομονωθεί από τη *L. obtusa* και συγκαταλλέγονται σε αυτή την κατηγορία (Mihopoulos et al. 2001, Ιλιουρούλου et al. 2003).



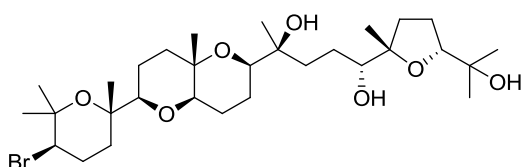
Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες, έχουν απομονωθεί και διτερπένια με σκελετούς πρενυλιωμένων σεσκιτερπενίων, όπως η λαουρενσιανόλη (laurencianol) (**34**) που εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Bacillus subtilis* και της *Escherichia coli* και έχει σκελετό πρενυλιωμένου συνδερανίου (Caccamese et al. 1982).



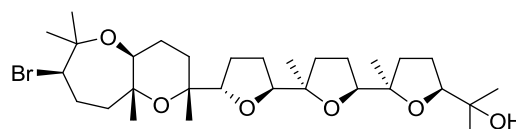
34

ο Τριτερπένια

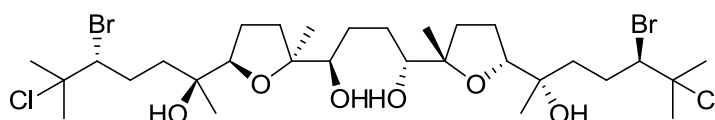
Τα τριτερπένια που έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής από το γένος *Laurencia* είναι κατά κύριο λόγο πολυαιθερικά μόρια με ετεροκυκλικούς δακτυλίους ποικίλου μεγέθους που φαίνεται να είναι παράγωγα σκουαλενίου (Fernández et al. 2000). Η βενουστατριόλη (venustatriol) (**35**) από τη *Laurencia venusta*, εμφανίζει αντιική δράση (Sakemi et al. 1986), ενώ άλλα παραδείγματα είναι η ενσουόλη (enshuol) (**36**) (Matsuo et al. 1995) από τη *Laurencia omaezakiana* και η ιντρικατετραόλη (intricatetraol) (**37**) (Suzuki et al. 1993).



35



36

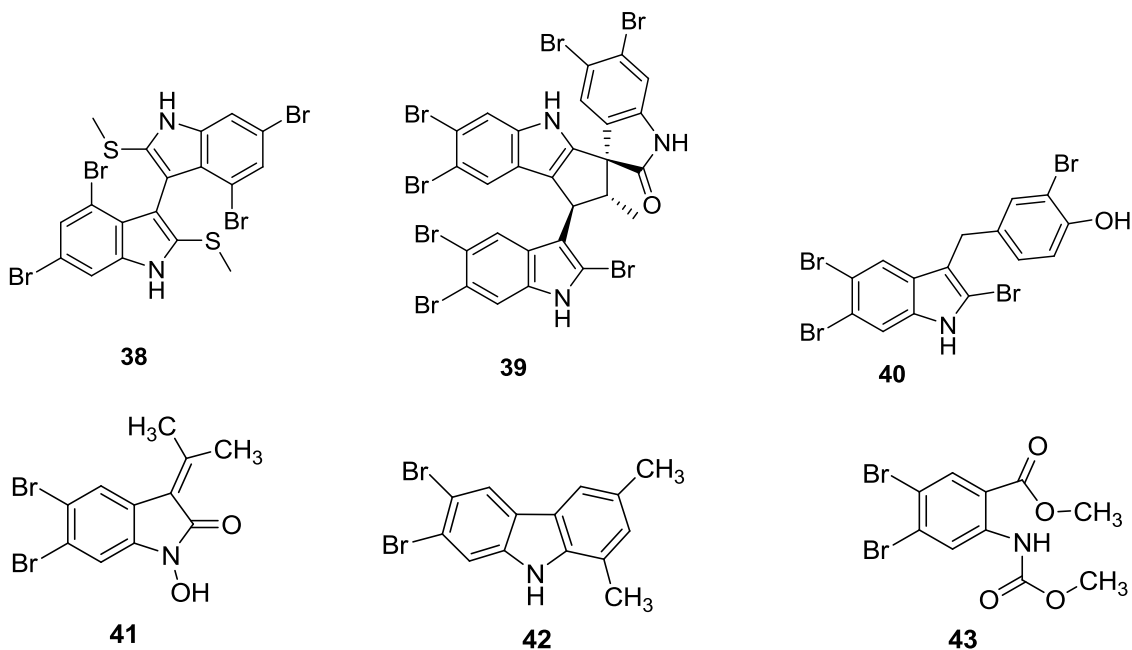


37

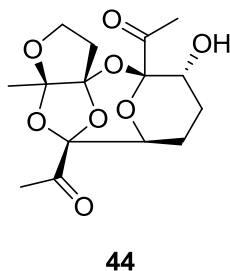
ο Άλλοι μεταβολίτες

Πέρα από τις κατηγορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχουν απομονωθεί και μόρια που δεν συγκαταλέγονται σε αυτές. Από είδη του γένους *Laurencia* έχουν απομονωθεί βρωμιωμένα ινδολικά παράγωγα που μερικές φορές έχουν και θείο στη δομή τους, όπως το μόριο (**38**) (Tanaka et al. 1989). Η σιμιλίσίνη Α (similisine A) (**39**) είναι ένα σπίρο-τρισινδολικό παράγωγο που απομονώθηκε από τη *L. similis* (Sun et al. 2013). Από τη *L. similis* απομονώθηκαν πρόσφατα και αζωτούχες δομές (**40-43**) με αντιβακτηριακή δράση (Li et al. 2016). Το μόριο (**40**) αποτελεί το πρώτο φυσικό προϊόν με σκελετό ινδολίου που φέρει φαινυλομεθυλομάδα σε αυτή τη θέση, ενώ το (**42**) είναι

το πρώτο αλκαλοειδές καρβαζολίου από το γένος *Laurencia*.



Επίσης, έχουν απομονωθεί και μόρια πολυκετιδικής φύσης, όπως η τετρακυκλική πολυακετάλη (**44**) από *Laurencia chilensis* (Bittner et al. 1987), καθώς και αρωματικά παράγωγα, στεροειδή και άλλα (Harizani et al. 2016).



1.7. Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση νέων φυσικών προϊόντων που ενδεχομένως έχουν κάποια βιολογική δράση ή άλλη αξιόλογη εφαρμογή. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε πληθυσμός του είδους *Laurencia glandulifera*.

Από είδη του γένους, για το οποίο υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία, έχει απομονωθεί μέχρι στιγμής αξιόλογος αριθμός μεταβολιτών με βιολογικές δράσεις. Οι επαρκείς πληθυσμοί, καθώς και η δυνατότητα επαναληπτικής συλλογής του

οργανισμού, αφού βρίσκεται σε σχετικά μικρό βάθος, μας οδήγησαν στο να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα. Επιπλέον, ένα από τα κριτήρια επιλογής του συγκεκριμένου οργανισμού ήταν το ενδιαφέρον χημικό προφίλ που παρουσίασε στον προκαταρκτικό έλεγχο με φαρματοσκοπία ^1H NMR και χρωματογραφία TLC.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφο Bruker DRX 400. Τα 2D-NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες ακολουθίες παλμών Bruker. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl_3 . Οι ^1H και ^{13}C NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά την κορυφή του CHCl_3 στα 7.24 και 77.0 ppm, αντίστοιχα, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα μάζας χαμηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS) ή σε φασματογράφο μάζας Thermo LTQ Orbitrap Velos με μέθοδο ιονισμού τον ηλεκτροψεκασμό (ESIMS).

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο: (i) Waters 600 με διπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI Waters 410, (ii) σε χρωματογράφο PHARMACIA LKB Pump 2248 με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI 102 Shodex, (iii) σε χρωματογράφο Agilent 1100 Series με τετραπλή αντλία εισαγωγής συστήματος και ανιχνευτή Agilent RI 1100 Series.

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC ήταν οι ακόλουθες: (i) στήλη κανονικής φάσης Grace, Econoshpere Silica 10u, διαστάσεων 25 cm x 10 mm, (ii) χειρόμορφη στήλη Daicel Chemical Industries Ltd., Chiralcel OD, 10 μm , διαστάσεων 25 cm x 10 mm, (iii) στήλη κανονικής φάσης SUPELCO Supelcosil SPLC-Si 5 μm , διαστάσεων 250 mm x 10 mm, (iv) στήλη κανονικής φάσης SUPELCO Supelcosil LC-SI SEMI PREP 5 μm , διαστάσεων 250 mm x 10 mm.

Η συμπύκνωση των υπολειμμάτων και των κλασμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-200 σε θερμοκρασία έως 38°C.

2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας με υποβοήθηση

κενού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60H της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60A flash (35-70 μM) της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου κανονικής φάσης (SiOH) τύπου SEP-PAK silica cartridge for rapid sample preparation της εταιρείας Waters Associates ή Chromafix της εταιρείας Macherey-Nagel.

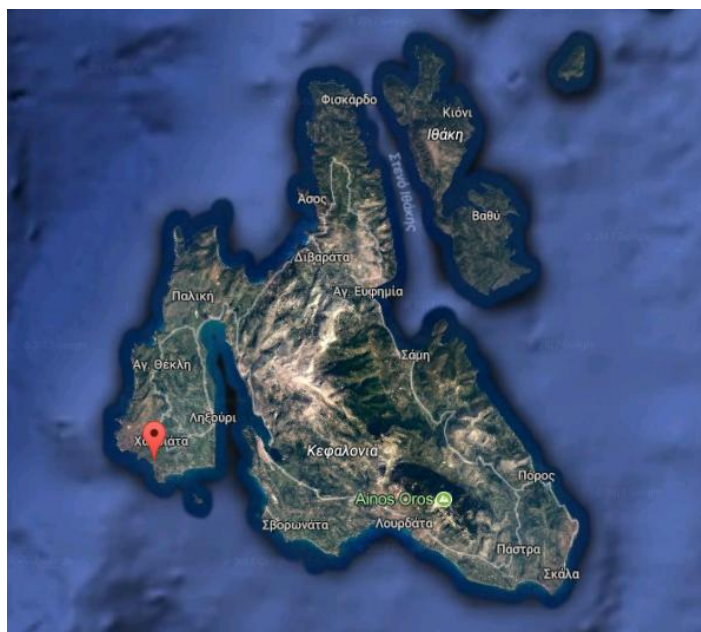
Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20 x 20 cm, πάχους 0.2 mm) της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 5% H₂SO₄ σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc, CH₂Cl₂ και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες EtOH και DMSO ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Οι διαλύτες *n*-Hex, *i*-Prop και Me₂CO ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο των εταιρειών Deutero GmbH ή Aldrich-Sigma Chemical Company.

2.3. Συλλογή οργανισμού

Ο οργανισμός *Laurencia glandulifera* συλλέχθηκε στην περιοχή Βάτσα της Κεφαλονιάς (Εικ. 11) σε βάθος 0,5-2 m τον Ιούνιο του 2015 και εν συνεχεία μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και διατηρήθηκε στους -20° C μέχρι την επεξεργασία του.

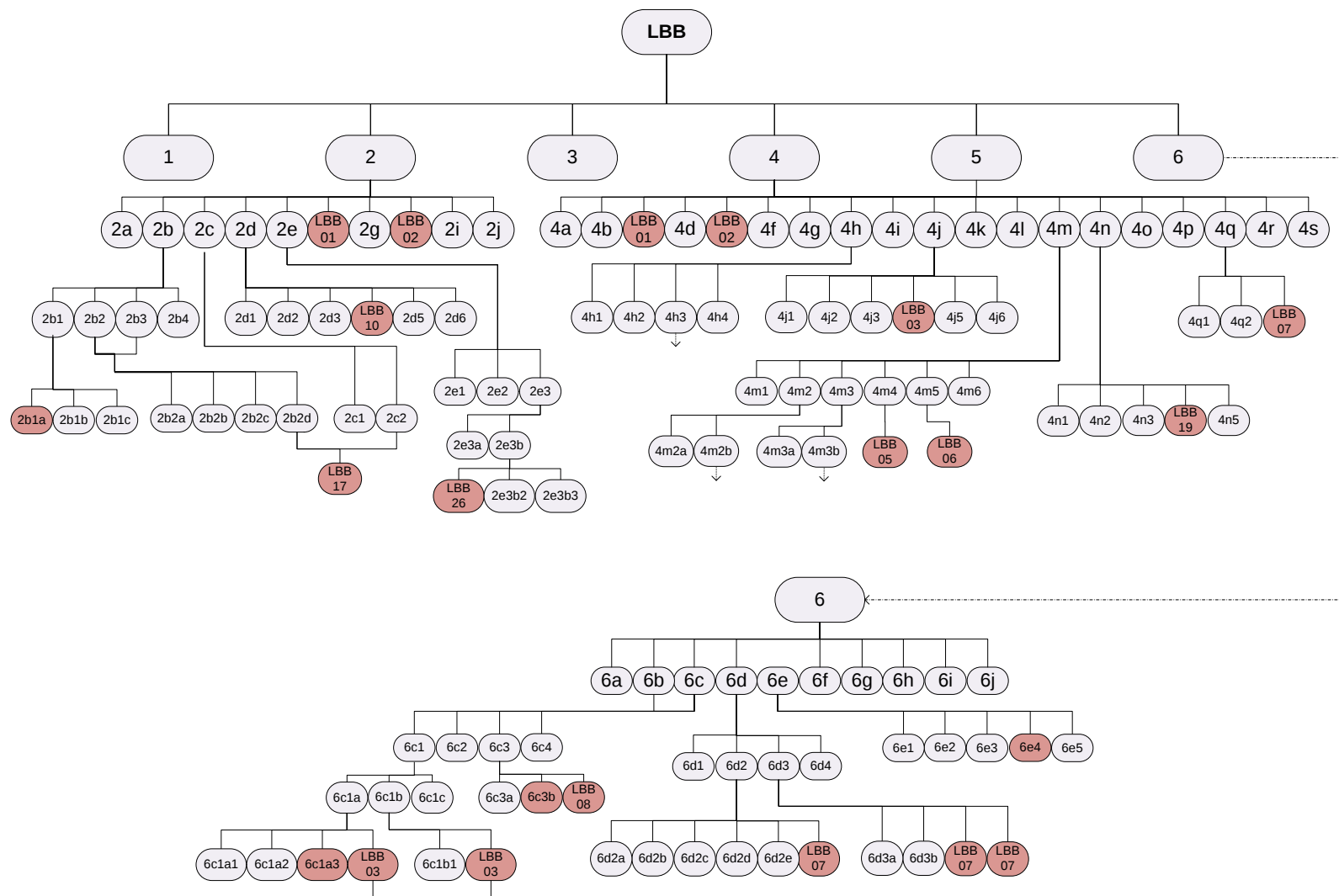


Εικόνα 11. Περιοχή δειγματοληψίας του οργανισμού *Laurencia glandulifera*.

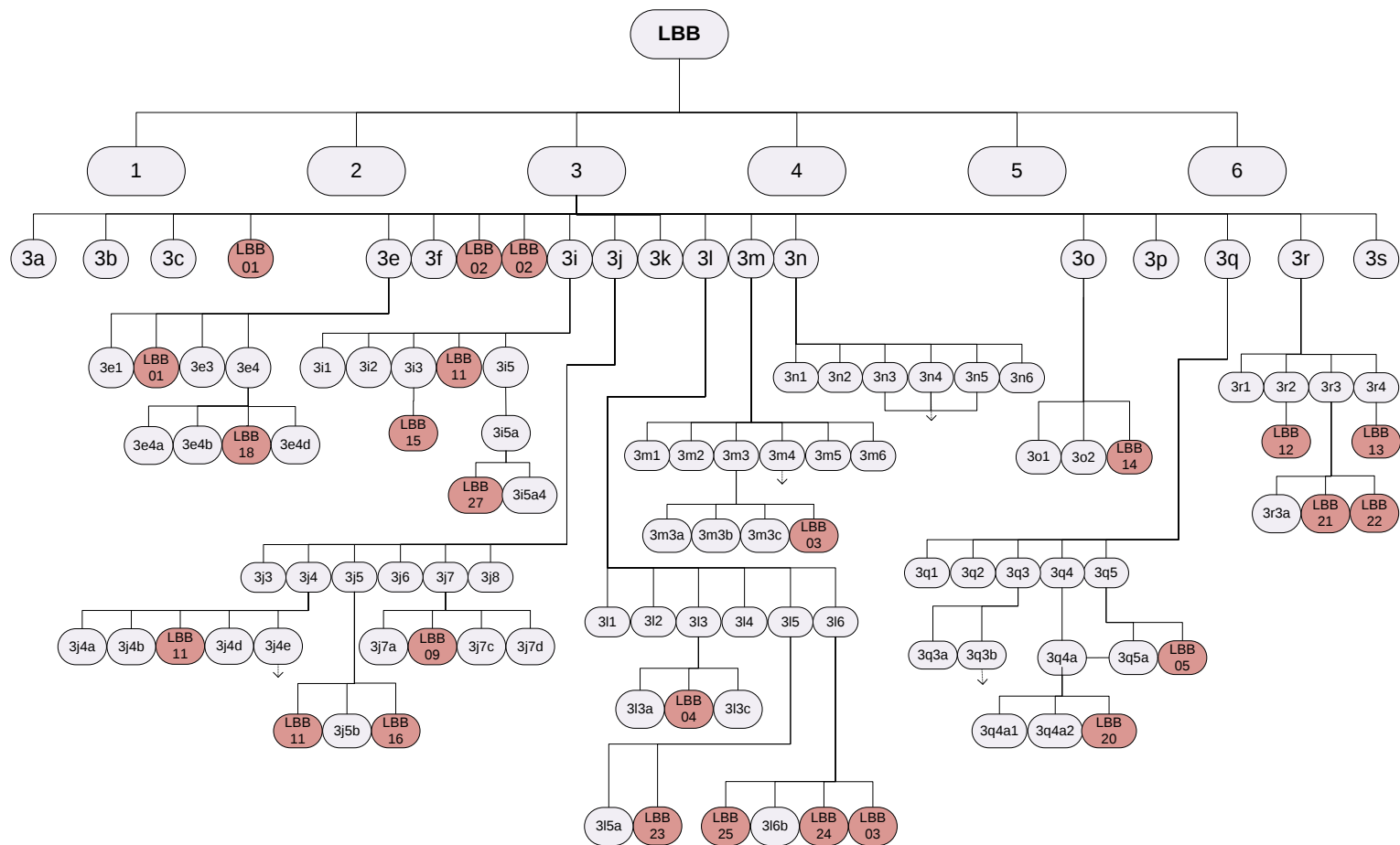
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το ροδοφύκος *Laurencia glandulifera*.

Δείγμα του νωπού οργανισμού υποβλήθηκε σε εξαντλητική εκχύλιση με μίγματα $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ τρεις φορές. Μετά τη συνένωση των εκχυλισμάτων και τη συμπύκνωση τους υπό κενό προέκυψε υπόλειμμα σκούρου πράσινου χρώματος και ελαιώδους υφής (22.16 g).

Ακολούθησε διαχωρισμός των χημικών συστατικών με χρήση χρωματογραφίας στήλης υπό κενό (VLC), χρωματογραφίας στήλης βαρύτητας (GCC), εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του οργανισμού με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών, παρουσιάζεται διαγραμματικά στα ακόλουθα σχήματα (Εικ. 12 και Εικ. 13), ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.



Εικόνα 12. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος, όπου με κόκκινο απεικονίζονται οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες (μέρος πρώτο).



Εικόνα 13. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος, όπου με κόκκινο απεικονίζονται οι απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες (μέρος δεύτερο).

Το αρχικό υπόλειμμα (22.16 g) υποβλήθηκε σε VLC κανονικής φάσης, με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 17 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 2) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 6 υπολείμματα (Πίν. 3).

Πίνακας 2. Κλάσματα που παρελήφθησαν από τη VLC στο αρχικό εκχύλισμα LBB.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1	cHex 100%	200
2	cHex/EtOAc (95:5)	200
3	cHex/EtOAc (95:5)	200
4	cHex/EtOAc (90:10)	200
5	cHex/EtOAc (90:10)	200
6	cHex/EtOAc (80:20)	200
7	cHex/EtOAc (70:30)	200
8	cHex/EtOAc (60:40)	200
9	cHex/EtOAc (50:50)	200
10	cHex/EtOAc (40:60)	200
11	cHex/EtOAc (20:80)	200
12	EtOAc 100%	200
13	EtOAc/MeOH (95:5)	200
14	EtOAc/MeOH (90:10)	200
15	EtOAc/MeOH (50:50)	200
16	MeOH 100%	200
17	MeOH 100%	300

Πίνακας 3. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1-5	LBB1	76
6-7	LBB2	163
8-12	LBB3	944
13-14	LBB4	286
15-16	LBB5	199
17	LBB6	4.529

Το υπόλειμμα LBB2 (163 mg) υποβλήθηκε σε GCC σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 65 κλάσματα, των 15ml τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 4) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 10 υπολείμματα (Πίν. 5). Τα υπολείμματα ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα

LBB2f και LBB2h είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB01** και **LBB02**, αντίστοιχα).

Πίνακας 4. Κλάσματα που παρελήφθησαν από τη GCC στο LBB2.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1-15	cHex/EtOAc (98:2)	270
16-21	cHex/EtOAc (97:3)	100
22-32	cHex/EtOAc (96:4)	200
33-43	cHex/EtOAc (94:6)	200
44-48	cHex/EtOAc (92:8)	100
49-53	cHex/EtOAc (90:10)	100
54-59	cHex/EtOAc (80:20)	100
60-65	cHex/EtOAc (50:50)	100

Πίνακας 5. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1-3	LBB2a	8.5
4-8	LBB2b	31.0
9-10	LBB2c	20.2
11-13	LBB2d	8.3
14-18	LBB2e	11.7
19-24	LBB2f	42.7
25-32	LBB2g	13.9
33-39	LBB2h	11.3
40-55	LBB2i	4.4
56-65	LBB2j	5.5

Το κλάσμα LBB2b (31.0 mg) υποβλήθηκε σε SPE κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας, χρησιμοποιώντας έτοιμη στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 6) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 4 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 7).

Πίνακας 6. Κλάσματα που παρελήφθησαν από SPE στο LBB2b.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1	cHex 100%	5
2	cHex 100%	5
3	cHex 100%	5
4	cHex/EtOAc (99:1)	5
5	EtOAc 100%	10

Πίνακας 7. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1	LBB2b1	11.0
2-3	LBB2b2	5.1
4	LBB2b3	8.6
5	LBB2b4	2.3

Το κλάσμα LBB2b1 (11.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα LBB2b1a είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB28**) (Πίν. 8).

Πίνακας 8. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (99:1)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2b1a	2.7	15.4
LBB2b1b	0.5	19.3
LBB2b1c	0.3	21.8

Τα κλάσματα LBB2b2 (5.1 mg) και LBB2b3 (8.6 mg), συνενώθηκαν στο LBB2b2 και υποβλήθηκαν σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 9).

Πίνακας 9. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (98:2)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2b2a	2.0	9.8-12.2
LBB2b2b	1.7	13.0
LBB2b2c	2.2	14.7
LBB2b2d	6.3	16.4

Το υπόλειμμα LBB2c (20.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H -NMR (Πίν. 10).

Πίνακας 10. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (98:2)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2c1	0.2	10.0-13.7
LBB2c2	12.7	13.0

Τα υπολείμματα LBB2b2d (6.3 mg) και LBB2c2 (12.7 mg), συνενώθηκαν στο LBB2b2d και υποβλήθηκαν σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ^1H -NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB2b2d1 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB17**) (Πίν. 11).

Πίνακας 11. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/EtOAc (98:2)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2b2d1	14.9	22.0

Το κλάσμα LBB2d (8.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Παραλήφθηκαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB2d4 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB10**) (Πίν. 12).

Πίνακας 12. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (97:3)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2d1	0.7	9.5-11.9
LBB2d2	0.1	12.6
LBB2d3	1.5	15.7
LBB2d4	1.2	18.9
LBB2d5	1.7	20.2
LBB2d6	0.5	23.6

Το υπόλειμμα LBB2e (11.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης και παραλήφθηκαν 3 κλάσματα τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 13).

Πίνακας 13. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (95:5)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2e1	1.3	9.7-12.4
LBB2e2	3.0	13.9
LBB2e3	4.2	18.7

Το υπόλειμμα LBB2e3(4.2 mg) επεξεργάστηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Παραλήφθηκαν 2 κλάσματα τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν

φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 14).

Πίνακας 14. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/EtOAc (95:5)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2e3a	0.1	20.2
LBB2e3b	3.8	22.8

Το κλάσμα LBB2e3b (3.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με χειρόμορφη στήλη. Παραλήφθησαν 3 κλάσματα τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB2e3b1 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB26**) (Πίν. 15).

Πίνακας 15. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Chiralcel 10u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/i-Prop (95:5)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB2e3b1	0.4	17.9
LBB2e3b2	0.6	19.7
LBB2e3b3	0.1	23.0

Το υπόλειμμα LBB3 (944.0 mg), υποβλήθηκε σε GCC σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 220 κλάσματα, των 20ml τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 16) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 19 υπολείμματα. Τα υπολείμματα ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα LBB3d, LBB3g-LBB3h είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB01** και **LBB02**,

αντίστοιχα) (Πίν. 17).

Πίνακας 16. Κλάσματα που παρελήφθησαν από τη GCC στο LBB3.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1-10	cHex 100%	300
11-17	cHex/EtOAc (99:1)	200
18-26	cHex/EtOAc (98:2)	200
27-35	cHex/EtOAc (97:3)	200
36-44	cHex/EtOAc (96:4)	200
45-58	cHex/EtOAc (94:6)	300
59-72	cHex/EtOAc (93:7)	300
73-90	cHex/EtOAc (92:8)	400
91-104	cHex/EtOAc (91:9)	300
105-119	cHex/EtOA (90:10)	300
120-128	cHex/EtOAc (88:12)	200
129-144	cHex/EtOAc (85:15)	300
145-159	cHex/EtOAc (82:18)	300
160-164	cHex/EtOAc (80:20)	100
165-168	cHex/EtOAc (75:25)	100
169-173	cHex/EtOAc (72:28)	100
174-178	cHex/EtOAc (70:30)	100
179-183	cHex/EtOAc (65:35)	100
184-188	cHex/EtOAc (60:40)	100
189-198	cHex/EtOAc (50:50)	200
199-208	cHex/EtOAc (25:75)	200
209-220	EtOAc 100%	500

Πίνακας 17. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1-10	LBB3a	7.4
11-49	LBB3b	1.7
50-59	LBB3c	159.5
60-65	LBB3d	59.6
66-71	LBB3e	36.9
72-78	LBB3f	18.1
79-81	LBB3g	23.9
82-93	LBB3h	89.8
94-102	LBB3i	22.0
103-123	LBB3j	90.4
124-140	LBB3k	41.7
141-150	LBB3l	41.7
151-159	LBB3m	75.5
160-169	LBB3n	50.0
170-181	LBB3o	48.4

182-192	LBB3p	38.2
193-202	LBB3q	43.0
203-212	LBB3r	29.2
213-220	LBB3s	10.8

Το κλάσμα LBB3e (36.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3e2 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB01**) (Πίν. 18).

Πίνακας 18. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (92:8)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3e1	0.3	9.6-11.8
LBB3e2	5.3	16.8
LBB3e3	11.0	17.9
LBB3e4	6.9	18.7-21.1

Το υπόλειμμα LBB3e4 (6.9 mg), υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3e4c είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB18**) (Πίν. 19).

Πίνακας 19. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/EtOAc (92:8)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3e4a	0.6	20.7-23.4
LBB3e4b	0.9	24.6
LBB3e4c	1.5	26.7
LBB3e4d	0.1	29.0-31.4

Το υπόλειμμα LBB3i (22.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης, από την οποία παρελήφθησαν 5 κλάσματα. Τα κλάσματα ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3i4 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB11**) (Πίν. 20).

Πίνακας 20. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (88:12)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3i1	0.9	9.5-11.5
LBB3i2	0.5	16.0
LBB3i3	1.7	18.1
LBB3i4	5.1	20.7
LBB3i5	2.7	23.8

Το υπόλειμμα LBB3i3 (1.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3i3a είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB15**) (Πίν. 21).

Πίνακας 21. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/EtOAc (88:12)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3i3a	0.9	25.7

Το υπόλειμμα LBB3i5 (2.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης, αφού πρώτα συνενώθηκε με το υπόλειμμα LBB3j4e (0.4 mg). Παρελήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 22).

Πίνακας 22. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/EtOAc (88:12)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3i5a	1.6	36.9

Το κλάσμα LBB3i5a (1.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με χειρόμορφη στήλη. Παραλήφθησαν 2 κλάσματα τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3i5a1 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB27**) (Πίν. 23).

Πίνακας 23. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Chiralcel 10u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/i-Prop (93:7)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3i5a1	0.5	29.0
LBB3i5a4	0.4	36.4

Το κλάσμα LBB3j (90.4 mg) υποβλήθηκε σε VLC κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 24) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν

6 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 25).

Πίνακας 24. Κλάσματα που παρελήφθησαν από VLC στο LBB3j.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1	cHex 100%	10
2	cHex/EtOAc (95:5)	10
3	cHex/EtOAc (90:10)	10
4	cHex/EtOAc (85:15)	10
5	cHex/EtOAc (80:20)	10
6	cHex/EtOAc (70:30)	10
7	cHex/EtOAc (50:50)	10
8	EtOAc 100%	15

Πίνακας 25. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1-3	LBB3j3	0.1
4	LBB3j4	9.5
5	LBB3j5	7.6
6	LBB3j6	44.5
7	LBB3j7	7.2
8	LBB3j8	6.1

Το κλάσμα LBB3j4 (9.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3j4c είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB11**) (Πίν. 26).

Πίνακας 26. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (85:15)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3j4a	0.3	9.5-11.2
LBB3j4b	0.1	14.8
LBB3j4c	3.0	16.5-17.8
LBB3j4d	1.0	17.8-19.3

LBB3j4e	0.4	20.6
---------	-----	------

Το υπόλειμμα LBB3j5 (7.6 mg), υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης, και παρελήφθησαν συνολικά 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα LBB3j5a και LBB3j5c είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB11** και **LBB16**, αντίστοιχα) (Πίν. 27).

Πίνακας 27. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	nHex/EtOAc (85:15)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3j5a	2.6	21.3-22.0
LBB3j5b	1.8	22.0-23.9
LBB3j5c	1.9	23.9-25.8

Το κλάσμα LBB3j7 (7.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3j7b είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB09**) (Πίν. 28).

Πίνακας 28. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (75:25)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3j7a	0.4	10.3
LBB3j7b	1.7	19.3
LBB3j7c	1.9	21.5
LBB3j7d	1.4	24.7

Το κλάσμα LBB3l (41.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 29).

Πίνακας 29. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (75:25)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.2 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3l1	1.6	11.7-13.7
LBB3l2	16.9	14.7
LBB3l3	3.1	17.1
LBB3l4	2.9	18.8
LBB3l5	4.5	19.8
LBB3l6	4.1	21.8

Το κλάσμα LBB3l3 (3.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης, αφού συνενώθηκε με το υπόλειμμα LBB4h3 (1.6 mg). Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3l3b είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB04**) (Πίν. 30).

Πίνακας 30. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (85:15)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3l3a	0.3	12.7
LBB3l3b	1.8	13.7
LBB3l3c	0.5	15.1

Το υπόλειμμα LBB3l5 (4.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3l5b είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB23**) (Πίν. 31).

Πίνακας 31. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ		
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm	
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (85:15)	
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min	
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.	

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3l5a	0.2	12.5
LBB3l5b	1.8	15.9

Το κλάσμα LBB3l6 (4.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα LBB3l6a, LBB3l6c και LBB3l6d είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB25**, **LBB24** και **LBB03**, αντίστοιχα) (Πίν. 32).

Πίνακας 32. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ		
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm	
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (85:15)	
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min	
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.	

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3l6a	0.6	13.8
LBB3l6b	0.5	15.1
LBB3l6c	0.8	16.1
LBB3l6d	0.6	17.6

Το κλάσμα LBB3m (75.5 mg) υποβλήθηκε σε VLC κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία

ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 33) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 6 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 34).

Πίνακας 33. Κλάσματα που παρελήφθησαν από VLC στο LBB3m.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	15
2	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	15
3	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	15
4	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	15
5	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (95:5)	15
6	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (90:10)	15
7	EtOAc 100%	15

Πίνακας 34. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1	LBB3m1	2.1
2	LBB3m2	11.4
3	LBB3m3	33.6
4	LBB3m4	8.4
5-6	LBB3m5	8.0
7	LBB3m6	7.6

Το υπόλειμμα LBB3m3 (33.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3m3d είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB03**) (Πίν. 35).

Πίνακας 35. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3m3a	0.5	10.4
LBB3m3b	7.1	13.6

LBB3m3c	3.1	17.7
LBB3m3d	17.5	21.3

Το υπόλειμμα LBB3m4 (8.4 mg) συνενώθηκε με το υπόλειμμα LBB3n (50.0 mg). στο LBB3n και υποβλήθηκαν σε VLC κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 17 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 36) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 6 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 37).

Πίνακας 36. Κλάσματα που παρελήφθησαν από VLC στο LBB3n.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1	CH_2Cl_2 100%	10
2	CH_2Cl_2 100%	10
3	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (99:1)	10
4	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (99:1)	10
5	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	10
6	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	10
7	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	10
8	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (98:2)	10
9	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (97:3)	10
10	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (97:3)	10
11	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (96:4)	10
12	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (96:4)	10
13	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (95:5)	10
14	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (95:5)	10
15	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (90:10)	10
16	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (90:10)	10
17	EtOAc 100%	20

Πίνακας 37. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1-6	LBB3n1	2.0
7	LBB3n2	1.3
8-10	LBB3n3	17.1
11-12	LBB3n4	7.2
13-16	LBB3n5	5.3
17	LBB3n6	22.7

Το κλάσμα LBB3o (48.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν

φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3o3 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB14**) (Πίν. 38).

Πίνακας 38. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (75:25)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3o1	2.8	9.6-11.3
LBB3o2	19.5	11.8
LBB3o3	4.3	23.9

Το κλάσμα LBB3q (43.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 39).

Πίνακας 39. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (65:35)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3q1	2.0	9.9
LBB3q2	2.5	11.4
LBB3q3	3.0	12.1
LBB3q4	4.2	20.6-22.8
LBB3q5	7.6	23.4

Το κλάσμα LBB3q3 (3.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 40).

Πίνακας 40. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3q3a	0.3	12.2
LBB3q3b	0.6	13.5

Το κλάσμα LBB3q4 (4.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H-NMR (Πίν. 41).

Πίνακας 41. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3q4a	2.6	19.1

Το υπόλειμμα LBB3q4a (2.6 mg), συνενώθηκε με τα κλάσματα LBB3q5a (1.7 mg) και LBB4m3b (1.9 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H-NMR (Πίν. 42), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3q4a3 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB20**).

Πίνακας 42. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Econosphere Silica 10u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (65:35)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min

ANIXNEYTHS	R.I.
------------	------

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3q4a1	0.4	19.8
LBB3q4a2	0.1	22.6
LBB3q4a3	3.3	23.6

Το κλάσμα LBB3q5 (7.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 43), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3q5b είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB05**).

Πίνακας 43. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ANIXNEYTHS	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3q5a	1.7	18.9
LBB3q5b	4.7	22.7

Το κλάσμα LBB3r (29.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 44).

Πίνακας 44. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (65:35)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ANIXNEYTHS	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3r1	2.5	9.9
LBB3r2	4.2	12.0

LBB3r3	3.0	29.4
LBB3r4	3.2	32.2

Το κλάσμα LBB3r2 (4.2 mg) αφού συνενώθηκε με τα υπολείμματα LBB3q3b (0.6 mg) και LBB4m2b (2.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 45), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3r2a είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB12**).

Πίνακας 45. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (85:15)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3r2a	2.5	15.5

Το κλάσμα LBB3r3 (3.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 46), οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα LBB3r3b και LBB3r3c είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB21** και **LBB22**, αντίστοιχα).

Πίνακας 46. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3r3a	0.7	21.8
LBB3r3b	1.2	22.9
LBB3r3c	0.8	25.0

Το κλάσμα LBB3r4 (3.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 47), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB3r4a είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB13**).

Πίνακας 47. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB3r4a	1.4	27.3

Τα κλάσματα LBB4 και LBB5, συνολικού βάρους 485 mg, συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε GCC κανονικής φάσης με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 174 κλάσματα, των 20ml τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 48) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 19 υπολείμματα (Πίν. 49). Από το φασματοσκοπικό έλεγχο $^1\text{H-NMR}$, διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα LBB4c και LBB4e είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB01** και **LBB02**, αντίστοιχα).

Πίνακας 48. Κλάσματα που παρελήφθησαν από τη GCC στο LBB4-5.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1-19	cHex/EtOAc (95:5)	400
20-29	cHex/EtOAc (90:10)	200
30-39	cHex/EtOAc (88:12)	200
40-44	cHex/EtOAc (87:13)	100
45-67	cHex/EtOAc (85:15)	400
68-76	cHex/EtOAc (83:17)	200
77-86	cHex/EtOAc (80:20)	200
87-96	cHex/EtOAc (75:25)	200
97-101	cHex/EtOAc (70:30)	100
102-111	cHex/EtOAc (65:35)	200
112-116	cHex/EtOAc (60:40)	100
117-127	cHex/EtOAc (55:45)	200
128-131	cHex/EtOAc (50:50)	100
132-137	cHex/EtOAc (40:60)	100

138-141	cHex/EtOAc (30:70)	100
142-152	cHex/EtOAc (20:80)	200
153-162	cHex/EtOAc (10:90)	200
163-172	EtOAc 100%	200
173	MeOH 100%	200
174	MeOH 100%	50

Πίνακας 49. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1-12	LBB4a	10.0
13-21	LBB4b	11.5
22-31	LBB4c	16.1
32-36	LBB4d	7.1
37-39	LBB4e	11.4
40-45	LBB4f	10.7
46-51	LBB4g	14.4
52-60	LBB4h	12.3
61-64	LBB4i	7.9
65-71	LBB4j	25.7
72-87	LBB4k	42.6
88-102	LBB4l	25.8
103-117	LBB4m	34.7
118-130	LBB4n	35.1
131-140	LBB4o	69.8
141-150	LBB4p	26.3
151-162	LBB4q	27.1
163-172	LBB4r	8.1
173-174	LBB4s	112.5

Το κλάσμα LBB4h (12.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H -NMR (Πίν. 50).

Πίνακας 50. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4h1	0.5	10.2
LBB4h2	1.2	14.6
LBB4h3	1.6	16.1
LBB4h4	2.8	19.2

Το κλάσμα LBB4j (25.7 mg) συνενώθηκε με τα κλάσματα LBB3n3 (17.1 mg), LBB3n4 (7.2 mg) και LBB3n5 (5.3 mg) Το υπόλειμμα συνολικού βάρους 55.3 mg υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 51), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα LBB4j4 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης LBB03).

Πίνακας 51. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4j1	1.9	9.5-10.6
LBB4j2	1.2	13.9
LBB4j3	11.1	16.9-19.1
LBB4j4	19.8	19.4
LBB4j5	9.5	20.2-22.6
LBB4j6	2.5	25.2

Το κλάσμα LBB4m (34.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 52).

Πίνακας 52. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (60:40)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min

ANIXNEYTHS	R.I.
------------	------

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4m1	1.2	9.4-10.4
LBB4m2	6.2	11.4
LBB4m3	4.3	18.5
LBB4m4	5.3	20.3
LBB4m5	2.4	21.5-23.1
LBB4m6	2.5	23.6-25.9

Το υπόλειμμα LBB4m2 (6.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC από την οποία παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H -NMR (Πίν. 53).

Πίνακας 53. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ANIXNEYTHS	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4m2a	1.5	11.9
LBB4m2b	2.7	13.1

Το υπόλειμμα LBB4m3 (4.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H -NMR (Πίν. 54).

Πίνακας 54. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (75:25)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ANIXNEYTHS	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4m3a	0.7	13.9
LBB4m3b	1.9	15.7

Το κλάσμα LBB4m4 (5.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 55), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB4m4a είναι καθαρή ουσία και (μεταβολίτης **LBB05**).

Πίνακας 55. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4m4a	2.9	23.3

Το κλάσμα LBB4m5 (2.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 56), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB4m5a είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB06**).

Πίνακας 56. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4m5a	0.7	24.4

Το κλάσμα LBB4n (35.1 mg) το οποίο υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και

ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 57), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB4n4 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB19**).

Πίνακας 57. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/Me ₂ CO (70:30)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4n1	1.7	9.8
LBB4n2	4.3	10.0
LBB4n3	3.8	11.4
LBB4n4	4.5	13.5
LBB4n5	5.0	15.8

Το κλάσμα LBB4q (27.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 58), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB4q3 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB07**).

Πίνακας 58. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (40:60)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB4q1	1.0	9.1-10.7
LBB4q2	1.7	13.6-17.1
LBB4q3	7.8	24.1

Το υπόλειμμα LBB6 (4.229 mg) υποβλήθηκε σε VLC κανονικής φάσης, με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 10 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 59).

Πίνακας 59. Κλάσματα που παρελήφθησαν από τη VLC στο LBB6.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1	CH ₂ Cl ₂ 100%	200	LBB6a	21.2
2	CH ₂ Cl ₂ /Me ₂ CO (80:20)	200	LBB6b	3.7
3	CH ₂ Cl ₂ /Me ₂ CO (50:50)	200	LBB6c	41.7
4	CH ₂ Cl ₂ /Me ₂ CO (20:80)	200	LBB6d	113.4
5	Me ₂ CO 100%	200	LBB6e	145.1
6	Me ₂ CO/MeOH (95:5)	200	LBB6f	55.3
7	Me ₂ CO/MeOH (90:10)	200	LBB6g	109.8
8	Me ₂ CO/MeOH (75:25)	200	LBB6h	312.7
9	Me ₂ CO/MeOH (50:50)	200	LBB6i	2,138
10	MeOH 100%	200	LBB6j	1,618

Τα κλάσματα LBB6b (3.7 mg) και LBB6c (41.7 mg), συνενώθηκαν στο LBB6c και υποβλήθηκαν σε VLC κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία τα ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H-NMR (Πίν. 60).

Πίνακας 60. Κλάσματα που παρελήφθησαν από VLC στο LBB6c.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1	cHex/EtOAc (40:60)	15	LBB6c1	24.8
2	cHex/EtOAc (40:60)	15	LBB6c2	8.6
3	EtOAc 100%	30	LBB6c3	5.1
4	MeOH 100%	30	LBB6c4	7.0

Το κλάσμα LBB6c1 (24.8 mg) υποβλήθηκε σε SPE κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας, χρησιμοποιώντας έτοιμη στήλη γέλης

πυριτίου κανονικής φάσης. Παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 61).

Πίνακας 61. Κλάσματα που παρελήφθησαν από SPE στο LBB6c1

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (ml)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1	cHex/EtOAc (80:20)	5	LBB6c1a	15.7
2	cHex/EtOAc (80:20)	5	LBB6c1b	3.6
3	EtOAc 100%	10	LBB6c1c	5.7

Το κλάσμα LBB6c1a (15.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 62), οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα LBB6c1a3 και LBB6c1a4 είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτες **LBB29** και **LBB03**, αντίστοιχα).

Πίνακας 62. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB6c1a1	0.6	9.5-11.3
LBB6c1a2	4.7	13.3
LBB6c1a3	1.6	19.5
LBB6c1a4	2.7	21.2

Το κλάσμα LBB6c1b (3.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 63), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB6c1b2 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB03**).

Πίνακας 63. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (80:20)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB6c1b1	0.2	10.3
LBB6c1b2	0.5	21.0

Το κλάσμα LBB6c3 (5.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 64), οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα LBB6c3b και LBB6c3c είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτης **LBB30** και **LBB08**, αντίστοιχα).

Πίνακας 64. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (40:60)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	2.0 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB6c3a	0.8	6.9-8.5
LBB6c3b	0.7	15.7
LBB6c3c	0.7	21.8

Το LBB6d (113.4 mg) υποβλήθηκε σε VLC κανονικής φάσης με διαλύτες έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 65).

Πίνακας 65. Κλάσματα που παρελήφθησαν από VLC στο LBB6d.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)
1	cHex/EtOAc (40:60)	15	LBB6d1	9.1
2	cHex/EtOAc (40:60)	15	LBB6d2	18.2
3	EtOAc 100%	30	LBB6d3	43.5
4	MeOH 100%	40	LBB6d4	39.9

Το κλάσμα LBB6d2 (18.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 66), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB6d2f είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB07**).

Πίνακας 66. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (40:60)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	2.0 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB6d2a	0.1	6.9-7.9
LBB6d2b	0.6	7.9-8.9
LBB6d2c	1.1	8.9-9.9
LBB6d2d	0.1	9.9-11.4
LBB6d2e	2.7	15.1
LBB6d2f	1.4	24.8

Το κλάσμα LBB6d3 (43.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 67), οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα υπολείμματα LBB6d3c και LBB6d3d είναι καθαρές ουσίες (μεταβολίτης **LBB07**).

Πίνακας 67. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (40:60)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	2.0 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB6d3a	2.2	7.7
LBB6d3b	2.6	8.6-11
LBB6d3c	3.1	22.9-24.1
LBB6d3d	3.7	24.1-25.7

Το κλάσμα LBB6e (145.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με στήλη κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με $^1\text{H-NMR}$ (Πίν. 68), οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα LBB6e4 είναι καθαρή ουσία (μεταβολίτης **LBB31**).

Πίνακας 68. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΣΤΗΛΗ	Supelco 5u, 250 mm x 10 mm
ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ	cHex/EtOAc (40:60)
ΡΟΗ ΔΙΑΛΥΤΗ	1.5 mL/min
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ	R.I.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
LBB6e1	5.0	8.6-10.5
LBB6e2	8.2	11.5
LBB6e3	7.8	16.2
LBB6e4	55.5	20.3
LBB6e5	27.8	26.1

Συνολικά απομονώθηκαν 31 μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίν. 69.

Πίνακας 69. Απομονωμένοι μεταβολίτες και μάζες αυτών.

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
1	LBB02	LBB3g, LBB3h, LBB4e, LBB2h	136.4
2	LBB11	LBB3i4, LBB3j4c, LBB3j5a	10.7
3	LBB16	LBB3j5c	1.9
4	LBB15	LBB3i3a	0.9
5	LBB01	LBB3d, LBB4c, LBB2f, LBB3e2	123.7
6	LBB26	LBB2e3b1	0.4
7	LBB25	LBB3l6a	0.6
8	LBB03	LBB4j4, LBB3m3d, LBB6c1a4, LBB3l6d	41.1
9	LBB07	LBB4q3, LBB6d2f, LBB6d3c, LBB6d3d	16
10	LBB04	LBB3l3b	1.8
11	LBB19	LBB4n4	4.5
12	LBB14	LBB3o3	4.3
13	LBB24	LBB3l6c	0.8
	LBB05	LBB4m4a, LBB3q5b	7.6
	LBB06	LBB4m5a	0.7
	LBB08	LBB6c3c	0.7
	LBB09	LBB3j7b	1.7
	LBB10	LBB2d4	1.2
	LBB12	LBB3r2a	2.5
	LBB13	LBB3r4a	1.4
	LBB17	LBB2b2d1	14.9
	LBB18	LBB3e4c	1.5
	LBB20	LBB3q4a3	3.3
	LBB21	LBB3r3b	1.2
	LBB22	LBB3r3c	0.8
	LBB23	LBB3l5b	1.8
	LBB27	LBB3i5a1	0.5
	LBB28	LBB2b1a	2.7
	LBB29	LBB6c1a3	1.6
	LBB30	LBB6c3b	0.7
	LBB31	LBB6e4	55.5

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

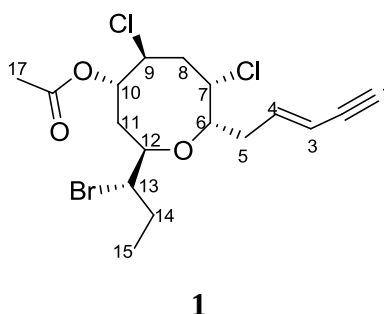
Δείγμα του ροδοφύκου *Laurencia glandulifera* συλλέχθηκε στην περιοχή Βάτσα της Κεφαλονιάς σε βάθος 0,5-2 m τον Ιούνιο του 2015. Ο οργανισμός εκχυλίστηκε εξαντλητικά με μίγματα CH_2Cl_2 και MeOH και το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση 31 δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι 13 (**1–13**).

Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR και MS) και στη σύγκρισή τους με τα δεδομένα ανάλογων δομών της βιβλιογραφίας.

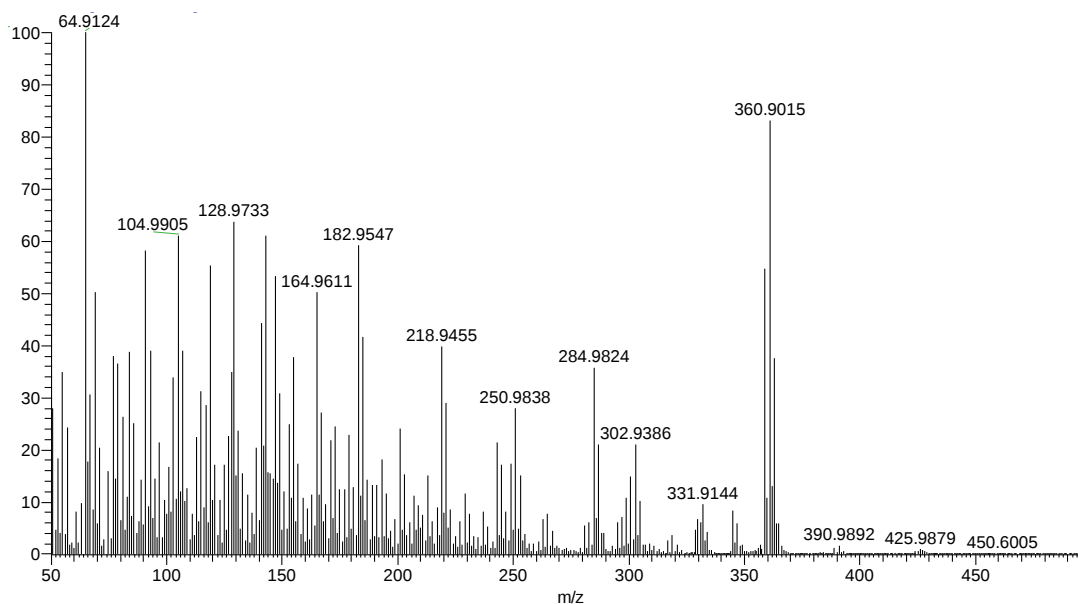
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών **1–13** και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

3.1. Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο κρυσταλλικό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 136.4 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **1** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{17}H_{23}BrCl_2O_3$.



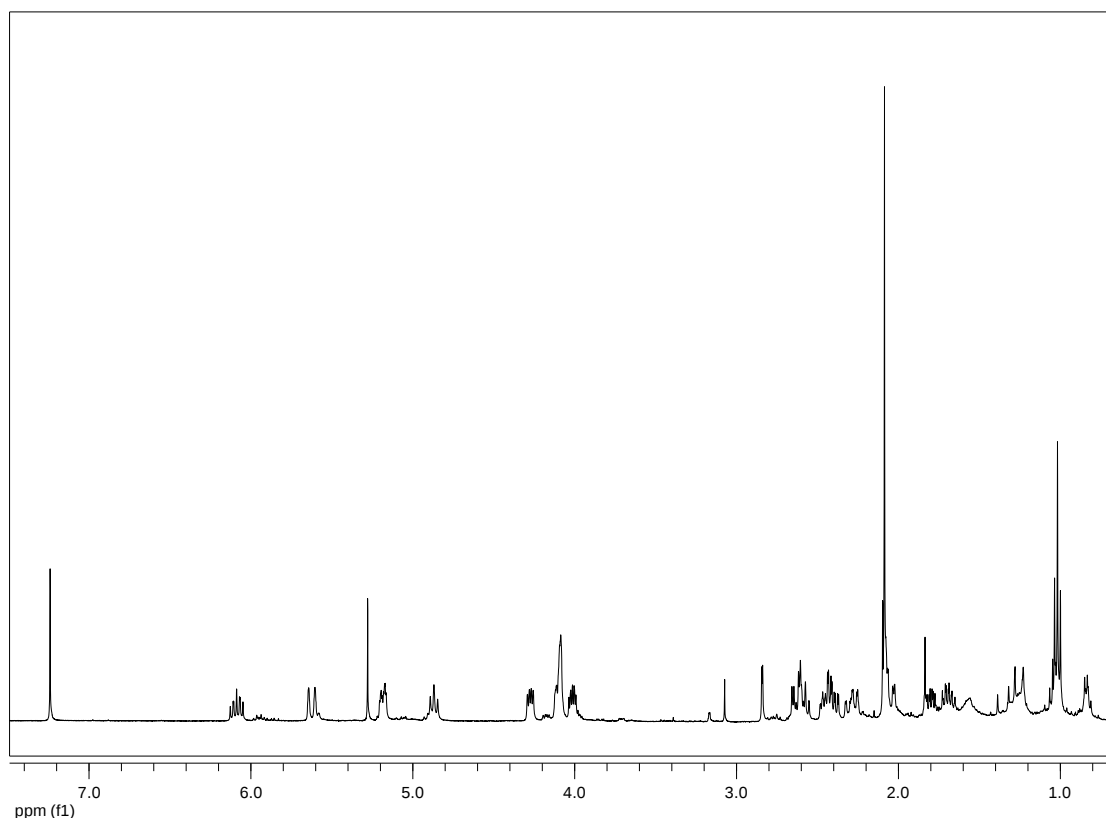
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **1** (Εικ. 14) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 424 και ισοτοπικές κορυφές σε m/z 426, 428 και 430 με σχετική αναλογία ενδεικτική της ύπαρξης δύο ατόμων χλωρίου και ενός ατόμου βρωμίου στο μόριο.



Εικόνα 14. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **1**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** (Εικ. 15) παρατηρήθηκαν:

- Μια τριπλή κορυφή σε δ 1.02, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα αλειφατικό μεθύλιο σε δευτεροταγή άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 2.09, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός μεθυλίου μιας ακετοξυ-ομάδας.
- Μια διπλή κορυφή σε δ 2.84, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός ακετυλενικού άνθρακα.
- Μια κορυφή σε δ 3.98-4.13 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια, καθώς και μια διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.27 και μια τριπλή κορυφή σε δ 4.87 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια. Τα σήματα αυτά αντιστοιχούν σε πέντε μεθινικά πρωτόνια, δυο οξυγονωμένων και τριών αλογονωμένων ανθράκων.
- Μια διπλή διπλών διπλών κορυφή σε δ 5.19 η οποία αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου που φέρει μια ακετοξυ-ομάδα.
- Μια ευρεία διπλή κορυφή σε δ 5.62 και μια διπλή διπλών διπλών κορυφή σε δ 6.09, κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



Εικόνα 15. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1**.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=5$. Λαμβάνοντας υπόψη τον διπλό και τον τριπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα, καθώς και το καρβονύλιο ως τέσσερις από τους πέντε βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι μονοκυκλικό. Επίσης τα σήματα σε δ 2.84, 5.62 και 6.09 υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός *trans* en-yne συστήματος, χαρακτηριστικό των C₁₅ ακετογενινών με συζευγμένη βινυλοακετυλενική αλυσίδα.

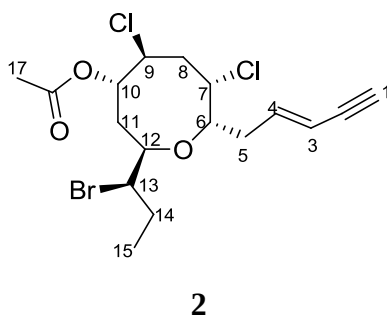
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **1** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν λαουρενσιενίνη (laurencienyne), μια οκταμελή ακετογενίνη τύπου λαουρενανίου, η οποία απομονώθηκε από τη *L. obtusa* και έχει ελεγχθεί ως προς την κυτταροτοξική της δράση (Caccamese et al. 1980, Imre & Aydoğmuş 1997). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Imre & Aydoğmuş 1997) στον Πίν. 70.

Πίνακας 70. Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H NMR του μεταβολίτη **1** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

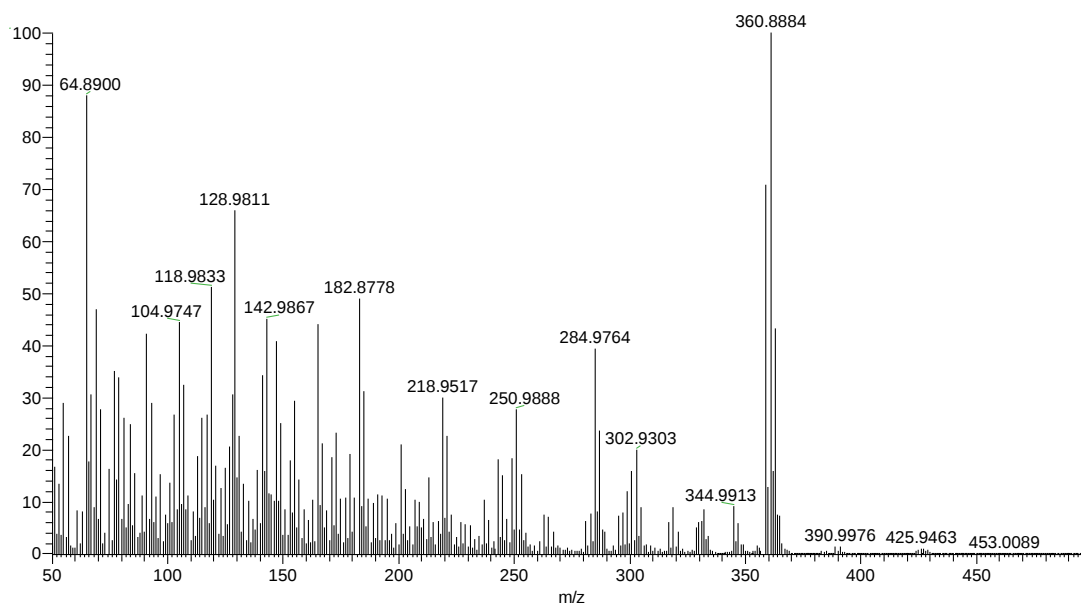
Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1	2.84 d (2.0)	2.86 d (2.1)
3	5.62 brd (15.8)	5.64 brd (16.5)
4	6.09 ddd (15.8, 8.5, 7.1)	6.11 ddd (15.7, 8.3, 7.3)
5	2.24-2.67 m	2.24-2.71 m
6	4.27 dd (9.3, 4.8)	4.29 dd (9.1, 5.1)
7	3.98-4.13 m	3.99- 4.65 m
8	2.24-2.67 m	2.24- 2.71 m
9	4.87 t (9.1)	4.89 dd (9.1, 9.0)
10	5.19 ddd (9.8, 3.9, 2.5)	5.21 ddd (9.1, 3.8, 3.2)
11	2.24-2.67 m	2.24 – 2.71 m
12	3.98-4.13 m	3.99- 4.65 m
13	3.98-4.13 m	3.99- 4.65 m
14	1.74 m	1.75 m
15	1.02 t (7.3)	1.05 t (7.2)
17	2.09 s	2.10 s

3.2. Μεταβολίτης 2

Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 10.7 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **2** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{17}H_{23}BrCl_2O_3$.



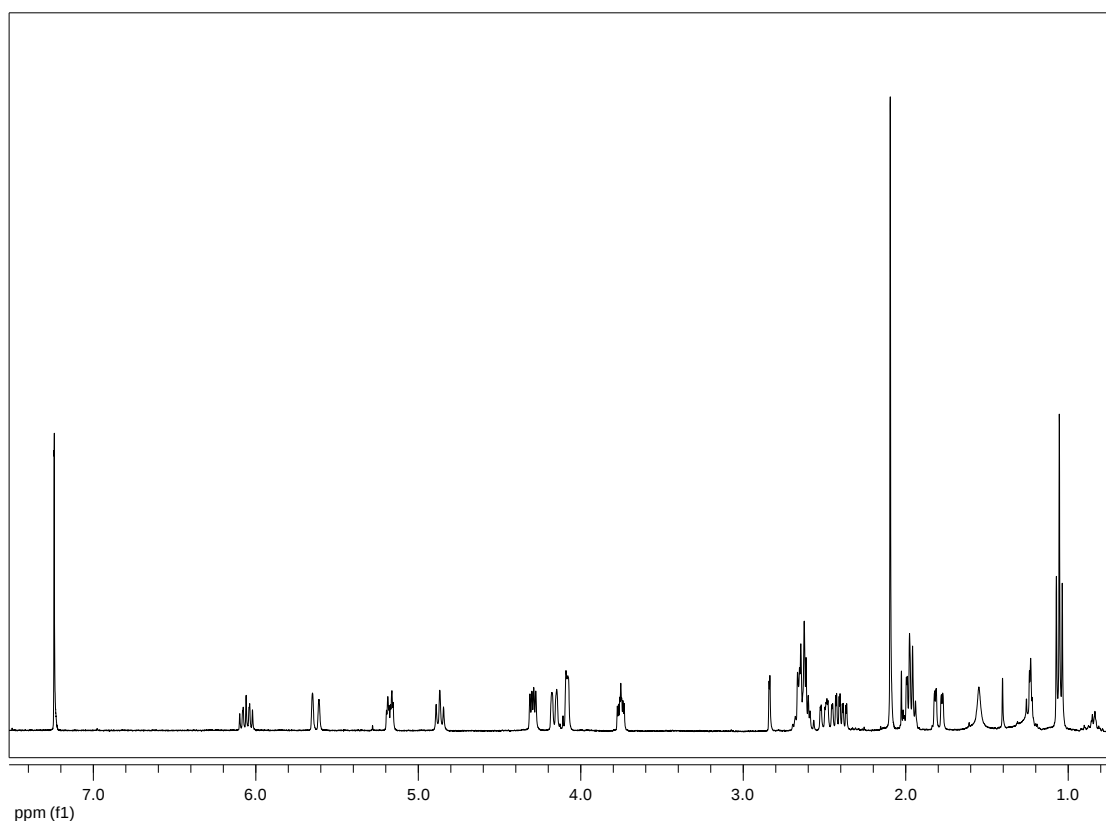
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **2** (Εικ. 16) έδειξε το ίδιο μοριακό βάρος με αυτό του μεταβολίτη **1**. Εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 424 και ισοτοπικές κορυφές σε m/z 426, 428 και 430 με σχετική αναλογία ενδεικτική της ύπαρξης δύο ατόμων χλωρίου και ενός ατόμου βρωμίου στο μόριο.



Εικόνα 16. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **2**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 2 (Εικ. 17) παρατηρήθηκαν:

- Μια τριπλή κορυφή σε δ 1.05, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα αλειφατικό μεθύλιο σε δευτεροταγή άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 2.10, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός μεθυλίου μιας ακετοξυ-ομάδας.
- Μια διπλή κορυφή σε δ 2.84, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός ακετυλενικού άνθρακα.
- Πέντε κορυφές στα 3.70-4.91 ppm, κάθε μια από τις οποίες ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούν σε πέντε μεθινικά πρωτόνια δυο οξυγονωμένων και τριών αλογονωμένων ανθράκων.
- Μια διπλή διπλών διπλών κορυφή σε δ 5.18, η οποία αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου συνδεδεμένου με μια ακετοξυ-ομάδα.
- Μια ευρεία διπλή κορυφή σε δ 5.63 και μια διπλή διπλών διπλών κορυφή σε δ 6.04, κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα ολεφινικό πρωτόνιο.



Εικόνα 17. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 2.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=5$. Λαμβάνοντας υπόψη τους δυο διπλούς δεσμούς (έναν μεταξύ ανθράκων και έναν

σε καρβονύλιο) και τον τριπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως τέσσερις από τους πέντε βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι μονοκυκλικό.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **2** παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με αυτά του μεταβολίτη **1**. Και σε αυτή την περίπτωση τα σήματα σε δ 2.84, 5.63 και 6.04 υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός *trans* en-yne συστήματος, χαρακτηριστικό των C₁₅ ακετογενινών με συζευγμένη βινυλοακετυλενική αλυσίδα, ενώ η κυριότερη διαφορά εντοπίζεται στην διπλή διπλών διπλών κορυφή στα 3.75 ppm, που βρίσκεται σε ελαφρώς υψηλότερα πεδία, χωρίς να αλληλεπικαλύπτεται με άλλες κορυφές μεθινικών πρωτονίων αλογονωμένων ή οξυγονωμένων ανθράκων.

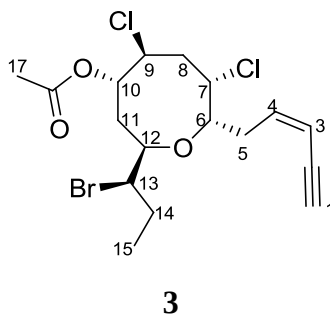
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **2** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 13-επι-λαουρενσιενίνη (13-*epi*-laurencienyne), η οποία απομονώθηκε από τη *L. obtusa* και έχει ελεγχθεί για κυτταροτοξική και εντομοκτόνο δράση (Imre & Aydoğmuş 1997, Πιουρούλου et al. 2002). Ο μεταβολίτης **2** αποτελεί επιμερές του μεταβολίτη **1** ως προς τη σχετική στερεοχημεία στον C-13. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Imre & Aydoğmuş 1997) στον Πίν. 71.

Πίνακας 71. Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H NMR του μεταβολίτη **2** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

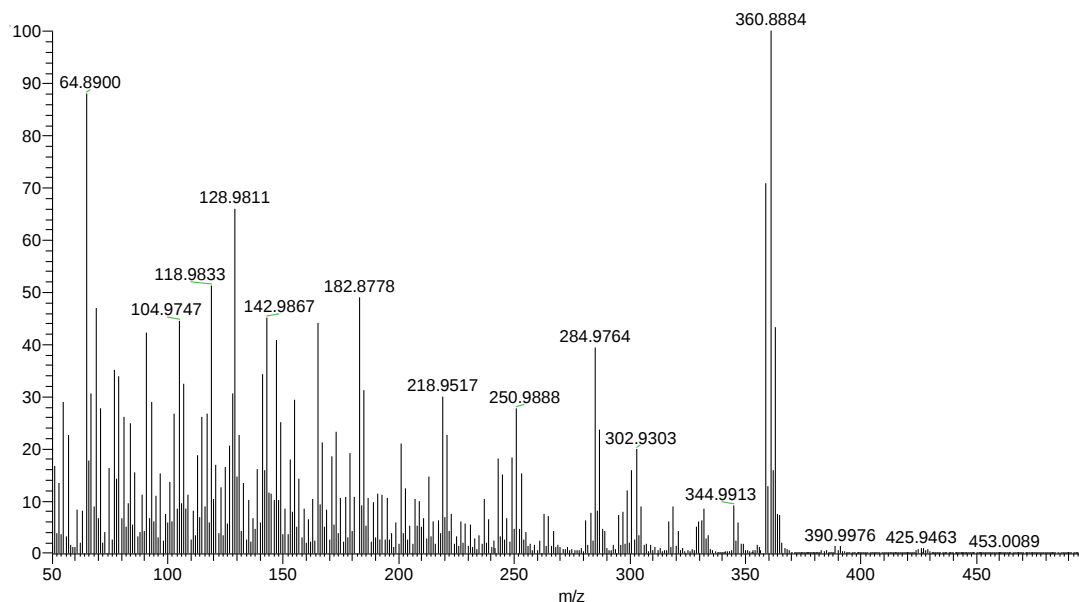
Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1	2.84 d (2.1)	2.85 d (2.2)
3	5.63 brd (15.9)	5.65 brd (16.1)
4	6.04 ddd (15.7, 8.7, 7.0)	6.07 ddd (15.7, 8.7, 7.0)
5	2.58-2.70 m	2.60 – 2.71 m
6	4.30 dd (9.5, 5.1)	4.31 dd (9.2, 5.1)
7	4.09 m	4.10 dd (5.1, 2.5)
8a	2.40 ddd (16.3, 8.6, 2.4)	2.41 ddd (16.2, 8.5, 2.5)
8b	2.58-2.70 m	2.60 – 2.71 m
9	4.87 t (9.2)	4.88 dd (9.5, 9.2)
10	5.18 ddd (9.8, 3.5, 2.6)	5.19 ddd (9.5, 3.7, 3.1)
11a	1.80 ddd (16.8, 3.9, 1.4)	1.82 ddd (16.6, 3.7, 1.4)
11b	2.49 ddd (16.5, 11.6, 2.4)	2.50 ddd (16.6, 11.5, 3.1)
12	4.16 dd (10.7, 2.4)	4.18 dd (9.9, 2.9)
13	3.75 ddd (7.8, 6.0, 2.9)	3.77 ddd (7.9, 6.1, 2.9)
14	1.98 m	1.98 m
15	1.05 t (7.3)	1.08 t (7.2)
17	2.10 s	2.10 s

3.3. Μεταβολίτης 3

Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο κρυσταλλικό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.9 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **3** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{17}H_{23}BrCl_2O_3$.



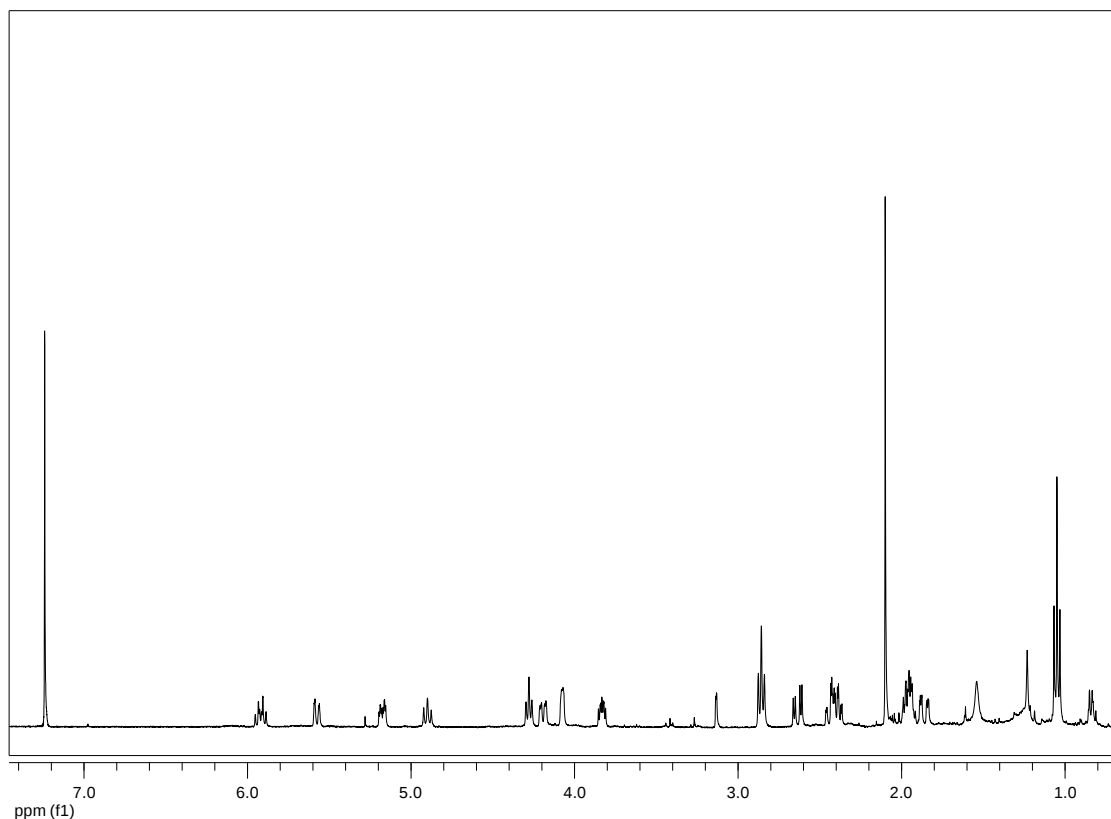
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **3** (Εικ. 18) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 424 και ισοτοπικές κορυφές σε m/z 426, 428 και 430 με σχετική αναλογία ενδεικτική της ύπαρξης δύο ατόμων χλωρίου και ενός ατόμου βρωμίου στο μόριο. Το φάσμα μάζας υποδεικνύει ότι πρόκειται για ένα ακόμη ισομερές των μεταβολιτών **1** και **2**.



Εικόνα 18. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **3**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** (Εικ. 19) παρατηρήθηκαν:

- Μια τριπλή κορυφή σε δ 1.05, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα αλειφατικό μεθύλιο σε δευτεροταγή άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 2.10, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός μεθυλίου μιας ακετοξυ-ομάδας.
- Μια διπλή κορυφή σε δ 3.13, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός ακετυλενικού άνθρακα.
- Πέντε κορυφές στα 3.80-4.93 ppm, κάθε μια από τις οποίες ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούν σε πέντε μεθινικά πρωτόνια δυο οξυγονωμένων και τριών αλογονωμένων ανθράκων.
- Μια διπλή διπλών διπλών κορυφή σε δ 5.17, η οποία αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός μεθινίου συνδεδεμένου με μια ακετοξυ-ομάδα.
- Μια διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.58 και μια διπλή τριπλών κορυφή σε δ 5.92, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια δύο ολεφινικών μεθινίων.



Εικόνα 19. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 3.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=5$. Λαμβάνοντας υπόψη τους δυο διπλούς δεσμούς (ένα μεταξύ ανθράκων και ένα σε καρβονύλιο) και τον τριπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως τέσσερις από τους πέντε βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι μονοκυκλικό.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **3** παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με αυτά του μεταβολίτη **2**, με τη διαφορά ότι σε αυτή την περίπτωση τα σήματα σε δ 3.13, 5.58 και 5.92 υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός *cis* en-yne συστήματος.

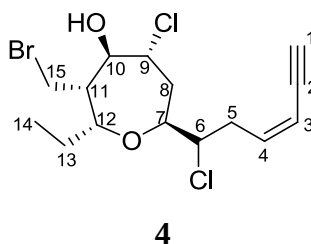
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **3** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν (3*Z*)-13-επι-λαουρενσιενίνη [(3*Z*)-13-*epi*-laurencienyne], το οποίο απομονώθηκε από τη *L. obtusa* και έχει ελεγχθεί για εντομοκτόνο δράση (Πιιρουλίου et al. 2002). Επομένως, ο μεταβολίτης **3** αποτελεί γεωμετρικό ισομερές του μεταβολίτη **2**. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Πιιρουλίου et al. 2002) στον Πίν. 72.

Πίνακας 72. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

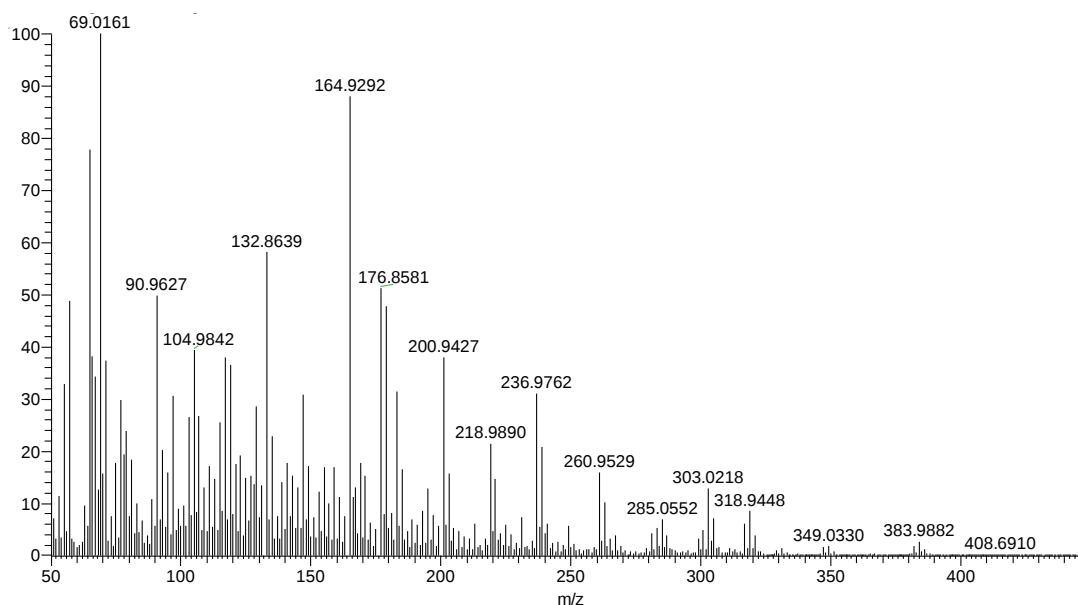
Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1	3.13 d (2.1)	3.14 d (2.0)
3	5.58 dd (10.9, 2.2)	5.57 dd (10.8, 2.0)
4	5.92 dt (10.9, 7.7)	5.92 dt (10.8, 7.7)
5	2.86 dd (7.4, 7.4)	2.85 dd (7.4, 7.4)
6	4.28 dd (7.2, 7.2)	4.28 br dd (7.2, 7.2)
7	4.07 m	4.07 dd (5.0, 1.0)
8a	2.40 ddd(16.4, 8.4, 2.5)	2.39 ddd (16.2, 8.4, 2.4)
8b	2.63 dd (16.3, 5.0)	2.63 dd (16.2, 5.0)
9	4.90 dd (9.2, 9.2)	4.90 br dd (9.1, 9.1)
10	5.17 ddd (9.9, 3.8, 2.7)	5.17 ddd (9.8, 4.0, 3.2)
11a	1.86 ddd (16.6, 3.9, 1.4)	1.86 ddd (16.5, 4.0, 1.0)
11b	2.44 m	2.43 m
12	4.19 ddd (11.8, 3.5, 1.3)	4.19 ddd (11.3, 3.6, 1.0)
13	3.83 ddd (8.3, 5.3, 3.9)	3.83 ddd (8.1, 4.9, 3.8)
14	1.96 m	1.96 m
15	1.05 t (7.3)	1.04 t (7.2)
17	2.10 s	2.09 s

3.4. Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.9 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **4** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{21}BrCl_2O_2$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **4** (Εικ. 20) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 382 και ισοτοπικές κορυφές σε m/z 384, 386 και 388 με σχετική αναλογία ενδεικτική της ύπαρξης δύο ατόμων χλωρίου και ενός ατόμου βρωμίου στο μόριο.

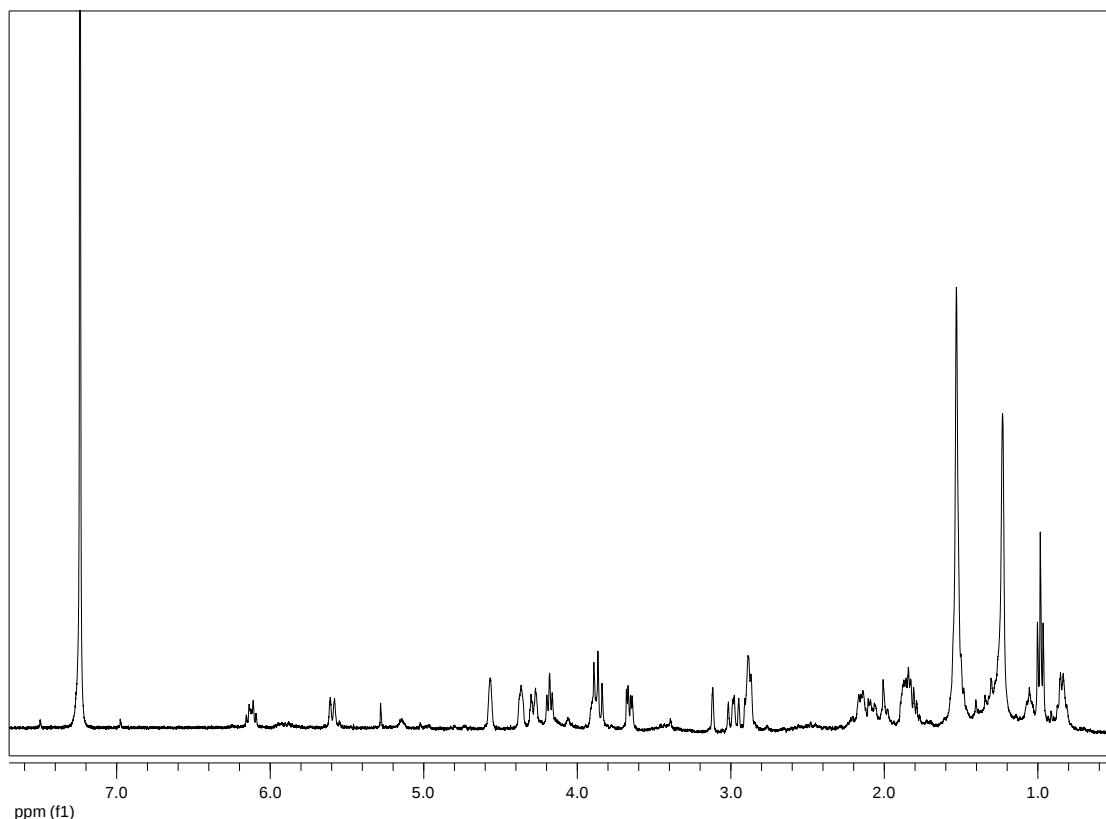


Εικόνα 20. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **4**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **4** (Εικ. 21) παρατηρήθηκαν:

- Μια τριπλή κορυφή σε δ 0.98, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε ένα αλειφατικό μεθύλιο σε δευτεροταγή άνθρακα.

- Μια διπλή κορυφή σε δ 3.12, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός ακετυλενικού άνθρακα.
- Έξι σήματα στα 3.62-4.59 ppm που αντιστοιχούν σε επτά πρωτόνια, πέντε μεθινίων και ενός μεθυλενίου οξυγονωμένων ή αλογονωμένων ανθράκων.
- Μια διπλή κορυφή σε δ 5.60 και μια πολλαπλή κορυφή σε δ 6.12, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια δύο ολεφινικών μεθινίων.



Εικόνα 21. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **4**.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη τον ένα διπλό και τον ένα τριπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως τους τρεις από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο πρέπει να είναι μονοκυκλικό. Επίσης, τα χαρακτηριστικά σήματα των δύο ολεφινικών μεθινίων στα 6.12 και 5.60 ppm και ενός ακετυλενικού πρωτονίου στα 3.12 ppm υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός *cis* en-yne συστήματος σε μια C_{15} ακετογενίνη.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **4** με αυτά της βιβλιογραφίας για μονοκυκλικές C_{15} ακετογενίνες με συζευγμένη βινυλοακετυλενική αλυσίδα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν ροτζιολενίνη B (*rogiolenyne* B), η οποία απομονώθηκε αρχικά από το σπόγγο *Spongia*

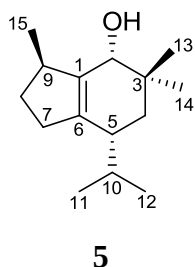
zimocca (Guella & Pietra 1991) και έπειτα από τα ροδοφύκη *Laurencia microcladia* και *L. obtusa* (Guella et al. 1992, Aydoğmuş et al. 2004). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Guella & Pietra, 1991) στον Πίν. 73.

Πίνακας 73. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **4** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

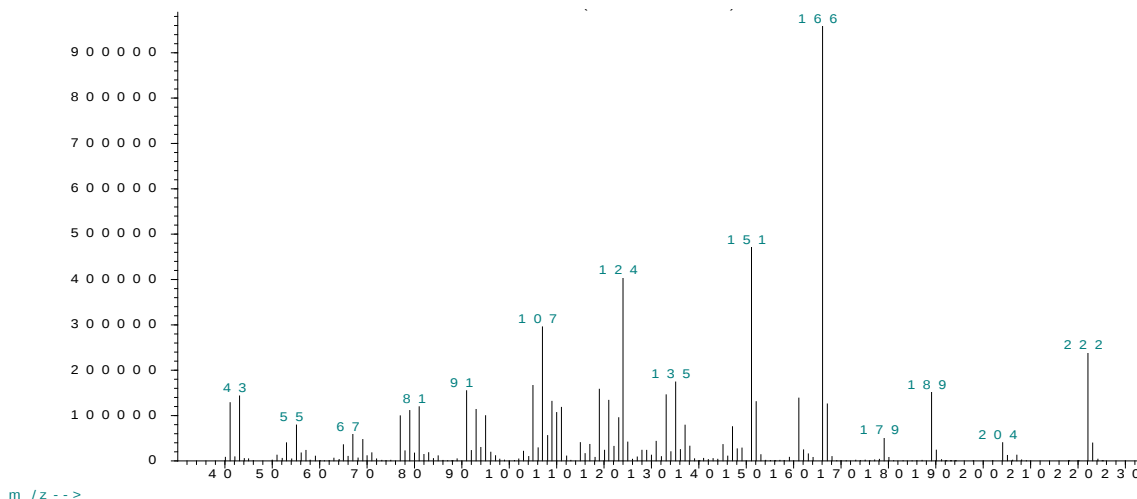
Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1	3.12 d (1.7)	3.13 dd (2.5, 0.8)
3	5.60 dd (11.1, 1.7)	5.60 dddd (10.8, 2.5, 1.5, 1.5)
4	6.12 m	6.13 dddd (10.8, 7.3, 7.3, 0.8)
5	2.89 m	2.88 m
6	3.83-3.92 m	3.90 ddd (9.0, 4.5, 3.4)
7	4.29 m	4.29 ddd (11.5, 3.3, 3.3)
8a	1.87 m	1.87 ddd (15.7, 5.9, 3.1)
8b	2.98 dd (15.6, 11.5)	2.99 ddd (15.7, 11.5, 1.7)
9	4.37 m	4.37 dddd (5.9, 3.9, 1.7, 1.7)
10	4.57 m	4.57 dq (3.9, 3.9, 1.7)
11	2.15 m	2.16 dddd (10.4, 4.4, 3.9, 1.3)
12	4.18 brt (7.2)	4.19 ddd (7.7, 6.4, 0.9)
13a	1.53 m	1.54 ddq (15.6, 6.4, 1.5)
13b	1.82 m	1.82 ddq (15.6, 7.7, 7.1)
14	0.98 t (7.5)	0.99 t (7.1)
15a	3.66 dd (10.8, 4.2)	3.68 dd (10.7, 4.4)
15b	3.83-3.92 m	3.87 dd (10.7, 10.4)

3.5. Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης 5 απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως πορτοκαλί ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 123.7 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του 5 οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{26}O$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 5 (Εικ. 22) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 222 και θραύσμα προϊόν απόσπασης ενός μορίου νερού $[M-H_2O]^+$ σε m/z 204, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.

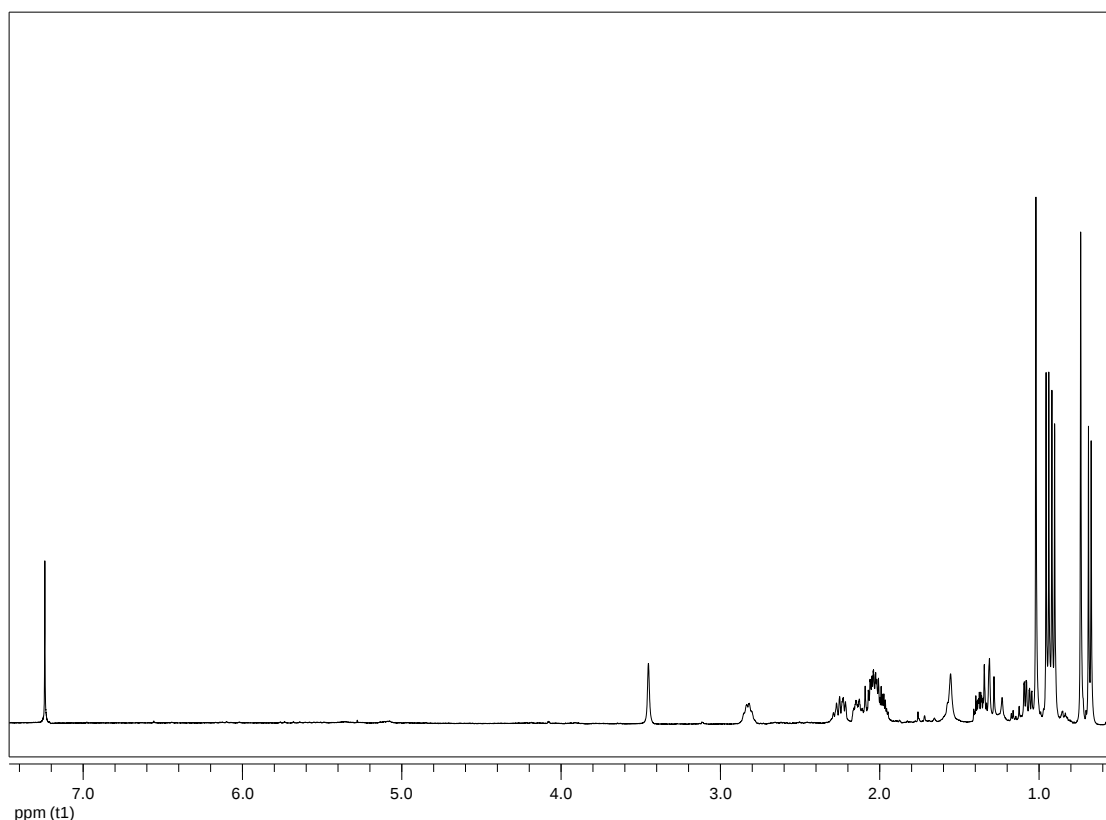


Εικόνα 22. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη 5.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη 5 (Εικ. 23) παρατηρήθηκαν:

- Τρεις διπλές κορυφές σε δ 0.68, 0.91 και 0.95 οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια τριών αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.

- Δυο απλές κορυφές σε δ 0.74 και 1.02, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 3.45, η οποία αντιστοιχεί σε ένα πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.



Εικόνα 23. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 5.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=3$. Το μόριο λοιπόν θα πρέπει να είναι δικυκλικό με ένα διπλό δεσμό.

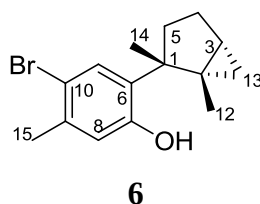
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 5 με αυτά της βιβλιογραφίας για δικυκλικά σεσκιτερπένια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν επιμπραζιλενόλη (epibrasilenol), το οποίο απομονώθηκε αρχικά από το θαλάσσιο γαστερόποδο *Aplysia brasiliiana* (Stallard et al. 1978) κι έπειτα από τη *L. obtusa* (Howard & Fenical 1978), ενώ έχει απομονωθεί και από την *A. fasciata* (Ioannou et al. 2009). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 5 παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Ηλιοπούλου 2004) στον Πίν. 74.

Πίνακας 74. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **5** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

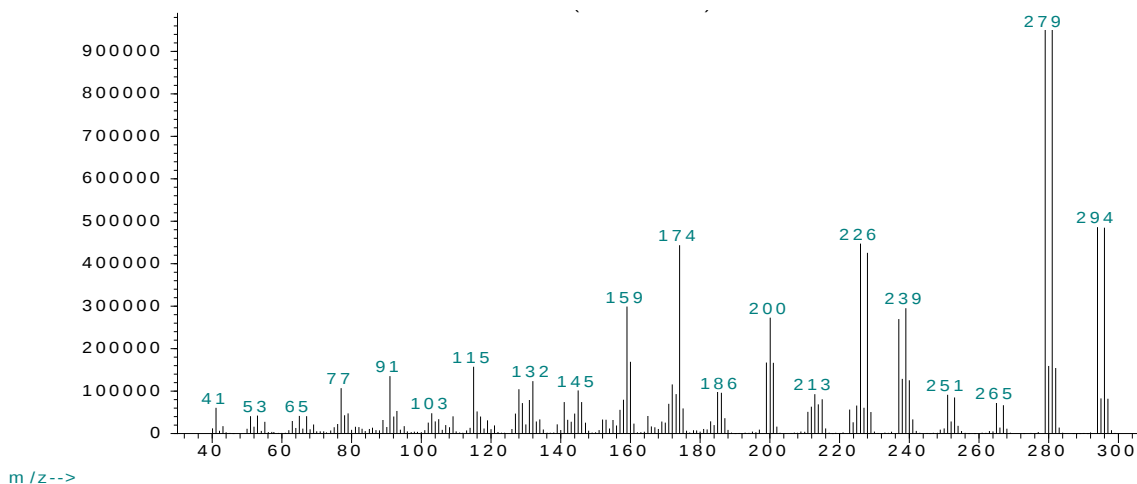
<i>Θέση</i>	<i>Πειραματικά δεδομένα</i>	<i>Βιβλιογραφικά δεδομένα</i>
2	3.45 s	3.44 s
4a	1.07 dd (13.3, 5.8)	1.06 dd (13.5, 5.9)
4b	1.31 dd (13.3, 11.6)	1.30 dd (12.1, 12.1)
5	1.94-2.08 m	2.03 m
7a	2.14 m	2.13 m
7b	2.25 m	2.24 m
8a	1.37 m	1.36 m
8b	1.94-2.08 m	2.02 m
9	2.83 m	2.82 m
10	1.94-2.08 m	2.01 m
11	0.91 d (7.0)	0.90 d (7.0)
12	0.68 d (7.0)	0.67 d (7.0)
13	1.02 s	1.01 s
14	0.74 s	0.73 s
15	0.95 d (6.7)	0.94 d (7.0)

3.6. Μεταβολίτης 6

Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.4 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **6** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{19}BrO$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **6** (Εικ. 24) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 294 με ισοτοπική ισοϋψή κορυφή σε m/z 296, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός ατόμου βρωμίου στο μόριο. Επίσης παρατηρήθηκε θραύσμα προϊόν απόσπασης ενός μεθυλίου $[M-CH_3]^+$ σε m/z 279 με ισοτοπική ισοϋψή κορυφή σε m/z 281.

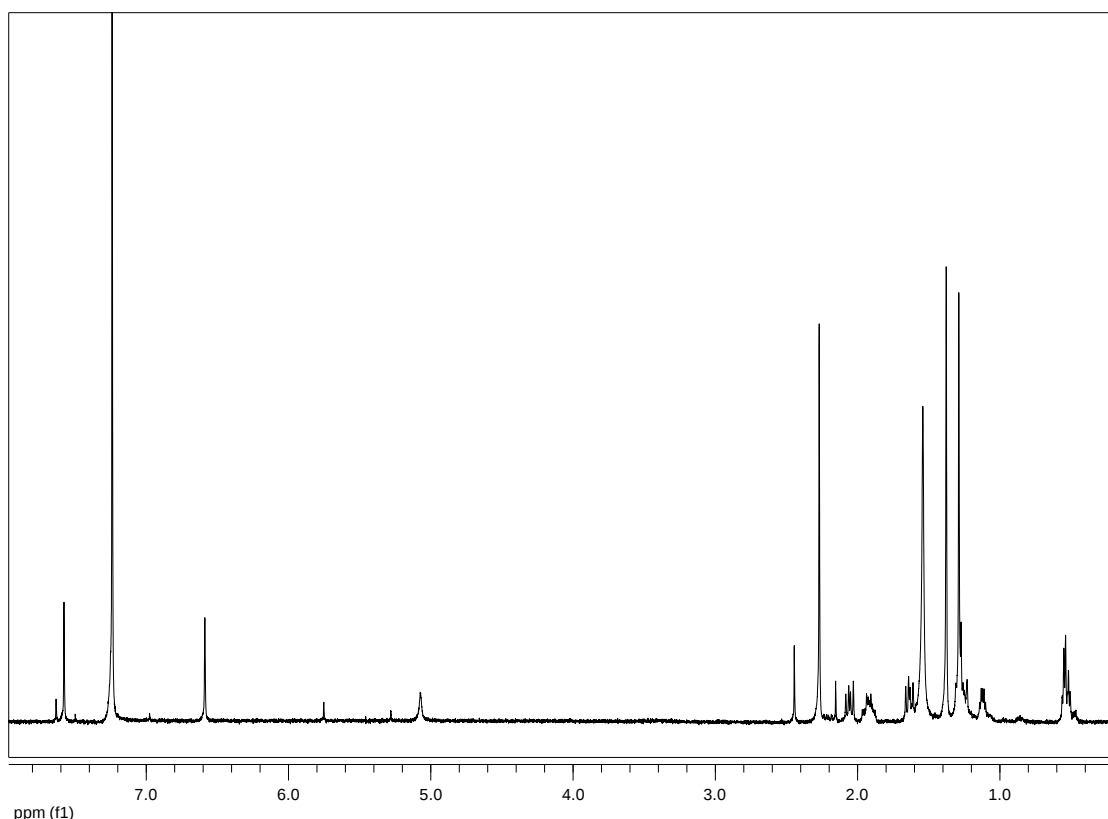


Εικόνα 24. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **6**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **6** (Εικ. 25) παρατηρήθηκαν:

- Μια κορυφή σε δ 0.53, η οποία ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί σε δύο μεθυλενικά πρωτόνια μιας κυκλοπροπυλο-ομάδας.
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 1.29, 1.38 και 2.27, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αλειφατικών και ενός αρωματικού μεθυλίου σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.

- Δυο απλές κορυφές σε δ 6.59 και 7.58, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν σε δύο αρωματικά πρωτόνια.



Εικόνα 25. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6**.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=6$. Λαμβάνοντας υπόψη το αρωματικό σύστημα ως τέσσερις από τους έξι βαθμούς ακορεστότητας και εφόσον δεν έχουμε ενδείξεις για την ύπαρξη περαιτέρω διπλών δεσμών ή ενός τριπλού το μόριο θα πρέπει να είναι τρικυκλικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **6** με αυτά της βιβλιογραφίας για τρικυκλικά σесκιτερπένια με αρωματικό δακτύλιο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν λαουριντερόλη (laurinterol), το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από τη *Laurencia intermedia* (Irie et al. 1966). Η λαουριντερόλη έχει έκτοτε απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Laurencia* και από γαστερόποδα του γένους *Aplysia* κι έχει ελεγχθεί ως προς τη δραστηριότητά της σε διάφορους βιολογικούς στόχους. Έχει εξεταστεί ως προς την κυτταροτοξική της δράση έναντι διάφορων κυτταρικών σειρών (Tsukamoto et al. 2005, Kladi et al. 2006), ενώ έχει βρεθεί ότι εκχύλισμα πλούσιο σε λαουριντερόλη προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα μελανώματος (Kim et al. 2008). Επιπλέον, έχει παρουσιάσει αντιβακτηριακή

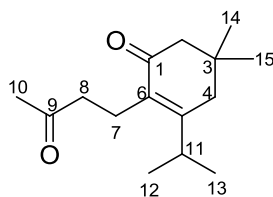
(Vairappan et al. 2001, Tsukamoto et al. 2005), εντομοαπωθητική και εντομοκτόνο δράση (Ishii et al. 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Tsukamoto et al. 2005) στον Πίν. 75.

Πίνακας 75. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **6** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

<i>Θέση</i>	<i>Πειραματικά δεδομένα</i>	<i>Βιβλιογραφικά δεδομένα</i>
3	1.12 ddd (7.8, 4.4, 3.8)	1.13 dt (8.8, 4.6)
4a	1.64 dd (12.3, 7.8)	1.65 dd (13.2, 8.8)
4b	1.92 m	1.94 m
5a	1.24 m	1.27 m
5b	2.06 dd (13.0, 8.2)	2.10 dd (13.2, 8.8)
8	6.59 s	6.61 s
11	7.58 s	7.60 s
12	1.29 s	1.31 s
13a	0.53 m	0.54 dd (8.8, 4.6)
13b		0.57 t (4.6)
14	1.38 s	1.40 s
15	2.27 s	2.28 s

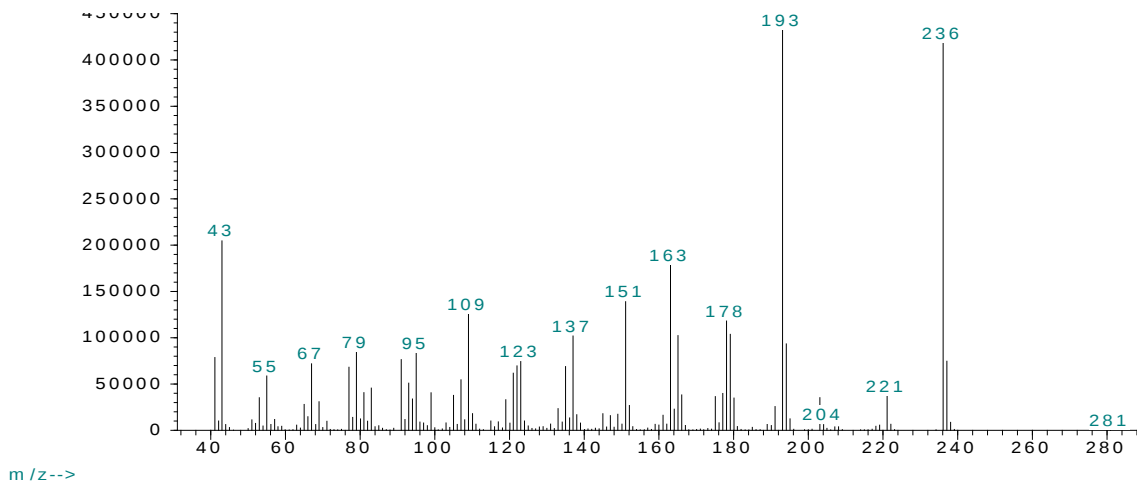
3.7. Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης 7 απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.6 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του 7 οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}O_2$.



7

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη 7 (Εικ. 26) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 236 και παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 221. Επίσης, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-C_3H_7]^+$ ή $[M-CH_3CO]^+$ σε m/z 193.

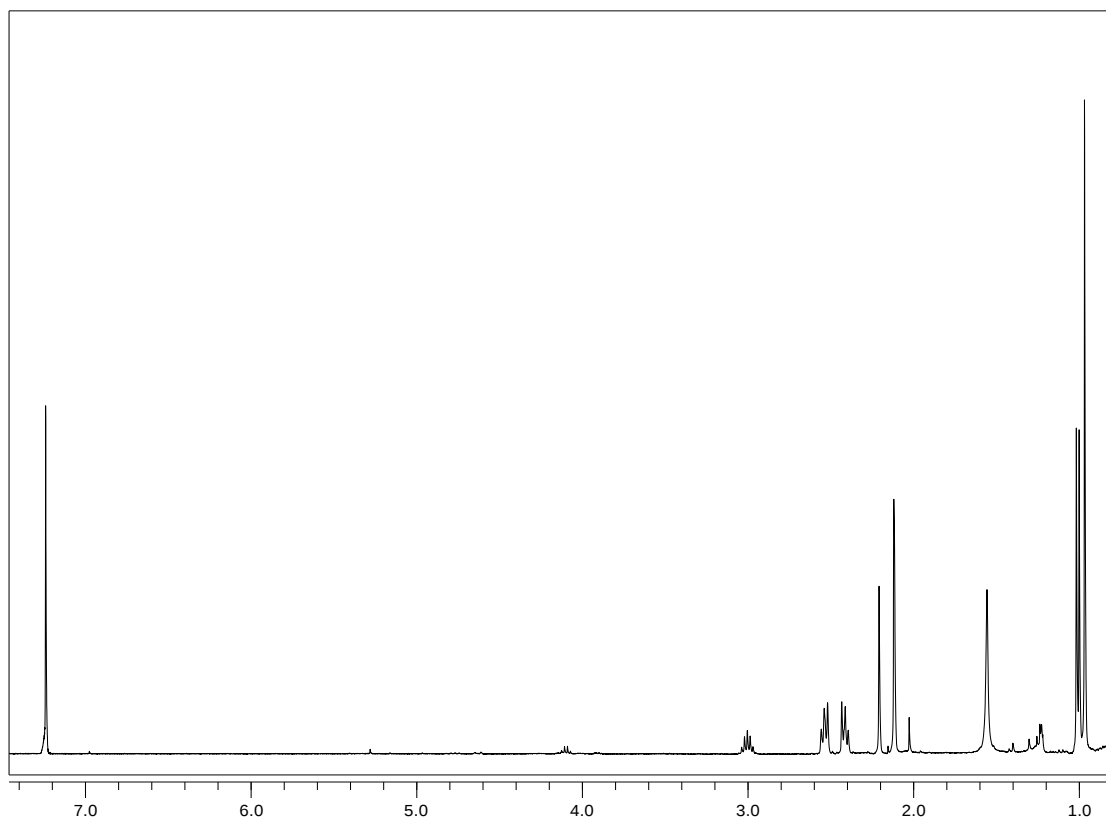


Εικόνα 26. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη 7.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη 7 (Εικ. 27) παρατηρήθηκαν:

- Μια απλή κορυφή σε δ 0.97 που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια δυο μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μια διπλή κορυφή σε δ 1.01 που ολοκληρώνει για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια δυο αλειφατικών μεθυλίων μιας ισοπροπυλο-ομάδας.

- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 2.12, η οποία ολοκληρώνει για πέντε πρωτόνια.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 2.21, η οποία ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια.
- Δυο πολλαπλές κορυφές σε δ 2.41 και δ 2.54, κάθε μια από τις οποίες ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια.
- Μια επταπλή κορυφή σε δ 3.00, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε αποθωρακισμένο μεθίνιο μιας ισοπροπυλο-ομάδας.



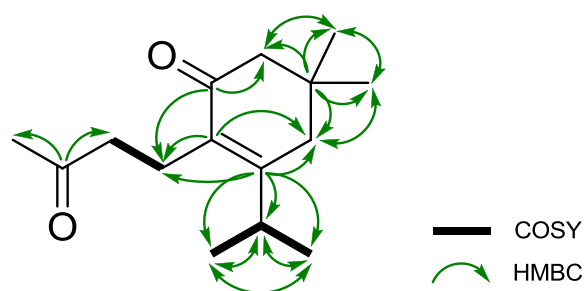
Εικόνα 27. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 7.

Ο συνδυασμός των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και HMBC υπέδειξε την ύπαρξη 15 ατόμων άνθρακα και συγκεκριμένα πέντε πρωτοταγών, ενός τριτοταγούς, τεσσάρων δευτεροταγών και πέντε τεταρτοταγών ανθράκων, εκ των οποίων δυο είναι καρβονυλικοί (δ 199.2 και 208.6) και δυο βινυλικοί (δ 131.2 και 161.7).

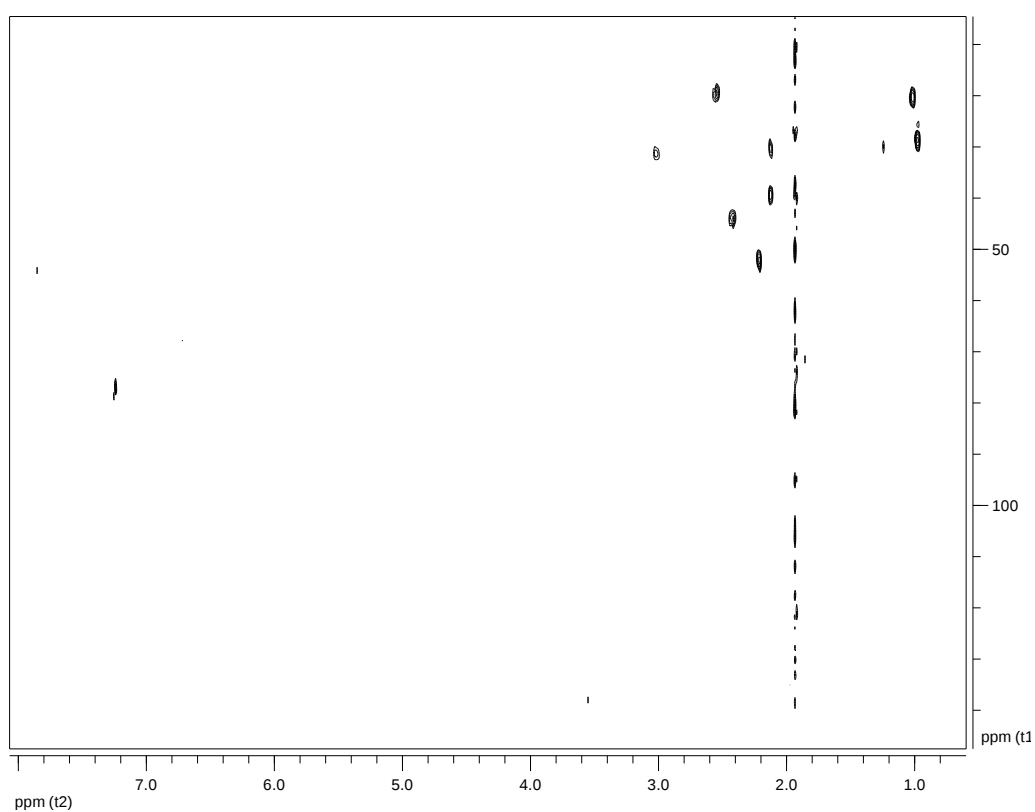
Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δυο καρβονύλια και τον διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως τρεις από τους τέσσερεις βαθμούς ακορεστότητας το μόριο θα πρέπει να είναι μονοκυκλικό.

Η δισδιάστατη δομή του μεταβολίτη 7 αποδόθηκε με τη βοήθεια των

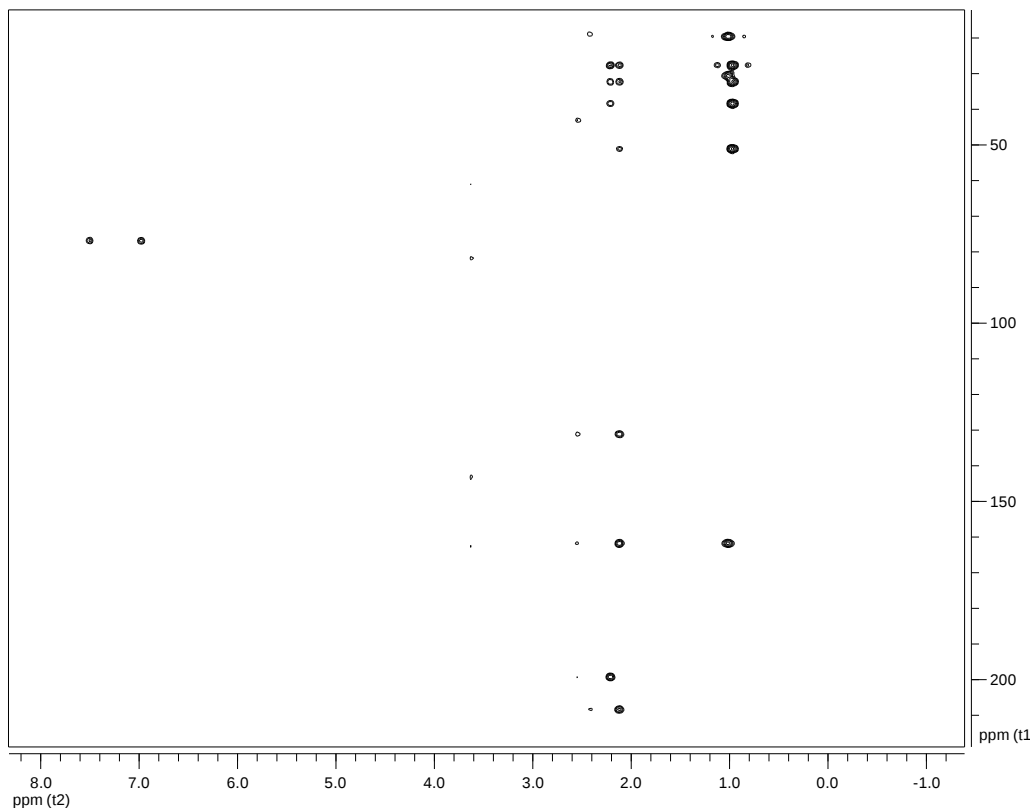
συσχετίσεων (Εικ. 28) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 29), HMBC (Εικ. 30) και COSY (Εικ. 31).



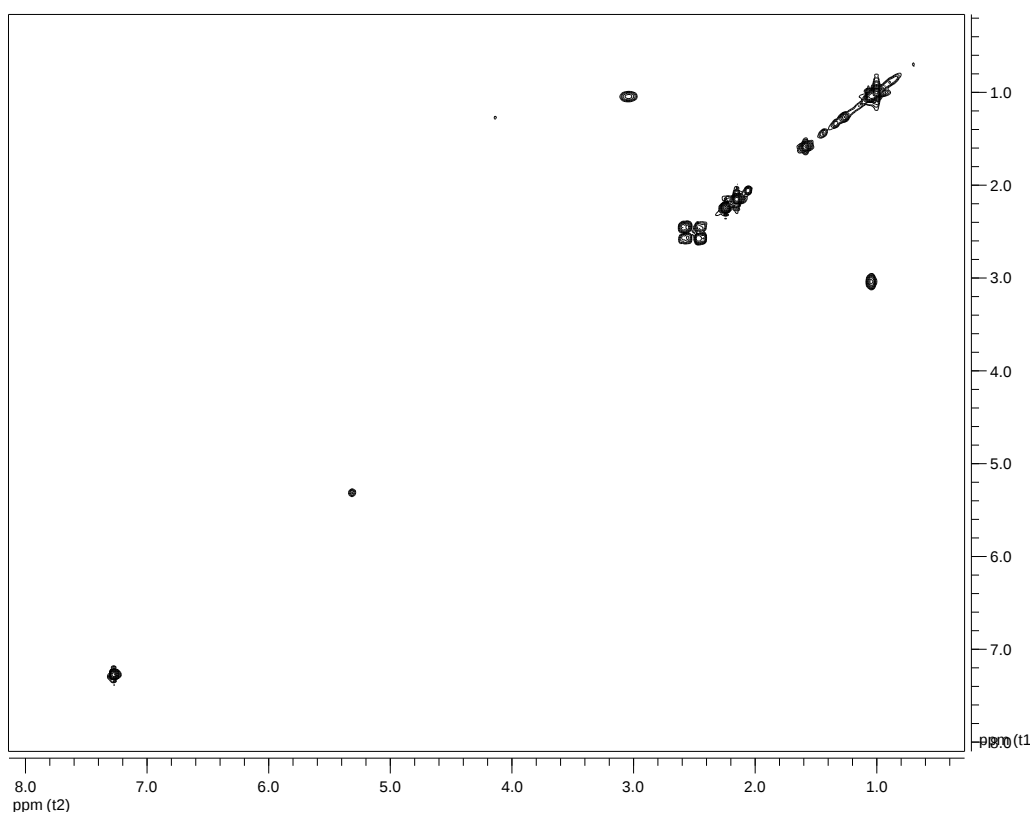
Εικόνα 28. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 7.



Εικόνα 29. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 7.



Εικόνα 30. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7.



Εικόνα 31. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 7.

Στο φάσμα COSY παρατηρήθηκαν συσχετίσεις που υπέδειξαν την ύπαρξη δύο διακριτών συστημάτων spin. Το πρώτο σύστημα αφορά τα πρωτόνια H₂-7 και H₂-8 και το δεύτερο το πρωτόνιο H-11 με τα μεθύλια H₃-12 και H₃-13. Επομένως, οι τεταρτοταγείς άνθρακες πρέπει να παρεμβάλλονται με τέτοιο τρόπο στο μόριο που να εμποδίζουν τη δημιουργία περαιτέρω spin συστημάτων. Ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι συσχετίσεις HMBC μεταξύ: i) του C-5 με τα H-11, H₃-12 και H₃-13 που καθόρισε τη θέση της ισοπροπυλο-ομάδας, ii) του C-5 και C-6 με τα H₂-7 που συνέδεσαν τα δυο συστήματα spin, iii) του C-9 με τα H₂-8 και H₃-10 που καθόρισε τη θέση της μεθυλοκετόνης και iv) του C-1 με τα H₂-2 και H₂-7, του C-3 με τα H₃-14, H₃-15, H₂-2 και H₂-4 και του C-5 με τα H₂-4 που ολοκλήρωσαν τον εξαμελή δακτύλιο.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 7 με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν με πρωτότυπο ανθρακικό σκελετό *seco*-μπραζιλανίου. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 7 παρατίθενται στον Πίν. 76.

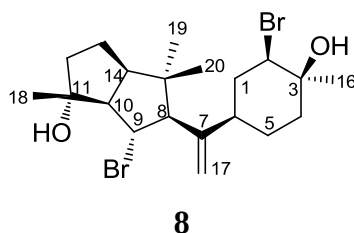
Πίνακας 76. Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H και ¹³C NMR του μεταβολίτη 7 σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ _C	δ _H
1	199.2	-
2	51.0	2.21 brs
3	32.3	-
4	38.4	2.12 brs
5	131.2	-
6	161.7	-
7	19.2	2.54 m
8	43.1	2.41 m
9	208.6	-
10	30.4	2.12 brs
11	30.9	3.00 sept. (6.7)
12	19.6	1.01 d (6.8)
13	19.6	1.01 d (6.8)
14	27.6	0.97 s
15	27.6	0.97 s

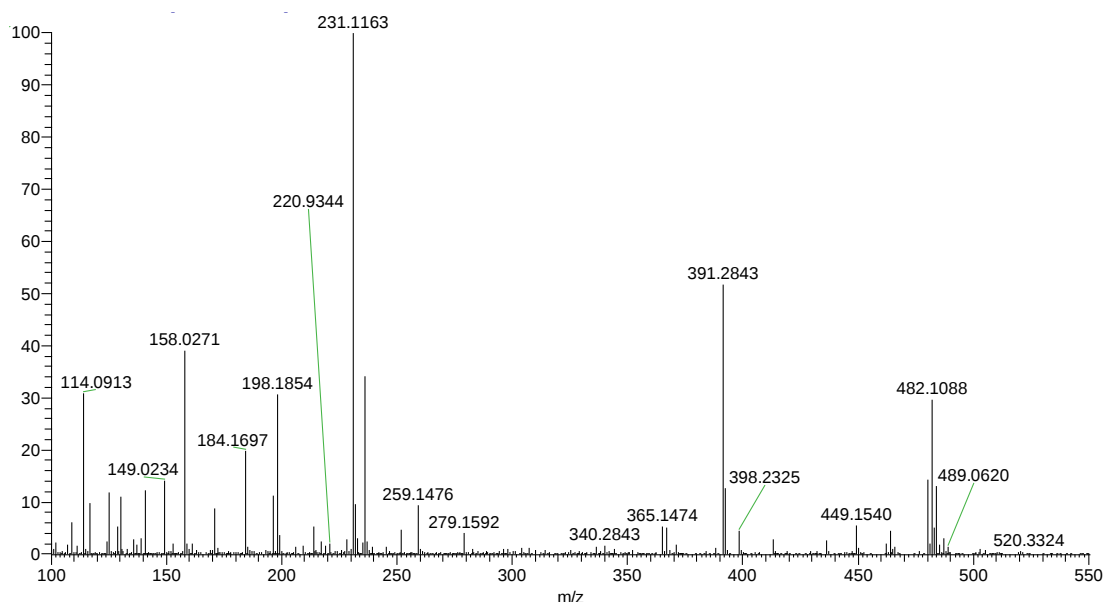
*Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων έχουν μετρηθεί από τα φάσματα HSCQ-DEPT και HMBC.

3.8. Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υποκίτρινο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 41.1 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **8** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{20}H_{32}Br_2O_2$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **8** (Εικ. 32) ψευδομοριακό ιόν $[M+NH_4]^+$ σε m/z 480 και ισοτοπικές κορυφές σε m/z 482 και 484 με σχετική αναλογία 1:2:1, ενδεικτική της ύπαρξης δύο ατόμων βρωμίου.



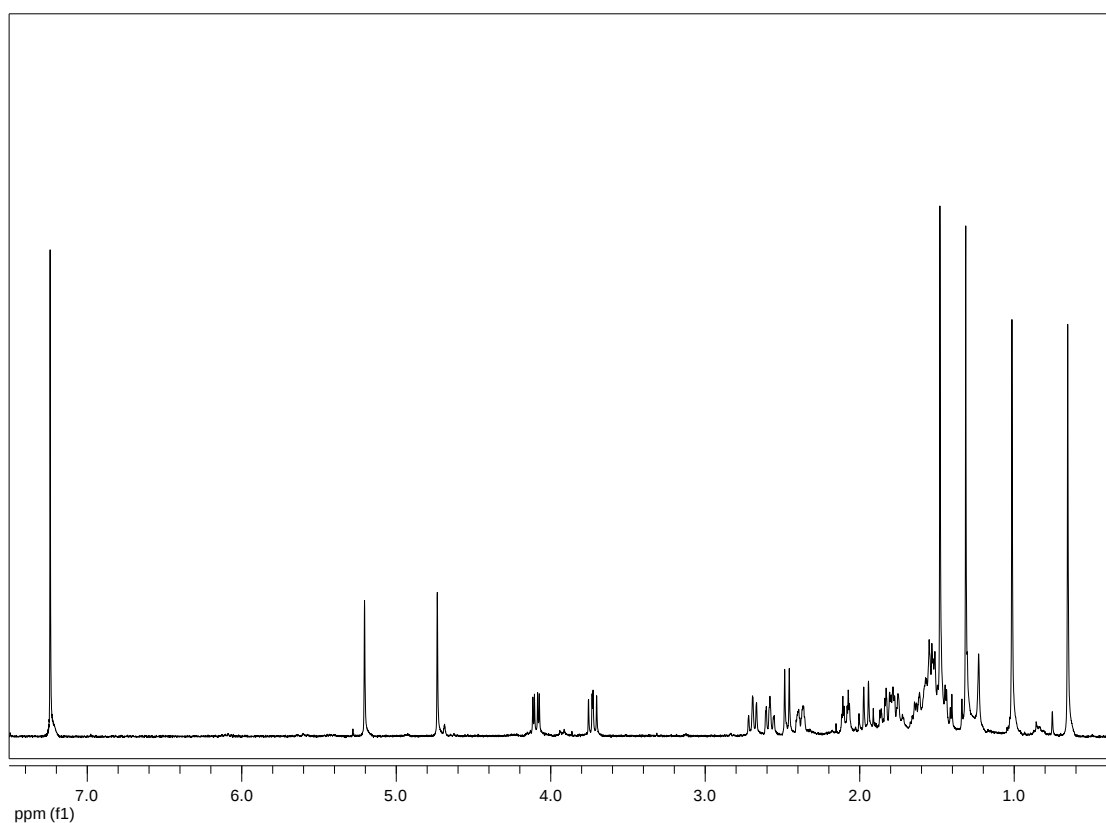
Εικόνα 32. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **8**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **8** (Εικ. 33) παρατηρήθηκαν:

- Δυο απλές κορυφές σε δ 0.65 και 1.01, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων

σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.

- Δυο απλές κορυφές σε δ 1.31 και 1.48, οι οποίες επίσης ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αποθωρακισμένων μεθυλίων σε τεταρτοταγή οξυγονωμένα άτομα άνθρακα.
- Δυο διπλές διπλών κορυφές σε δ 3.73 και 4.10, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν σε δυο αλογονωμένα μεθίνια.
- Δυο απλές κορυφές σε δ 4.73 και 5.20, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν σε δύο εξωμεθυλениκά πρωτόνια.



Εικόνα 33. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8**.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη τον διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως έναν από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι τρικυκλικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **8** με αυτά της βιβλιογραφίας για τρικυκλικά διτερπένια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν νεοροτζιολδιόλη (neorogiolol), το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από τη *L. microcladia* (Guella & Pietra 2000) και έχει απομονωθεί και από τη *L. obtusa* (Ilioroulou et al. 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του

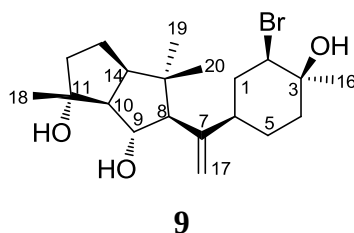
μεταβολίτη **8** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Guella & Pietra 2000) στον Πίν. 77.

Πίνακας 77. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

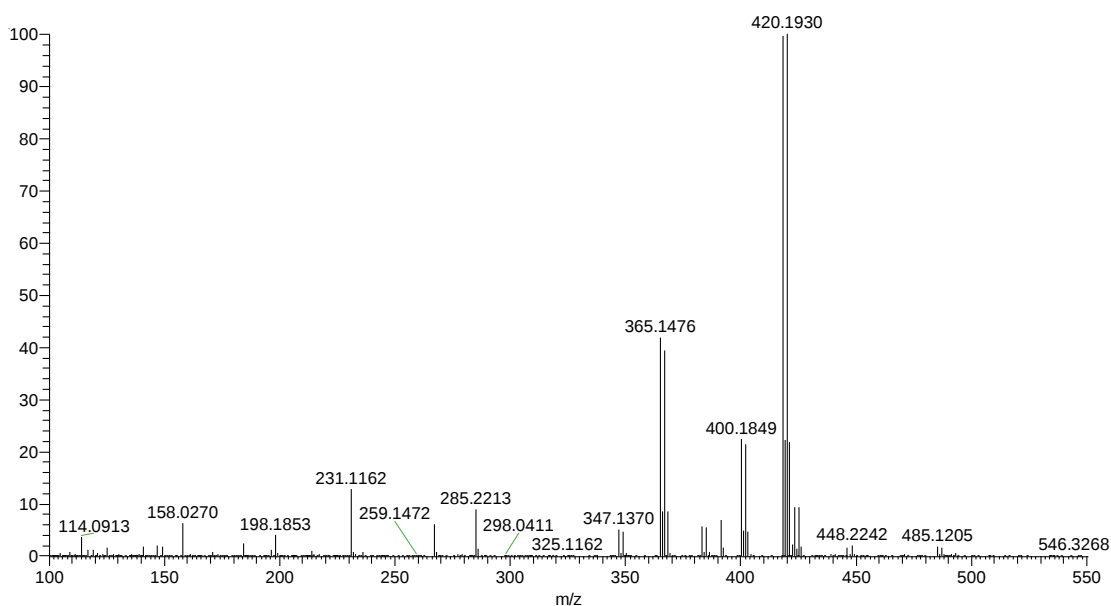
<i>Θέση</i>	<i>Πειραματικά δεδομένα</i>	<i>Βιβλιογραφικά δεδομένα</i>
1 H_{ax}	1.96 q (12.5)	1.97 q (12.6)
1 H_{eq}	2.38 m	2.39 ddd (12.6, 4.3, 2.7)
2	4.10 dd (12.6, 4.3)	4.11 dd (12.6, 4.3)
4 H_{ax}	1.49-1.60 m	1.50 brt (13.3)
4 H_{eq}	2.09 dt (14.0, 3.0)	2.10 dt (13.7, 3.7)
5 H_{eq}	1.49-1.60 m	1.50 ddd (13.7, 3.0, 2.7)
5 H_{ax}	1.73-1.88 m	1.85 brq (13.0)
6	1.73-1.88 m	1.76 tt (12.6, 3.0)
8	2.47 d (12.0)	2.48 d (12.0)
9	3.73 dd (11.9, 9.1)	3.74 dd (12.0, 9.2)
10	2.70 ddd (10.2, 9.8, 1.1)	2.70 ddd (12.5, 9.2, 1.4)
12	1.43 m	1.45 m
13 α	1.49-1.60 m	1.55 m
13 β	1.73-1.88 m	1.78 ddd (13.0, 9.5, 6.8)
14	2.58 ddd (12.6, 9.4, 2.0)	2.59 ddd (12.5, 9.2, 2.1)
16	1.31 s	1.32 s
17a	4.73 s	4.74 s
17b	5.20 s	5.21 s
18	1.48 s	1.49 s
19	1.01 s	1.02 s
20	0.65 s	0.66 s

3.9. Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 16.0 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **9** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{20}H_{33}BrO_3$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **9** (Εικ. 34) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+NH_4]^+$ σε m/z 418 και ισοτοπική κορυφή σε m/z 420 με σχετική αναλογία 1:1, ενδεικτική της ύπαρξης ενός ατόμου βρωμίου.

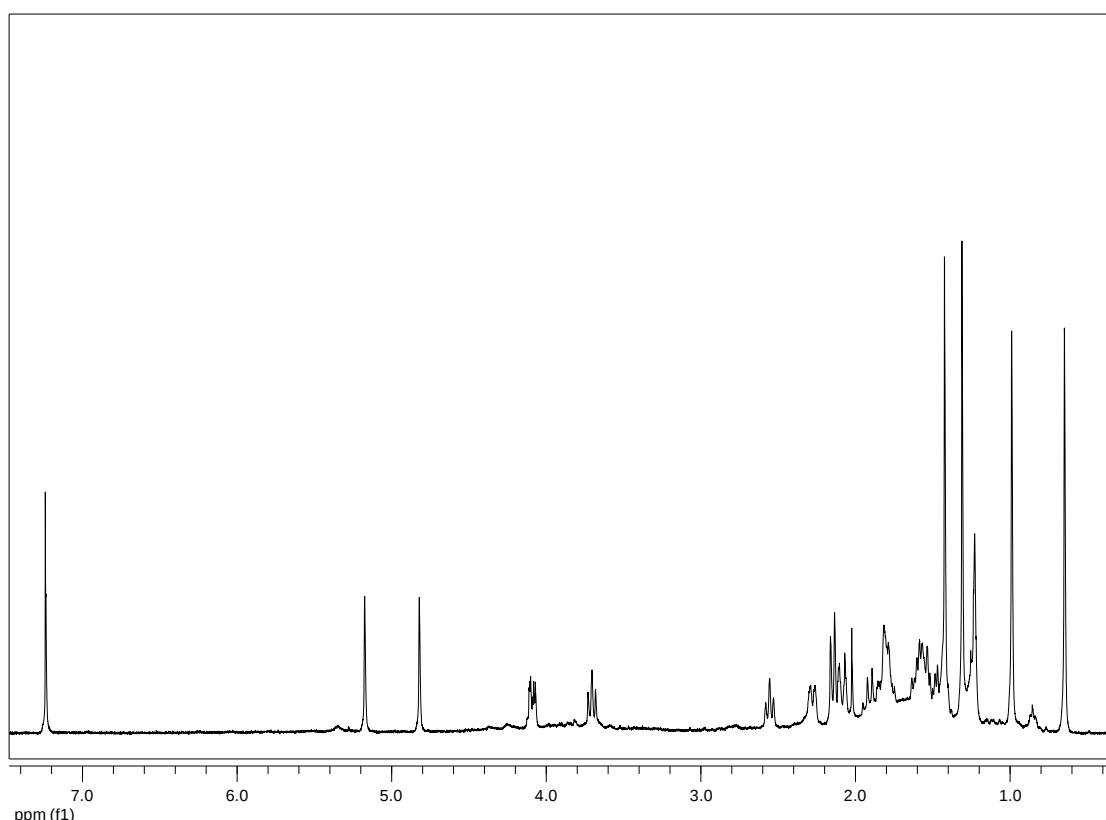


Εικόνα 34. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 35) παρατηρήθηκαν:

- Δυο απλές κορυφές σε δ 0.65 και 0.99, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.

- Δυο απλές κορυφές σε δ 1.31 και 1.42, οι οποίες επίσης ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αποθωρακισμένων μεθυλίων σε τεταρτοταγή οξυγονωμένα άτομα άνθρακα.
- Δυο διπλές διπλών κορυφές σε δ 3.70 και 4.09, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν σε δυο αλογονωμένα μεθίνια.
- Δυο απλές κορυφές σε δ 4.82 και 5.18, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.



Εικόνα 35. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9**.

Με βάση τα ανωτέρω, υπολογίστηκε ότι το μόριο έχει βαθμό ακορεστότητας $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη το διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως έναν από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι τρικυκλικό.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **9** παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του **8**. Στο φάσμα ^1H NMR οι κυριότερες διαφορές εντοπίζονται στα σήματα των H-8 και H-10 που εμφανίζονται σε ελαφρώς υψηλότερα πεδία σε σχέση με τις αντίστοιχες κορυφές στη νεοροτζίολδιόλη (μεταβολίτης **8**). Επιπλέον, οι κορυφές των H-17a και H₃-18 εμφανίζονται ελαφρώς μετατοπισμένες. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη και τα δεδομένα από το φάσμα μάζας του μορίου, ο

μεταβολίτης **9** πιθανά διαφοροποιείται λόγω της παρουσίας ενός μόνο ατόμου βρωμίου στο μόριο.

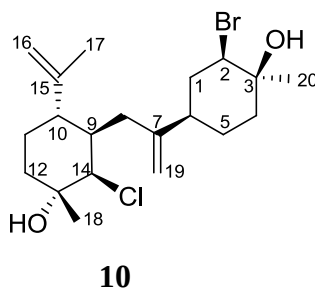
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν νεοροτζιολτριόλη (neorogioltriol), το οποίο απομονώθηκε από τη *L. glandulifera* και έχει εμφανίσει αναλγητική και αντιφλεγμονώδη δράση *in vitro* και *in vivo* (Chatter et al. 2009, Chatter et al. 2011). Η διαφορά της νεοροτζιολτριόλης σε σχέση με τον μεταβολίτη **8** είναι η αντικατάσταση του Br στον C-9 από μία υδροξυλομάδα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Chatter et al. 2009) στον Πίν. 78.

Πίνακας 78. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

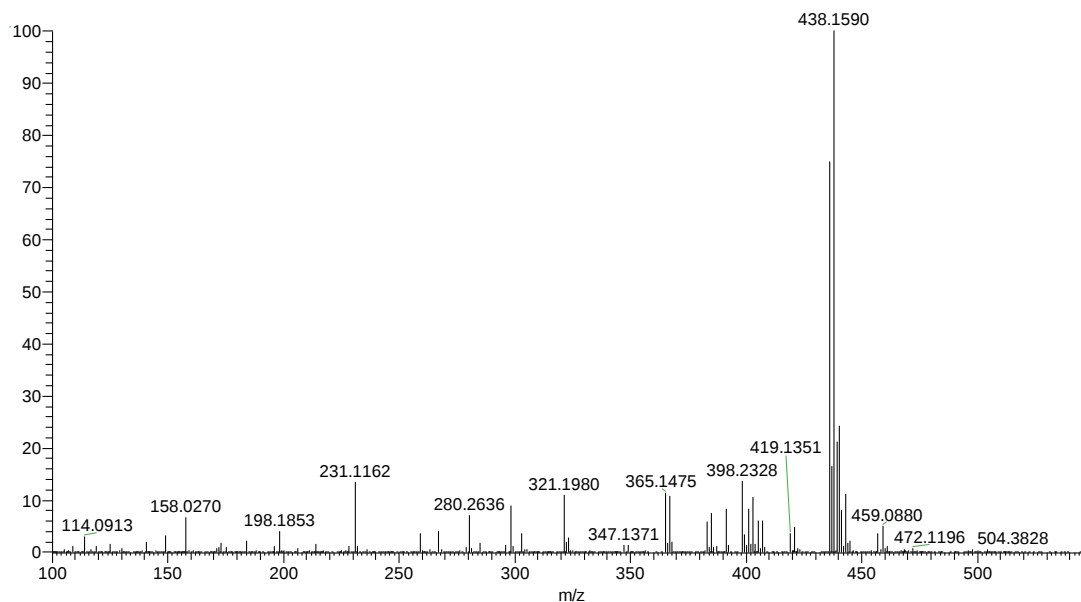
Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1 α	2.28 m	2.28 m
1 β	1.92 m	1.92 m
2	4.09 dd (11.5, 3.5)	4.09 dd (12.0, 3.8)
4 α	2.07 m	2.08 m
4 β	1.44-1.64 m	1.44 m
5 α	1.44-1.64 m	1.57 m
5 β	1.74-1.87 m	1.80 m
6	1.74-1.87 m	1.79 m
8	2.15 d (10.6)	2.15 d (10.5)
9	3.70 dd (10.8, 9.1)	3.70 dd (10.5, 9.5)
10	2.14 m	2.13 dd (10.2, 9.5)
12 α		1.44 m
12 β	1.44-1.64 m	1.56 m
13 α		1.80 m
13 β	1.74-1.87 m	1.74 m
14	2.56 brt (10.0)	2.55 m
16	1.31 s	1.31 s
17a	4.82 s	4.82 s
17b	5.18 s	5.17 s
18	1.42 s	1.42 s
19	0.99 s	0.98 s
20	0.65 s	0.64 s

3.10. Μεταβολίτης 10

Ο μεταβολίτης **10** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.8 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **10** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{20}H_{32}BrClO_2$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **10** (Εικ. 36) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+NH_4]^+$ σε m/z 436 και ισοτοπικές κορυφές σε m/z 438 και 440 με σχετική αναλογία 3:4:1, ενδεικτική της ύπαρξης ενός ατόμου χλωρίου και ενός ατόμου βρωμίου.



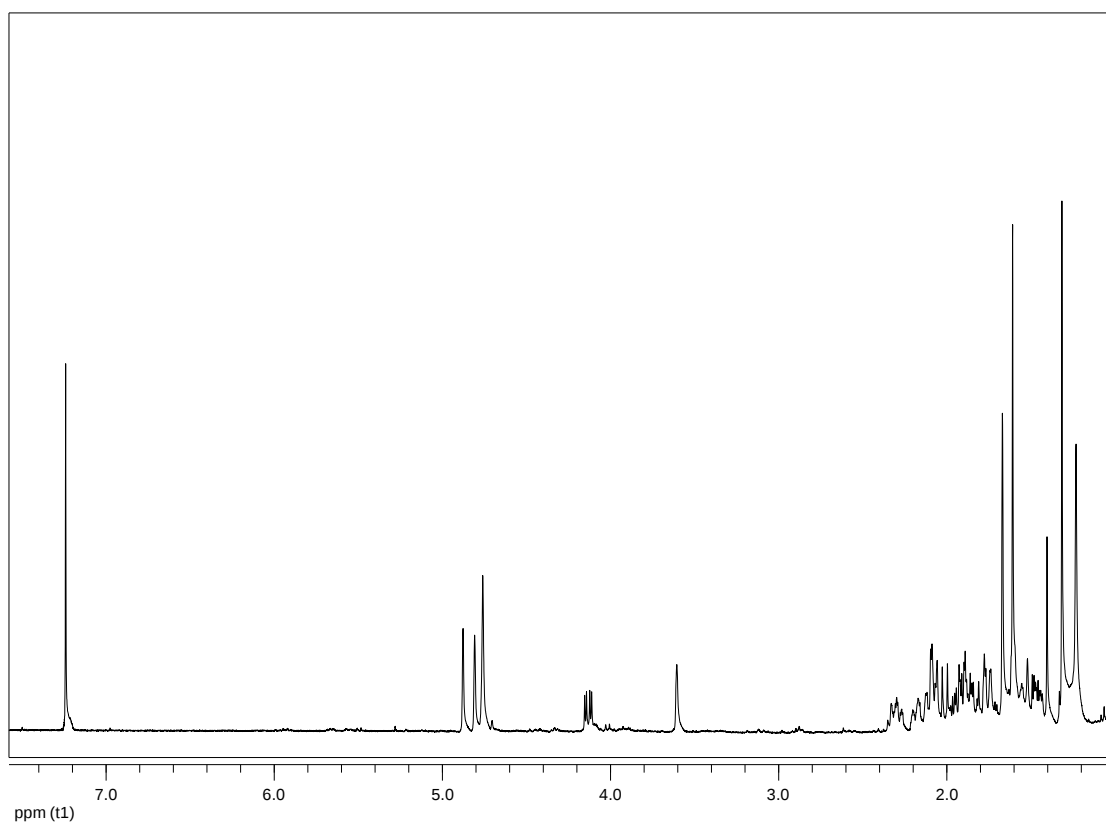
Εικόνα 36. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **10**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **10** (Εικ. 37) παρατηρήθηκαν:

- Δυο απλές κορυφές σε δ 1.32 και 1.61, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αποθωρακισμένων

μεθυλίων σε τεταρτοταγή οξυγονωμένα άτομα άνθρακα.

- Μια απλή κορυφή σε δ 1.67, η οποία επίσης ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός ολεφινικού μεθυλίου.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.61 και μια διπλή διπλών κορυφή στα 4.13 ppm, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια δυο αλογονωμένων μεθινίων.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.76 που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενικού άνθρακα.
- Δυο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.81 και 4.88, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν επίσης σε δύο εξωμεθυλενικά πρωτόνια.



Εικόνα 37. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **10**.

Με βάση τα ανωτέρω, ο βαθμός ακορεστότητας του μορίου υπολογίστηκε σε $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη τους δυο διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα ως δυο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι δικυκλικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **10** με αυτά της βιβλιογραφίας για δικυκλικά διτερπένια με δυο εξωμεθυλένια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν πρεβεζόλη C (prevezol C), το

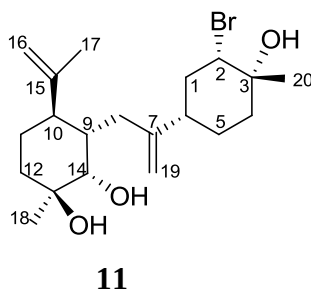
οποίο απομονώθηκε από τη *L. obtusa* και έχει ελεγχθεί ως προς την κυτταροτοξική του δράση (Πιιουρλου et al. 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Πιιουρλου et al. 2003) στον Πίν. 79.

Πίνακας 79. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **10** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

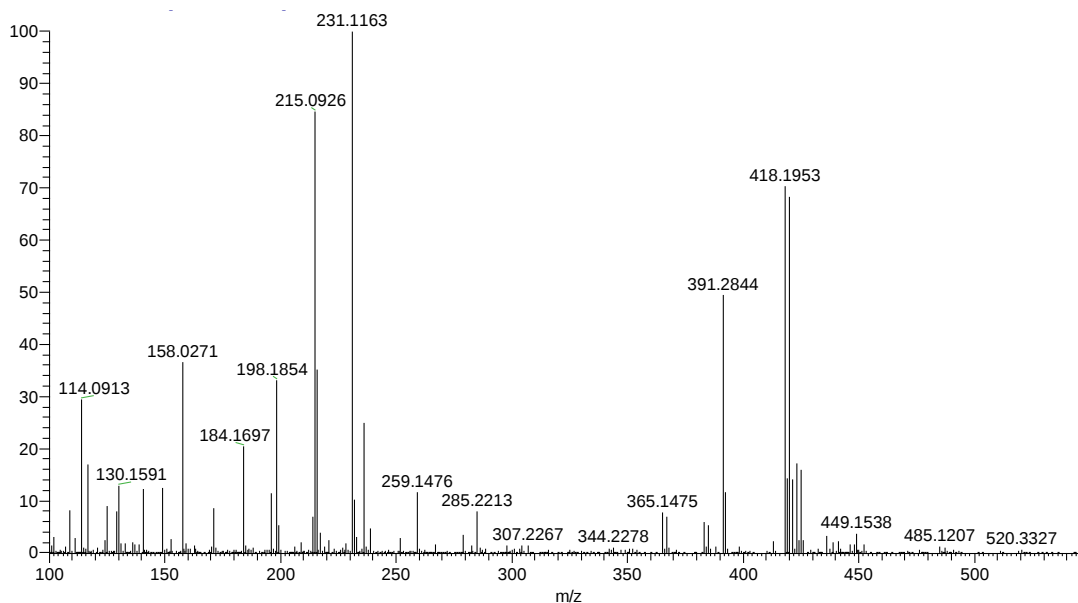
<i>Θέση</i>	<i>Πειραματικά δεδομένα</i>	<i>Βιβλιογραφικά δεδομένα</i>
1 α	2.18 m	2.18 m
1 β	2.01 m	2.01 m
2	4.13 dd (12.2, 4.4)	4.13 dd (12.3, 4.1)
4 α	1.52 m	1.52 m
4 β	2.05-2.14 m	2.07 m
5 α	1.56 m	1.55 m
5 β	1.77 m	1.76 m
6	1.84-1.97 m	1.91 m
8a	2.05-2.14 m	2.10 m
8b	1.84-1.97 m	1.88 m
9	2.30 (brt 11.7)	2.29 brt (11.8)
10	2.05-2.14 m	2.09 m
11 α	1.84-1.97 m	1.84 m
11 β	1.46 m	1.46 m
12 α	1.74 m	1.75 m
12 β	1.84-1.97 m	1.96 m
14	3.61 brs	3.60 d (4.4)
16	4.76 brs	4.75 brs
17	1.67 s	1.66 s
18	1.61 s	1.60 s
19a	4.81 brs	4.80 brs
19b	4.88 brs	4.87 brs
20	1.32 s	1.31 s

3.11. Μεταβολίτης 11

Ο μεταβολίτης **11** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως σκούρο κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 4.5 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **11** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{20}H_{33}BrO_3$.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **11** (Εικ. 38) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+NH_4]^+$ σε m/z 418 και ισοτοπική κορυφή σε m/z 420 με σχετική αναλογία 1:1, ενδεικτική της ύπαρξης ενός ατόμου βρωμίου.



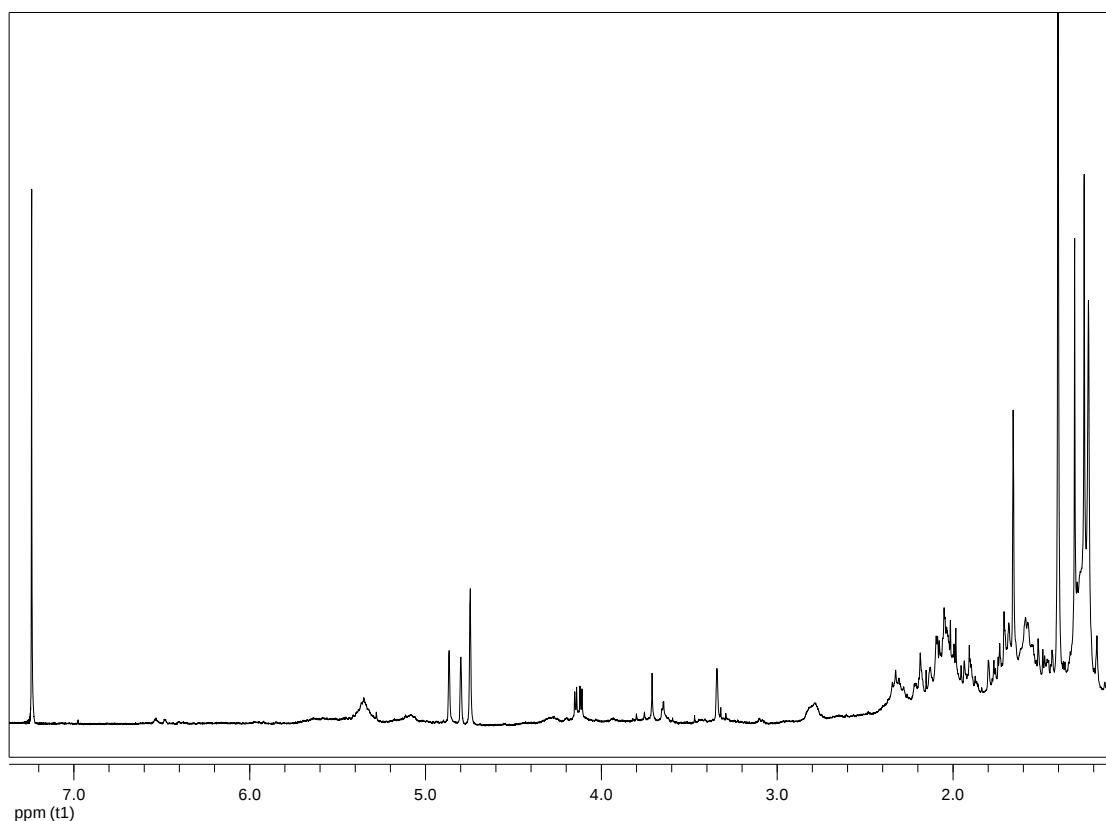
Εικόνα 38. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **11**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **11** (Εικ. 39) παρατηρήθηκαν:

- Δυο απλές κορυφές σε δ 1.25 και 1.31, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αποθωρακισμένων

μεθυλίων σε τεταρτοταγή οξυγονωμένα άτομα άνθρακα.

- Μια απλή κορυφή σε δ 1.66 η οποία επίσης ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός ολεφινικού μεθυλίου.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.34 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινικού άνθρακα.
- Μια διπλή διπλών κορυφή στα 4.13 ppm, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός αλογονωμένου μεθινίου.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.75 που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Δυο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.80 και 4.87, οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν επίσης σε δύο εξωμεθυλενικά πρωτόνια.



Εικόνα 39. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11**.

Με βάση τα ανωτέρω, ο βαθμός ακορεστότητας του μορίου υπολογίστηκε σε $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη τους δυο διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα ως δυο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι δικυκλικό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **11** παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με

αυτά του μεταβολίτη **10**. Οι κυριότερες διαφορές αφορούν τα σήματα του μεθυλίου H₃-18 και του μεθινίου H-14, τα οποία εντοπίζονται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με τις αντίστοιχες κορυφές στο φάσμα ¹H NMR της πρεβεζόλης C. Με αυτή τη διαφοροποίηση πιθανά σχετίζεται η αντικατάσταση του χλωρίου από ένα υδροξύλιο στον μεταβολίτη **11**, όπως υποδεικνύεται από το φάσμα μάζας.

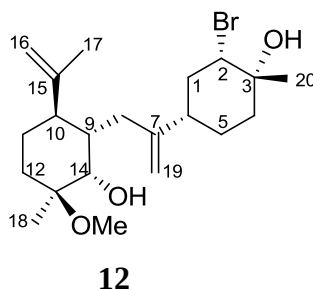
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **11** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το φυσικό προϊόν πρεβεζόλη C₁ (prevezol C₁), η οποία πρόσφατα απομονώθηκε από τη *L. glandulifera* (Κονιδάρης 2015). Το μόριο αυτό όμως, έχει προκύψει συνθετικά στο παρελθόν και έχει ελεγχθεί ως προς την κυτταροτοξική του δράση χωρίς να εμφανίσει ιδιαίτερη δραστικότητα (Leung et al. 2013, Leung et al. 2014). Η διαφορά της πρεβεζόλης C₁ από τον μεταβολίτη **10** εντοπίζεται στην αλλαγή του υποκαταστάτη στον C-14. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Κονιδάρης 2015) στον Πίν. 80.

Πίνακας 80. Φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H NMR του μεταβολίτη **11** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

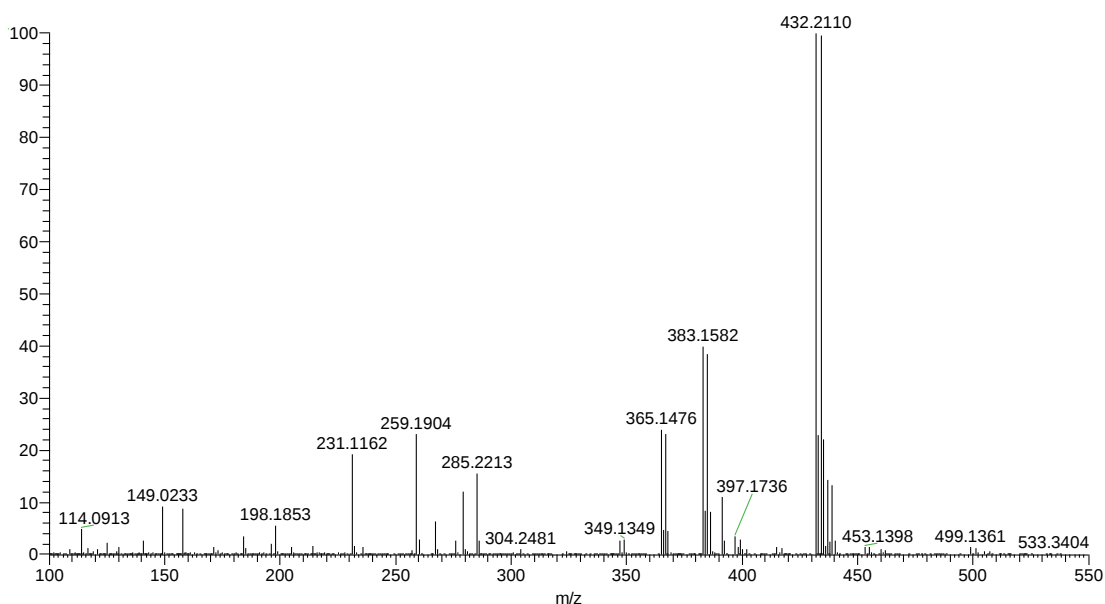
Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1	1.99 m 2.19 m	1.99 m 2.19 m
2	4.13 dd (12.1, 4.4)	4.13 dd (12.1, 4.4)
4	1.45-1.49 m 2.03-2.07 m	1.48 m 2.06 m
5	1.52 m 1.74 m	1.52 m 1.73 m
6	1.89-1.91 m	1.90 m
8	1.89-1.91 m 2.09 m	1.91 m 2.09 m
9	2.03-2.07 m	2.03 m
10	2.03-2.07 m	2.06 m
11	1.45-1.49 m 1.71 m	1.46 m 1.70 m
12	1.37 m 1.64 m	1.39 m 1.64 m
14	3.34 brs	3.33 brs
16	4.75 brs	4.74 s
17	1.66 s	1.65 s
18	1.25 s	1.25 s
19	4.80 brs 4.87 brs	4.79 brs 4.86 brs
20	1.31 s	1.30 s

3.12. Μεταβολίτης 12

Ο μεταβολίτης **12** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 4.3 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **12** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{21}H_{35}BrO_3$.



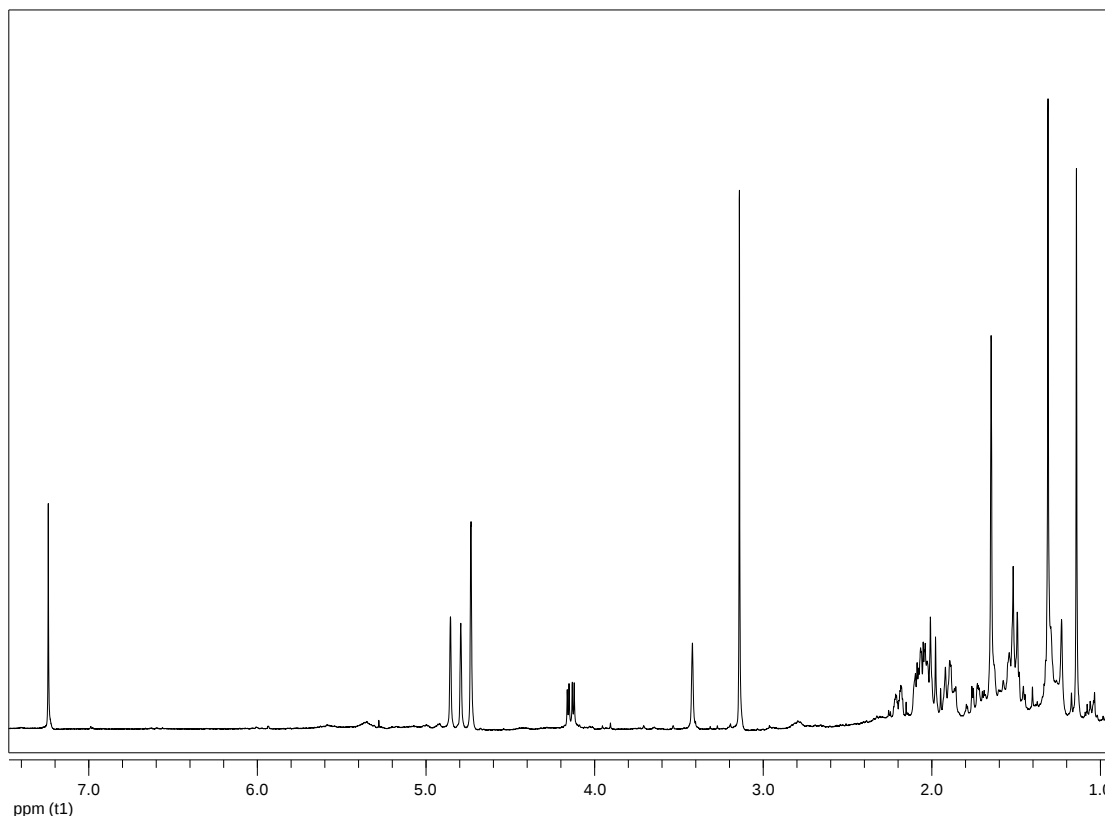
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **12** (Εικ. 40) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+NH_4]^+$ σε m/z 432 και ισοτοπική κορυφή σε m/z 434 με σχετική αναλογία 1:1, ενδεικτική της ύπαρξης ενός ατόμου βρωμίου. Επίσης, εμφανίστηκε θραύσμα προϊόν απόσπασης μιας μεθοξυ-ομάδας $[M-OMe]^+$ σε m/z 383 και ισοτοπική κορυφή σε m/z 385.



Εικόνα 40. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **12**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **12** (Εικ. 41) παρατηρήθηκαν:

- Δυο απλές κορυφές σε δ 1.14 και 1.31, οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αποθωρακισμένων μεθυλίων σε τεταρτοταγή οξυγονωμένα άτομα άνθρακα.
- Μια απλή κορυφή σε δ 1.65 η οποία επίσης ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός ολεφινικού μεθυλίου.
- Μια απλή κορυφή σε δ 3.14, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί σε μεθύλιο μιας μεθοξυ-ομάδας.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.42 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινικού άνθρακα.
- Μια διπλή διπλών κορυφή στα 4.14 ppm, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός αλογονωμένου μεθινίου.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.73 που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Δυο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.80 και 4.86, οι οποίες αντιστοιχούν επίσης σε δύο εξωμεθυλενικά πρωτόνια.



Εικόνα 41. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **12**.

Με βάση τα ανωτέρω, ο βαθμός ακορεστότητας του μορίου υπολογίστηκε σε $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη τους δυο διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα ως δυο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα πρέπει να είναι δικυκλικό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **12** παρουσίαζαν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του μεταβολίτη **11** με κυριότερη διαφορά την παρουσία μίας μεθοξυ-ομάδας όπως φαίνεται από το φάσμα ^1H NMR.

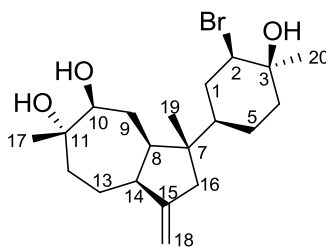
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **12** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για γνωστό φυσικό προϊόν μέθυλο-πρεβεζόλη C_{13} , το οποίο απομονώθηκε πρόσφατα από τη *L. glandulifera* (Κονιδάρης 2015) και αποτελεί το μεθυλο-ανάλογο του μεταβολίτη **11** στον C-13. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **12** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Κονιδάρης 2015) στον Πίν. 81.

Πίνακας 81. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **12** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	Πειραματικά δεδομένα	Βιβλιογραφικά δεδομένα
1	1.98 m	1.97 m
	2.20 m	2.19 m
2	4.14 dd (12.1, 4.4)	4.13 dd (12.0, 4.3)
4	1.48-1.53 m	1.47 m
	2.02-2.12 m	2.05 m
5	1.48-1.53 m	1.51 m
	1.72 m	1.73 m
6	1.85-1.91 m	1.87 m
8	1.85-1.91 m	1.88 m
	2.02-2.12 m	2.06 m
9	1.99-2.02 m	1.99 m
10	1.99-2.02 m	2.01 m
11	1.29 m	1.28 m
	1.48-1.53 m	1.50 m
12	1.48-1.53 m	1.51 m
	1.63 m	1.63 m
14	3.42 brs	3.40 brs
16	4.73 brs	4.72 brs
17	1.65 s	1.63 s
18	1.14 s	1.13 s
19	4.80 brs	4.78 brs
	4.86 brs	4.84 brs
20	1.31 s	1.29 s
21	3.14 s	3.12 s

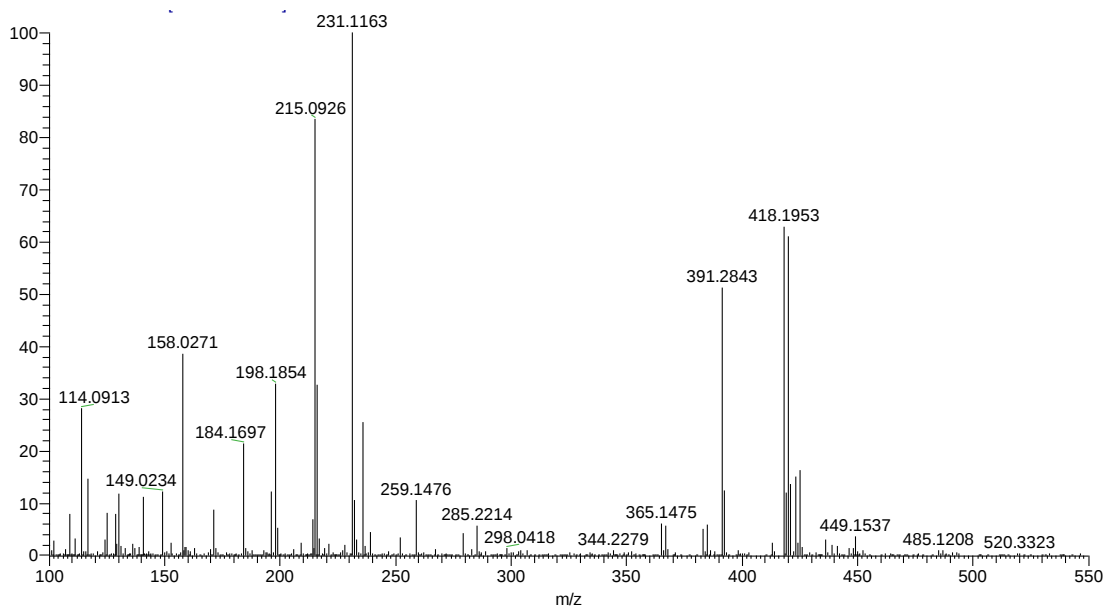
3.13. Μεταβολίτης 13

Ο μεταβολίτης **13** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.8 mg. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **13** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{20}H_{33}BrO_3$.



13

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **13** (Εικ. 42) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+NH_4]^+$ σε m/z 418 και ισοτοπική κορυφή σε m/z 420 με σχετική αναλογία 1:1, ενδεικτική της ύπαρξης ενός ατόμου βρωμίου.



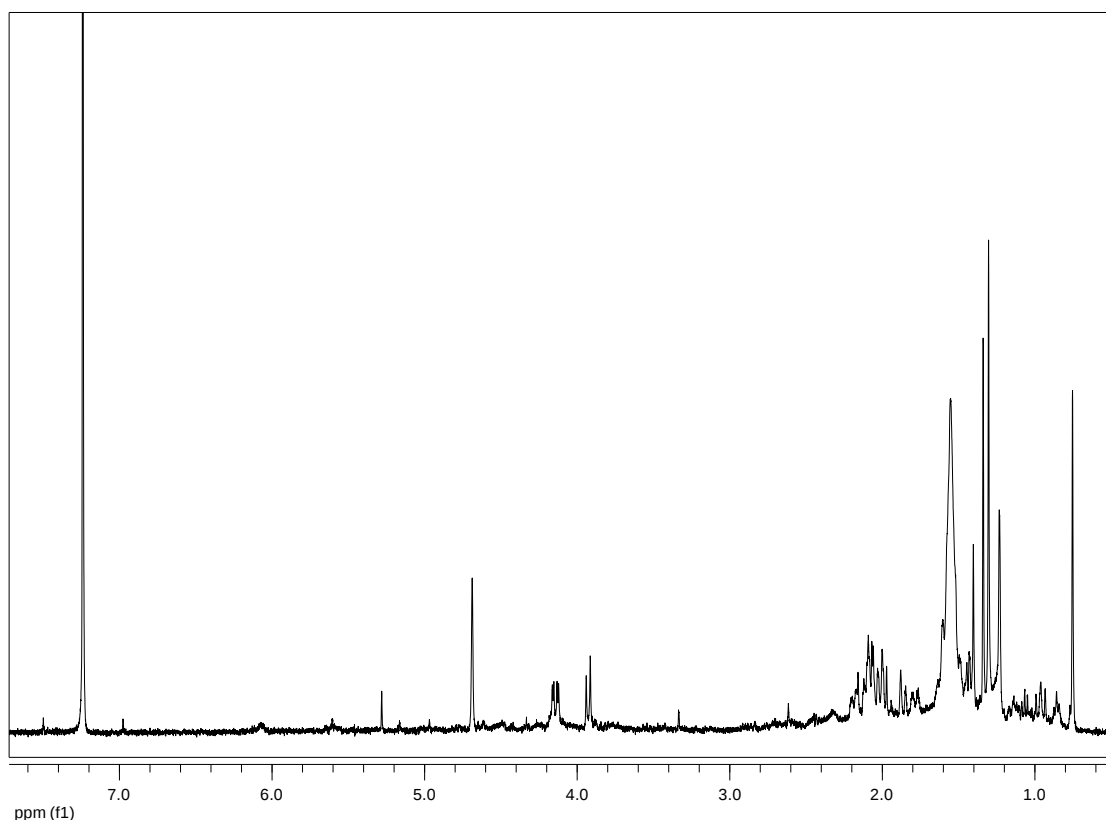
Εικόνα 42. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **13**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **13** (Εικ. 43) παρατηρήθηκαν:

- Μια απλή κορυφή σε δ 0.76, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και

αντιστοιχεί σε πρωτόνια ενός αλειφατικού μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.

- Δυο απλές κορυφές σε δ 1.30 και 1.34, οι οποίες επίσης ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν σε πρωτόνια δυο αποθωρακισμένων μεθυλίων σε τεταρτοταγή οξυγονωμένα άτομα άνθρακα.
- Μια διπλή κορυφή σε δ 3.93, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου άνθρακα.
- Μια διπλή διπλών κορυφή στα 4.14 ppm, η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο ενός αλογονωμένου μεθινίου.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 4.69 που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενικού άνθρακα.



Εικόνα 43. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **13**.

Με βάση τα ανωτέρω, ο βαθμός ακορεστότητας του μορίου υπολογίστηκε σε $\Omega=4$. Λαμβάνοντας υπόψη το διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα ως έναν από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **13** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το

γνωστό φυσικό προϊόν πρεβεζόλη E (prevezol E), το οποίο απομονώθηκε από τη *L. obtusa* και έχει ελεγχθεί ως προς την κυτταροτοξική του δράση, χωρίς όμως να εμφανίσει δραστηριότητα (Πιιουρούλου et al. 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **13** παρατίθενται με αυτά της βιβλιογραφίας (Πιιουρούλου et al. 2003) στον Πίν. 82.

Πίνακας 82. Φασματοσκοπικά δεδομένα ^1H NMR του μεταβολίτη **13** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

<i>Θέση</i>	<i>Πειραματικά δεδομένα</i>	<i>Βιβλιογραφικά δεδομένα</i>
1	1.96-2.02 m	2.01 m
	2.19 m	2.18 m
2	4.14 dd (12.3, 4.3)	4.14 dd (12.3, 4.4)
4	1.51-1.63 m	1.60 m
	2.03-2.12 m	2.05 m
5	1.51-1.63 m	1.55 m
6	1.14 m	1.12 m
8	0.97 m	0.95 m
9	1.51-1.63 m	1.59 m
	2.03-2.12 m	2.08 m
10	3.93 d (10.5)	3.92 d (10.6)
12	1.48 m	1.47 m
	2.03-2.12 m	2.06 m
13	1.79 m	1.78 m
14	1.51-1.63 m	1.60 m
16	1.87 d (12.2)	1.86 d (12.3)
	1.96-2.02 m	2.02 m
17	1.34 s	1.33 s
18	4.69 brs	4.68 brs
19	0.76 s	0.75 s
20	1.30 s	1.30 s

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση του οργανικού εκχυλίσματος του ροδοφύκου *Laurencia glandulifera*, δείγμα του οποίου συλλέχθηκε από την περιοχή Βάτσα της Κεφαλονιάς σε βάθος 0,5-2 m τον Ιούνιο του 2015.

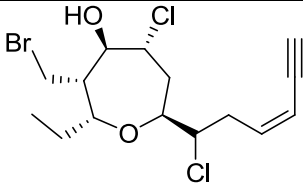
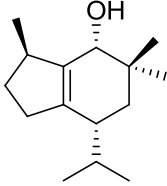
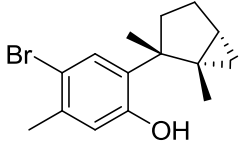
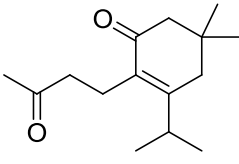
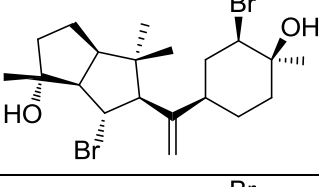
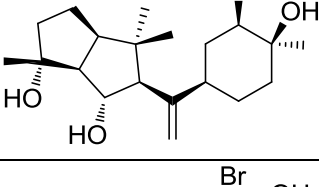
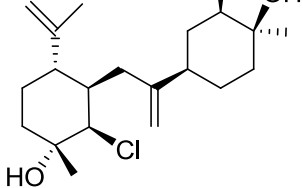
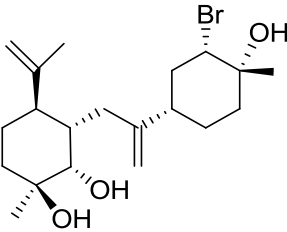
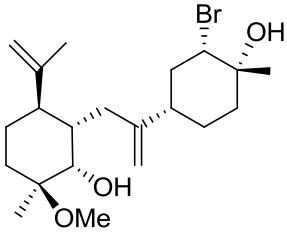
Από το οργανικό του εκχύλισμα απομονώθηκαν με χρωματογραφικούς διαχωρισμούς 31 δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων μέχρι στιγμής ταυτοποιήθηκαν οι 13 μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS.

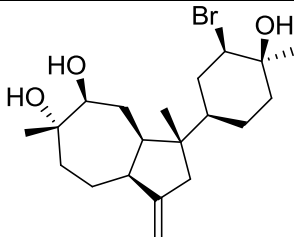
Συγκεκριμένα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν:

- i. τέσσερις C₁₅ ακετογενίνες, τρεις με οκταμελή δακτύλιο τύπου λαουρενανίου (**1-3**) και μια με διακλαδισμένο επταμελή δακτύλιο (**4**)
- ii. τρία σεσκιτερπένια, ένα μπραζιλανικού (**5**), ένα λαουρανικού τύπου (**6**) και ένα νέο φυσικό προϊόν με πρωτότυπο ανθρακικό σκελετό *seco*-μπραζιλανίου (**7**)
- iii. έξι διτερπένια, από τα οποία δυο με σκελετό νεοροτζίολανίου (**8, 9**), τρία με σκελετό πρεβεζόλης A (**10-12**) και ένα με σκελετό πρεβεζόλης D (**13**).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι απομονωθέντες μεταβολίτες.

Μεταβολίτης	Δομή
1	
2	
3	

4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	

13	 The chemical structure is a complex polycyclic molecule. It features a central five-membered ring fused to two six-membered rings. The leftmost six-membered ring has two hydroxyl groups (HO) attached to adjacent carbons, one with a wedge bond and the other with a dash bond. The central five-membered ring has a double bond and a methyl group (represented by a wedge bond). The rightmost six-membered ring has a bromine atom (Br) and a hydroxyl group (OH) attached to adjacent carbons, both with wedge bonds. There are also methyl groups (wedge bonds) on the central and rightmost rings.
----	---

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amico V., Caccamese S., Neri P., Russo G., Foti M. Brasilane-type sesquiterpenoids from the Mediterranean red alga *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1921-1927.
- Aydoğmuş Z., Imre S., Ersoy L., Wray V. Halogenated secondary metabolites from *Laurencia obtusa*. *Nat. Prod. Res.*, **2004**, 18, 43-49.
- Beutler J.A. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, **2009**, 46, 9.11. 11-19.11. 21.
- Bittner M., Gonzalez F., Valdebenito H., Silva M., Paul V.J., Fenical W., Chen M.H.M., Clardy J. A novel tetracyclic polyketal from the marine red alga *Laurencia chilensis*. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4031-4032.
- Borlase W. *The Natural History of Cornwall*; E. & W. Books: Oxford, UK, **1758**
- Cabrita M.T., Vale C., Rauter A.P. Halogenated compounds from marine algae. *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 2301-2317.
- Caccamese S., Azzolina R., Duesler E.N., Paul I.C., Rinehart K.L. Laurencienyne, a new acetylenic cyclic ether from the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2299-2302.
- Caccamese S., Toscano R.M., Cerrini S., Gavuzzo E. Laurencianol, a new halogenated diterpenoid from marine alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 3415-3418.
- Carte B.K. Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, **1996**, 46, 271-286.
- Cassano V., Oliveira M.C., Gil-Rodríguez M.C., Senties A., Díaz-Larrea J., Fujii M.T. Molecular support for the establishment of the new genus *Laurenciella* within the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, **2012**, 55, 349-357
- Chatter R., Kladi M., Tarhouni S., Maatoug R., Kharrat R., Vagias C., Roussis V. Neorogioltriol: a brominated diterpene with analgesic activity from *Laurencia glandulifera*. *Phytochem. Lett.*, **2009**, 2, 25-28.
- Chatter R., Othman R.B., Rabhi S., Kladi M., Tarhouni S., Vagias C., Roussis V., Lamia Guizane-Tabbane L., Kharrat R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from the red algae *Laurencia glandulifera*. *Mar. Drugs*, **2011**, 9, 1293-1306.

- Cline J., Braman J.C., Hogrefe H.H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 3546-3551.
- Cole K.M., Sheath R.G. *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, **1990**.
- Colegate S.M., Molyneux R.J. *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. CRC press, Boca Raton, **2007**.
- Coll J.C., Wright A.D. Tropical marine algae. IV. Novel metabolites from the red alga *Laurencia implicata* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). *Aust. J. Chem.*, **1989**, 42, 1685-1693.
- Cragg G.M., Newman D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.*, **2005**, 77, 7-24.
- Cronquist A. *Introductory botany*, Harper & Row, New York, **1971**.
- Dančík V., Seiler K.P., Young D.W., Schreiber S.L., Clemons P.A.. Distinct biological network properties between the targets of natural products and disease genes. *J. Amer. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 9259.
- David B., Wolfender J.-L., Dias D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.*, **2015**, 14, 299-315.
- Dewick P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, Chichester, England, **2002**.
- Dias D.A., Urban S., Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2012**, 2, 303-336.
- Faulkner D.J. Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **2000**, 77, 135-145.
- Fenical W., Howard B., Gifkins K.B., Clardy J. Irieol A and Iriediol; Dibromoditerpenes of a new skeletal class from *Laurencia*. *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 46, 3983-3986.
- Fenical W., Jensen P.R., Palladino M.A., Lam K.S., Lloyd G.K., Potts B.C. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorgan. Med Chem.*, **2009**, 17, 2175-2180.
- Fernández J.J., Souto M.L., Norte M. Marine polyether triterpenes. *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, 17, 235-246.
- Francis C., Bolton J.J., Mattio L., Mandiwana-Neudani T.G., Anderson R.J. Molecular systematics reveals increased diversity within the South African *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.*, **2017**, in press.
- Francis C.M., Systematics of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in

southern Africa. PhD Thesis, Department of Biological Sciences, University of Cape Town, South Africa, **2014**.

Fromm J.R., McEarchern J.A., Kennedy D., Thomas A., Shustov A.R., Gopal A.K.,. Clinical binding properties, internalization kinetics, and clinicopathologic activity of brentuximab vedotin: an antibody-drug conjugate for CD30-positive lymphoid neoplasms. *Cl. Lymph. Myelom. Leuk.*, **2012**, 12, 280-283.

Fujii M.T., Cassano V., Senties A., Díaz-Larrea J., Machín-Sánchez M., Candelaria Gil-Rodríguez M. Comparative analysis of the *corps en cerise* in several species of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) from the Atlantic Ocean. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.*, **2012**, 22, 795-804.

Fukuzawa A., Kurosawa E., Laurallene, new bromoallene from the marine red alga *Laurencia nipponica* Yamada. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 2797-2800.

Fukuzawa A., Kurosawa E., Laurepoxide, new bromo ether from the marine red alga *Laurencia nipponica* Yamada. *Tetrahedron Lett*, **1980**, 21, 1471-1474.

Garbary D., Harper J. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie Algol.*, **1998**, 19, 185-200.

Gerwick W.H., Moore B.S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.*, **2012**, 19 85-98.

González A.G., Aguiar J.M., Darias J., González E., Martín J.D., Martín V.S., Pérez C., Fayos J., Martínez-Ripoli M. Perforenol, a new polyhalogenated sesquiterpene from *Laurencia perforata*. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 19, 3931-3934.

Gonzalez A.G., Ciccio J.F., Rivera A.P., Martin J.D. New halogenated diterpenes from the red alga *Laurencia perforata*. *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1261-1264.

Gonzalez A.G., Martin J.D., Martin V.S., Perez R., Drexler S.A., Clardy J. Structure of guimarediol, a new rearranged sesquiterpenoid from the red alga *Laurencia* sp. *Chem. Lett.*, **1984**, 13, 1865-1866.

Guella G., Mancini I., Chiasera G., Pietra F. Rogiolenyne D, the likely intermediate precursor of rogiolenyne A and B, branched C15 acetogenins isolated from the red seaweed *Laurencia microcladia* of Il Rogiolo, conformation and absolute configuration in the whole series. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 303-309.

Guella G., Mancini I., Öztunç A., Pietra F. Conformational bias in macrocyclic ethers and observation of high solvolytic reactivity at a masked furfuryl (=2-furylmethyl) C-atom. *Helv. Chim. Acta*, **2000**, 83, 336-348.

Guella G., Pietra F. Rogiolenyne A, B, and C: the first branched marine C15

acetogenins. Isolation from the red seaweed *Laurencia microcladia* or the sponge *Spongia zimocca*. *Helv. Chim. Acta*, **1991**, 74, 47-54.

Guella G., Pietra F. A new skeleton diterpenoid, new prenylbisabolanes, and their putative biogenetic precursor, from the red seaweed *Laurencia microcladia* from Il Rogiolo: assigning the absolute configuration when two chiral halves are connected by single bonds. *Helv. Chim. Acta*, **2000**, 83, 2946-2952.

Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, searched on June **2017**.

Gutiérrez-Cepeda A., Fernandez J.J., Gil L.V., Lopez-Rodriguez M., Norte M., Souto M.L. Nonterpenoid C-15 Acetogenins from *Laurencia marilzae*. *J. Nat. Prod.*, **2011**, 74, 441-448.

Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today*, **2003**, 12, 536-544.

Hall J., Reiss J. Elatenyne a pyrano [3, 2-b] pyranyl vinyl acetylene from the red alga *Laurencia elata*. *Aust. J. Chem.*, **1986**, 39, 1401-1409.

Halvorson H. Aquaculture, marine sciences and oceanography: a confluence. connection. *New Engl. J. High. Educ. Econ. Dev.*, **1998**, 13, 38-40.

Harizani M., Ioannou E., Roussis V. The *Laurencia* Paradox: An Endless Source of **Chemodiversity**. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, Springer International Publishing, Switzerland, **2016**, 102, 91-252.

Harper M. K., Bugni T.S., Copp B.R., James R.D., Lindsay B.S., Richardson A.D., Schnabel P.C., Tasdemir D., Van Wagoner R.M., Verbitski S.M.,. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: McClintock J.B., Baker B.J. (Eds.). *Marine chemical ecology*. CRC Press, USA, **2001**.

Howard B.M., Fenical W. Obtusadiol; a unique bromoditerpenoid from the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 28, 2453-2456.

Howard B.M., Fenical W., Arnold E.V., Clardy J. Obtusin, a unique bromine-containing polycyclic ketal from the red marine alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 2841-2844.

Howard B.M., Schulte G.R., Fenical W., Solheim B., Clardy J. Three new vinyl acetylenes from the marine red alga *Laurencia*. *Tetrahedron*, **1980**, 36, 1747-1751.

Hu Y., Chen J., Hu G., Yu J., Zhu X., Lin Y., Chen S., Yuan J. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar. Drugs*, **2015**, 13, 202-221.

Ichiba T., Higa T. New cuparene-derived sesquiterpenes with unprecedented oxygenation pattern from the sea hare *Aplysia dactylomela*. *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 3364-3366.

Iliopoulou D., Mihopoulos N., Vagias C., Papazafiri P., Roussis V. Novel cytotoxic brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 7667-7674.

Iliopoulou D., Vagias C., Harvala C., Roussis V. C 15 acetogenins from the red alga *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry*, **2002**, 59, 111-116.

Imre S., Aydoğmuş Z. Secondary metabolites from the red alga *Laurencia obtusa*. *Pharmazie*, **1997**, 52, 883-885.

Ioannou E., Nappo M., Avila C., Vagias C., Roussis V. Metabolites from the sea hare *Aplysia fasciata*. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 1716-1719.

Irie T., Izawa M., Kurosawa E.. Laureatin, a constituent from *Laurencia nipponica* Yamada. *Tetrahedron Lett.*, **1968a**, 9, 2091-2096.

Irie T., Suzuki M., Kurosawa E., Masamune T. Laurinterol and debromolaurinterol, constituents from *Laurencia intermedia*. *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 7, 1837-1840.

Irie T., Suzuki M., Masamune T. Laurencin, a constituent from *Laurencia* species. *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 6, 1091-1099.

Irie T., Suzuki M., Masamune T. Laurencin, a constituent of *Laurencia glandulifera* Kützting. *Tetrahedron*, **1968b**, 24, 4193-4205.

Ishii T., Nagamine T., Nguyen B.C.Q., Tawata S.. Insecticidal and repellent activities of Laurinterol from the okinawan red alga *Laurencia nidifica*. *Rec. Nat. Prod.*, **2017**, 11, 63.

Jaspars M., De Pascale D., Andersen J.H., Reyes F., Crawford A.D., Ianora A. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *J Mar. Biol. Assoc. UK*, **2016**, 96, 151-158.

Ji N.Y., Li X.M., Li K., Wang B.G. Laurendecumallenes A–B and Laurendecumenynes A–B, halogenated nonterpenoid C15-Acetogenins from the marine red alga *Laurencia decumbens*. *J. Nat. Prod.*, **2007a**, 70, 1499-1502.

Ji N.Y., Li X.M., Ding L.P., Wang B.G. Aristolane sesquiterpenes and highly brominated indoles from the marine red alga *Laurencia similis* (Rhodomelaceae). *Helv. Chim. Acta*, **2007b**, 90, 385-391.

Kem W.R., Mahnir V.M., Prokai L., Papke R.L., Cao X., LeFrancois S., Wildeboer K., Prokai-Tatrai K., Porter-Papke J., Soti F. Hydroxy metabolites of the Alzheimer's drug

candidate 3-[(2, 4-dimethoxy) benzylidene]-anabaseine dihydrochloride (GTS-21): their molecular properties, interactions with brain nicotinic receptors, and brain penetration. *Mol. Pharmacol.*, **2004**, 65, 56-67.

Kennedy D.J., Selby I.A., Thomson R.H. Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1761-1766.

Kim M.M., Mendis E., Kim S.K. *Laurencia okamurai* extract containing laurinterol induces apoptosis in melanoma cells. *J. Med. Food*, **2008**, 11, 260-266.

King T.J., Imre S., Öztunc A., Thomson R.H. Obtusenyne, a new acetylenic nine-membered cyclic ether from *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 1453-1454.

Kladi M., Ntountaniotis D., Zervou M., Vagias C., Ioannou E., Roussis V. Glandulaurencianols A–C, brominated diterpenes from the red alga, *Laurencia glandulifera* and the sea hare, *Aplysia punctata*. *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 55, 2835-2837.

Kladi M., Xenaki H., Vagias C., Papazafiri P., Roussis V. New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 182-189.

Kuniyoshi M., Wahome P.G., Miono T., Hashimoto T., Yokoyama M., Shrestha K.L., Higa T. Terpenoids from *Laurencia luzonensis*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1314-1317.

Kurata K., Taniguchi K., Agatsuma Y., Suzuki M. Diterpenoid feeding-deterrents from *Laurencia saitoi*. *Phytochemistry*, **1998**, 47, 363-369.

Kurosawa E., Fukuzawa A., Irie T. Trans- and cis-laurediol, unsaturated glycols from *Laurencia nipponica* Yamada. *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 13, 2121-2124.

Lamottke K., Ripoll C., Walczak R. The roots of innovation. *EBR*, **2011**, 15, 52-56.

Lamouroux J.V. *Essai sur les genres de la famille des thalassiphytes non articulées*. De l'imprimerie de A. Belin, **1813**.

Leal M.C., Munro M.H., Blunt J.W., Puga J., Jesus B., Calado R., Rosa R., Madeira C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2013**, 30, 1380-1390.

Leung A.E., Blair M., Forsyth C.M., Tuck K.L. Synthesis of the proposed structures of prevezol C. *Org. Lett.*, **2013**, 15, 2198-2201.

Leung A.E., Rubbiani R., Gasser G., Tuck K.L. Enantioselective total syntheses of the proposed structures of prevezol B and evaluation of anti-cancer activity. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 8239-8246.

- Li M.C., Sun W.S., Cheng W., Liu D., Liang H., Zhang Q.Y., Lin W.H. Four new minor brominated indole related alkaloids with antibacterial activities from *Laurencia similis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26, 3590-3593.
- Li X.D., Miao F.P., Yin X.L., Liu J.L., Ji N.Y. Sesquiterpenes from the marine red alga *Laurencia composita*. *Fitoterapia*, **2012**, 83, 1191-1195.
- Lindequist U., Marine-Derived Pharmaceuticals—Challenges and Opportunities. *Biomol. Ther.*, **2016**, 24, 561.
- Martin-Lescanne J., Rousseau F., De Reviers B., Payri C., Couloux A., Cruaud C., Le Gall L. Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzurua* stat. nov. *Eur. J. Phycol.*, **2010**, 45, 51-61.
- Martins A., Vieira H., Gaspar H., Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Mar. Drugs*, **2014**, 12, 1066-1101.
- Maschek J.A., Baker B.J. The chemistry of algal secondary metabolism . In: Amsler C.D. (Ed.) *Algal chemical ecology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, **2008**.
- Masuda M., Kawaguchi S., Abe T., Kawamoto T., Suzuki M. Additional analysis of chemical diversity of the red algal genus *Laurencia* (Rhodomelaceae) from Japan. *Phycol. Res.*, **2002**, 50, 135-144.
- Matsuo Y., Suzuki M., Masuda M. Enshuol, a novel squalene-derived pentacyclic triterpene alcohol from a new species of the red algal genus *Laurencia*. *Chem. Lett.*, **1995**, 24, 1043-1044.
- Mayer A.M., Glaser K.B., Cuevas C., Jacobs R.S., Kem W., Little R.D., McIntosh J.M., Newman D.J., Potts B.C., Shuster D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective., *Trends Pharmacol. Sci.*, **2010**, 31,255-265.
- McDermid K.J. Section V. *Laurencia* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Introduction. In Abbott I.A. (Ed.) *Taxonomy of economic seaweeds, with reference to some Pacific and Caribbean species*. La Jolla, (CA), USA: Publication of California Sea Grant College Program, **1988**.
- Mendola D. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomol. Eng.*, **2003**, 20, 441-458.
- Metti Y., Millar A.J., Steinberg P. A new molecular phylogeny of the *Laurencia* complex (Rhodophyta, Rhodomelaceae) and a review of key morphological characters

result in a new genus, *Coronaphycus*, and a description of *C. novus*. *J. Phycol.*, **2015**, *51*, 929-942.

Mihopoulos N., Vagias C., Mikros E., Scoullou M., Roussis V. Prevezols A and B: new brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 3749-3752.

Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **1987**, *155*, 335-350.

Nam K. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *J. Appl. Phycol.*, **2006**, *18*, 679-697.

Nam K., Maggs C., Garbary D. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, **1994**, *33*, 384-395.

Nam K.W. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *Eur. J. Phycol.*, **1999**, *34*, 455-468.

Neumann C.S., Fujimori D.G., Walsh C.T. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 99-109.

Newman D.J., Cragg G.M. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current “state of play”. *Planta Med.*, **2016a**, *82*, 775-789.

Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, **2016b**, *79*, 629-661.

Newman D.J., Cragg G.M., Battershill C.N. Therapeutic agents from the sea: biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year. *Diving Hyperb. Med.*, **2009**, *39*, 216-225.

Newman J.D., Cragg M.G. Current status of marine-derived compounds as warheads in anti-tumor drug candidates. *Mar. Drugs*, **2017**, *15*, 99.

Noitup P., Garnjanagoonchorn W., Morrissey M.T. Fish skin type I collagen: Characteristic comparison of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) and silver-line grunt (*Pomadasys kaakan*). *J. Aquat. Food. Prod. T.*, **2005**, *14*, 17-28.

Norte, M, Fernandez J.J., Padilla A. Bisabolane halogenated sesquiterpenes from *Laurencia*. *Phytochemistry* , **1992**, *31*, 326-327.

Penesyan A., Kjelleberg S., Egan S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 438-459.

Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*, 338-362.

Rangel M., Falkenberg M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *J. Coast. Life Med.*, **2015**, 3, 421-428.

Roessner U., Nahid A., Chapman B., Hunter A., Bellgard M. Metabolomics—the combination of analytical biochemistry, biology, and informatics. In 2nd, Moo-Young M., (Eds.) *Comprehensive Biotechnology*, Springer: Heidelberg, Germany, **2011**.

Rogers C., De Nys R., Charlton T., Steinberg P. Dynamics of algal secondary metabolites in two species of sea hare. *J. Chem. Ecol.*, **2000**, 26, 721-744.

Saito Y. Studies on Japanese species of *Laurencia*, with special reference to their comparative morphology. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **1967**, 15, 1-81.

Sakemi, S., Higa T., Jefford C.W., Bernardinelli G. Venustatriol. A new, anti-viral, triterpene tetracyclic ether from *Laurencia venusta*. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4287-4290.

Salomon C.E., Magarvey N.A., Sherman D.H. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, 21, 105-121.

Sarker S., Latif Z., Gray A. Natural Products Isolation. 2nd ed.: Humana press, USA, **2006**.

Satheesh S., Ba-akdah M.A., Al-Sofyani A.A. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms—A review. *Electron. J. Biotechn.*, **2016**, 21, 26-35.

Schmidtko A., Lötsch J., Freynhagen R., Geisslinger G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet*, **2010**, 375, 1569-1577.

Schmitt E.K., Moore C.M., Krastel P., Petersen F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2011**, 15, 497-504.

Schmitz F.J., Gopichand Y., Michaud D.P., Prasad R.S., Remaley S., Hossain M.B., Rahman A., Sengupta P.K., Van Der Helm D. Recent developments in research on metabolites from Caribbean marine invertebrates. *Pure Appl. Chem.*, **1981**, 53, 853-865.

Schmitz F.J., Michaud D.P., Schmidt P.G. Marine Natural Products: Parguerol, deoxyparguerol and isoparguerol, new brominated diterpenes with modified pimarane skeletons from the sea hare *Aplysia dactylomela*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6415-6423.

Schöffski P., Dumez H., Wolter P., Stefan C., Wozniak A., Jimeno J., Van Oosterom A.T. Clinical impact of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced/metastatic soft

tissue sarcoma. *Expert Opin. Pharmacogn.*, **2008**, 9, 1609-1618.

Sijtsma L., De Swaaf M. Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2004**, 64, 146-153.

Stallard M.O., Fenical W., Kittredge J. The brasilenols, rearranged sesquiterpene alcohols isolated from the marine opisthobranch *Aplysia brasiliiana*. *Tetrahedron*, **1978**, 34, 2077-2081.

Stengel D.B., Connan S. *Natural products from marine algae: Methods and Protocols*. Springer: New York, NY, USA, **2015**.

Stout E.P., Kubanek J., Marine macroalgal natural products. In: Moore B., Crews P. (Eds.), *Comprehensive Natural Products. II: Chemistry and Biology*, Elsevier Ltd, Kidlington, **2010**.

Su H., Shi D.Y., Li J., Guo S.J., Li L.L., Yuan Z.H., Zhu X.B. Sesquiterpenes from *Laurencia similis*. *Molecules*, **2009**, 14, 1889-1897.

Suleria H., Osborne S., Masci P., Gobe G. Marine-based nutraceuticals: an innovative trend in the food and supplement industries. *Mar. Drugs*, **2015**, 13, 6336.

Sun L.L., Wang C.Y., Dai H.F., Shao C.L., Mei W.L., Ma Z.D. Chemical constituents of *Chondrophycus papillosus* and their cytotoxicity *in vitro*. *Chem. Nat. Compd.*, **2011**, 47, 650-653.

Sun W.S., Su S., Zhu R.X., Tu G.Z., Cheng W., Liang H., Guoa X.Y., Zhao Y.Y., Zhang Q.Y. A pair of unprecedented spiro-trisindole enantiomers fused through a five-member ring from *Laurencia similis*. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, 54, 3617-3620.

Suzuki M., Kurosawa E. Halogenated and non-halogenated aromatic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia okamurai* Yamada. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, 52, 3352-3354.

Suzuki M., Kurosawa E., Kurata K. (E)-2-tridecyl-2-heptadecenal, an unusual metabolite from the red alga *Laurencia* species. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, 60, 3793-3794.

Suzuki M., Kurosawa E., Kurata K. Venustanol, a brominated labdane diterpene from the red alga *Laurencia venusta*. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1209-1210.

Suzuki M., Matsuo Y., Takeda S., Suzuki T. Intricatetraol, a halogenated triterpene alcohol from the red alga *Laurencia intricata*. *Phytochemistry*, **1993**, 33, 651-656.

Suzuki M., Takahashi Y., Matsuo Y., Guiry M.D., Masuda M. Scanlonenyne, a novel halogenated C15 acetogenin from the red alga *Laurencia obtusa* in Irish waters.

Tetrahedron, **1997**, 53, 4271-4278.

Tanaka J.I., Higa T., Bernardinelli G., Jefford C.W. Sulfur-containing polybromindoles from the red alga *Laurencia brongniartii*. *Tetrahedron*, **1989**, 45, 7301-7310.

Tsukamoto S., Yamashita Y., Ohta T. New cytotoxic and antibacterial compounds isolated from the sea hare, *Aplysia kurodai*. *Mar. Drugs*, **2005**, 3, 22.

Urban S., Separovic F. Developments in hyphenated spectroscopic methods in natural product profiling. *Front. Drug Des. Discovery*, **2005**, 1, 113-166.

Vairappan C.S., Ishii T., Lee T.K., Suzuki M., Zhaoqi Z. Antibacterial activities of a new brominated diterpene from Borneon *Laurencia* spp. *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 1743-1749.

Vairappan C.S., Suzuki M., Abe T., Masuda M. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry*, **2001**, 58, 517-523.

Wahl M. Living attached: Aufwuchs, fouling, epibiosis. In: Nagabhushanam R, Thompson M, (Eds). *Fouling organisms of the Indian ocean: Biology and control technology*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Company; **1997**.

Wang B.G., Gloer J.B, Ji N.Y., Zhao J.C. 2013 Halogenated organic molecules of Rhodomelaceae origin: Chemistry and biology. *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 3632-3685.

Wright A.D., König G.M., Sticher O. New sesquiterpenes and C15 acetogenins from the marine red alga *Laurencia implicata*. *J. Nat. Prod.*, **1991**, 54, 1025-1033.

Yamamura S., Hirata Y. A naturally-occurring bromo-compound, aplysin-20 from *Aplysia kurodai*. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1971**, 44, 2560-2562.

Yu X.Q., He W.F., Liu D.Q., Feng M.T., Fang Y., Wang B., Mao S. C., Feng L.H., Guo Y.W. A seco-laurane sesquiterpene and related laurane derivatives from the red alga *Laurencia okamurai* Yamada. *Phytochemistry*, **2014**, 103, 162-170.

Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π., Κατσαρός Χ. Εισαγωγή στη Βοτανική. Εκδόσεις: Σταμούλης, Αθήνα, **1998**.

Γιαννίτσaros Α., Δανηλίδης Δ., Καψανάκη-Γκότση Ε., Κουμπλή-Σοβαντζή Λ., Πανταζίδου Α., Ρουσσουμουστακάκη Μ. *Εργαστηριακές Ασκήσεις Ταξινομικής Φυτών και Βιοσυστηματικής*. ΕΚΠΑ, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Αθήνα, **2007**.

Γιαννίτσaros Α., Καψανάκη-Γκότση Ε., Κουμπλή-Σοβαντζή Λ., Οικονόμου-Αμίλλη Α., Ρουσσουμουστακάκη Μ. *Μαθήματα Ταξινομικής Φυτών και Βιοσυστηματικής*.

ΕΚΠΑ, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Αθήνα, **2004**

Ηλιοπούλου Δ. Χημική μελέτη και γεωγραφική διακύμανση στις ελληνικές θάλασσες βιοδραστικών μεταβολιτών του ροδοφύκου *Laurencia obtusa*. Διδακτορική Διατριβή, ΕΚΠΑ, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα, **2004**.

Ιωάννου Ε. Σημειώσεις για το μάθημα: *Θαλάσσια Φαρμακογνωσία*, ΜΔΕ Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. ΕΚΠΑ, Αθήνα.

Κονιδάρης Γ. Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών από το ροδοφύκο *Laurencia glandulifera*. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, ΕΚΠΑ Τμήμα Φαρμακευτικής Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα, **2015**.

Μητάκου Σ., Σκαλτσά Ε., Σκαλτσούνης Α.-Λ. Σημειώσεις για το μάθημα: *Φαρμακογνωσία II*. ΕΚΠΑ Τμήμα Φαρμακευτικής Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα, **2013**.

Πηγές Εικόνων:

<http://www.discoverlife.org>

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Laurencia.jpg>

<https://www.google.gr/maps>