



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ
ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΑΡΙΑ ΧΑΡΙΖΑΝΗ

**ΑΘΗΝΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2019**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευσταθία Ιωάννου (Επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαρία Ζερβού

Ερευνήτρια Β', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Ευσταθία Ιωάννου

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Θωμάς Μαυρομούστακος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σοφία Μητάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ελένη Σκαλτσά

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λόγω της ιδιαιτερότητας του θαλάσσιου περιβάλλοντος, τα φυσικά προϊόντα που απομονώνονται από θαλάσσιους οργανισμούς παρουσιάζουν συχνά διαφοροποιημένες χημικές δομές με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων μέσω εξειδικευμένων μηχανισμών. Στο εμπόριο κυκλοφορούν ήδη αρκετά φαρμακευτικά σκευάσματα με τη δραστική ουσία να είναι θαλάσσια προέλευσης, ενώ πολλά βρίσκονται σε στάδιο προκλινικών και κλινικών δοκιμών. Ακόμη, τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα βρίσκουν εφαρμογή στην κοσμητολογία, στη διατροφή, στη βιοτεχνολογία και στην επιστήμη υλικών. Τα τελευταία χρόνια, οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς έχουν αποδειχθεί πλούσιες πηγές νέων βιοδραστικών μορίων με πρωτότυπους ανθρακικούς σκελετούς ή σπάνιες δραστικές ομάδες.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η χημική σύσταση των οργανικών εκχυλισμάτων που παραλήφθηκαν έπειτα από υγρή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα τεσσάρων επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών, τα οποία έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ιζήματα που συλλέχθηκαν στο Αιγαίο (Μήλος) και το Ιόνιο (Κεφαλονιά και Κέρκυρα) Πέλαγος. Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών με σκοπό την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών τους, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν με βάση την ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (κυρίως NMR και MS). Συνολικά, απομονώθηκαν 78 διαφορετικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι 75. Εξ αυτών, οι 12 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα, ενώ οι 6 απομονώθηκαν για πρώτη φορά από φυσική πηγή.

Από το στέλεχος *Bacillus endophyticus* BI0327 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 25 δευτερογενείς μεταβολίτες: (i) εννέα 2,5-δικετοπιπεραζίνες (2,5-DKPs), (ii) τρία παράγωγα ινδολίου, (iii) μία ναφθοκινόνη, (iv) δύο τριτερπένια, (v) οκτώ απλά αρωματικά παράγωγα και (vi) δύο παράγωγα μεθακρυλικού οξέος, εκ των οποίων δύο αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα, ενώ ένας απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή.

Από το στέλεχος *Streptomyces althioticus* BI0850 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 2 δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων μία 2,5-DKP και μία απλή αζωτούχος ένωση.

Από το στέλεχος *Streptomyces smyrnaeus* BI0918 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 44 δευτερογενείς μεταβολίτες: (i) εικοσιτέσσερις 2,5-DKPs, εκ των οποίων μία αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, (ii) επτά παράγωγα βενζοδιαζεπινών, εκ των οποίων τέσσερα αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και δύο απομονώθηκαν πρώτη φορά από φυσική πηγή, (iii) ένα παράγωγο ινδολίου, (iv) δύο νουκλεοσιδικά παράγωγα, (v) δύο άλλες αζωτούχες ενώσεις, εκ των οποίων

μία απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή, (vi) μία απλή θειούχος ένωση, (vii) δύο παράγωγα βενζοϊκού οξέος, (viii) ένα απλό παράγωγο γλυκερόλης, (ix) ένα παράγωγο μεθακρυλικού οξέος, το οποίο αποτελεί νέο φυσικό προϊόν και (ix) τρεις πολυαιθερικοί μεταβολίτες μεγάλου μοριακού βάρους.

Από το στέλεχος *Bacillus subtilis* B10980 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 34 δευτερογενείς μεταβολίτες: (i) δεκαεννέα 2,5-DKPs, εκ των οποίων δύο αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και μία απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή, (ii) τρία παράγωγα ινδολίου, (iii) ένα νουκλεοσιδικό παράγωγο, (iv) ένα φλαβονοειδές, (v) πέντε παράγωγα βενζοϊκού οξέος, (vi) τέσσερις μεταβολίτες διαφορετικών κατηγοριών, εκ των οποίων δύο αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και ένα απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή και (vii) ένα παράγωγο μεθακρυλικού οξέος.

Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί σε ικανές ποσότητες βρίσκεται επί του παρόντος σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Due to the uniqueness of the marine environment, natural products isolated from marine organisms often present differentiated chemical structures exhibiting a wide range of biological activities through specialized mechanisms. Several pharmaceutical drugs with the active substance being of marine origin are already on the market, while a significant number is currently in preclinical and clinical trials. In addition, marine natural products find applications in the fields of cosmetology, nutrition, biotechnology and materials science. In recent years, marine microorganisms have attracted constantly increasing attention as they have been proven to be a rich source of novel bioactive molecules with novel carbon skeletons or uncommon functional groups.

In the framework of the present PhD thesis, the chemical composition of the organic extracts obtained after large scale cultivation of four selected bacterial strains isolated from marine sediments collected in the Aegean (Milos) and Ionian (Kefalonia and Kerkyra) Seas was investigated. The extracts were subjected to a series of chromatographic separations to result in the isolation of their secondary metabolites, the chemical structures of which were elucidated on the basis of the analysis of their spectroscopic data (mainly NMR and MS). In total, 78 different secondary metabolites were isolated, 75 of which have so far been identified. Among these, 12 are new natural products, while 6 were isolated for the first time from a natural source.

Twenty-five secondary metabolites were isolated and identified from *Bacillus endophyticus* BI0327 strain, including: (i) nine 2,5-diketopiperazines (2,5-DKPs), (ii) three indole derivatives, (iii) one naphthoquinone, (iv) two triterpenes, (v) eight simple aromatic derivatives and (vi) two methacrylic acid derivatives, two of which are new natural products, whereas one was isolated for the first time from a natural source.

Two secondary metabolites were isolated and identified from *Streptomyces althoticus* BI0850 strain, including one 2,5-DKP and one simple nitrogenous compound.

Forty-four secondary metabolites were isolated and identified from *Streptomyces smyrnaeus* BI0918 strain, including: (i) twenty-four 2,5-DKPs, one of which is a new natural product, (ii) seven benzodiazepine derivatives, four of which are new natural products, whereas two were isolated for the first time from a natural source, (iii) an indole derivative, (iv) two nucleoside derivatives, (v) two other nitrogen compounds, one of which was isolated for the first time from a natural source, (vi) a simple sulfur-containing compound, (vii) two derivatives of benzoic acid, (viii) one simple glycerol derivative, (ix) a methacrylic acid

derivative which is a new natural product and (x) three high molecular weight polyether metabolites.

Thirty-four secondary metabolites were isolated and identified from *Bacillus subtilis* strain B10980, including: (i) nineteen 2,5-DKPs, two of which are new natural products and one was isolated for the first time from a natural source, (ii) three indole derivatives, (iii) one nucleoside derivative, (iv) one flavonoid, (v) five benzoic acid derivatives, (vi) four metabolites of different chemical classes, two of which are new natural products and one was isolated for the first time from a natural source and (vii) a methacrylic acid derivative.

The evaluation of the biological activity of the metabolites isolated in sufficient quantities is currently in progress.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής Επίκουρη Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου, Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση και Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου για την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Επίκουρη Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου για την υπομονή και την επιμονή της σε κάθε μου βήμα.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Επίκουρη Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου, Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου, Ερευνήτρια Β' Μαρία Ζερβού, Καθηγητή Θωμά Μαυρομούστακο, Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου και Καθηγήτρια Ελένη Σκαλτσά για την ανάγνωση και αξιολόγηση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια Μαρία-Μαρίνα Κουλάδη για την υποστήριξη της.

Ευχαριστώ τον εκλιπόντα Αναπληρωτή Καθηγητή Κωνσταντίνο Βάγια που με ενέπνευσε να ασχοληθώ με τη Θαλάσσια Φαρμακογνωσία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Α' Αντώνη Μακρή (Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπισημών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης) για τη ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών και τον Καθηγητή Carlos Duarte (Red Sea Research Center, King Abdullah University of Science and Technology) για τη δυνατότητα λήψης ορισμένων φασμάτων NMR σε υψηλά μαγνητικά πεδία.

Ακόμη, ευχαριστώ τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας μέσω του ερευνητικού προγράμματος ΑΡΙΣΤΕΙΑ-2587-BIOMARACT, καθώς και το Τμήμα Υποτροφιών και Βραβείων του ΕΚΠΑ μέσω του κληροδοτήματος Αντωνίου Παπαδάκη για την οικονομική ενίσχυση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη 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.

Και τέλος ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους για τη συμπαράσταση, την υποστήριξη και την κατανόηση που έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xi
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1. Φαρμακογνωσία - Χημεία φυσικών προϊόντων	1
1.2. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία	3
1.2.1. Τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα ως φάρμακα	5
1.2.2. Εφαρμογές στα λειτουργικά τρόφιμα και την κοσμητολογία	6
1.2.3. Λοιπές εφαρμογές θαλάσσιων φυσικών προϊόντων	8
1.2.4. Δυσκολίες και προκλήσεις στη Θαλάσσια Φαρμακογνωσία.....	10
1.2.5. Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί ως παραγωγοί βιοδραστικών μεταβολιτών	11
1.3. Βακτήρια.....	13
1.3.1. Γενικά.....	13
1.3.2. Οικολογική σημασία των βακτηρίων	15
1.3.3. Οικονομική σημασία των βακτηρίων	16
1.4. Βακτήρια θαλάσσιας προέλευσης ως πηγές φυσικών προϊόντων	17
1.5. Σκοπός της μελέτης	25
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	27
2.1. Οργανολογία.....	27
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	28
2.3. Καλλιέργεια των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών και παραλαβή των οργανικών εκχυλισμάτων	29
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το βακτηριακό στέλεχος BI0327	32
2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος BI0850.....	48
2.6. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος BI0918.....	51
2.7. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος BI0980.....	84

2.8. Συγκεντρωτική παρουσίαση απομονωμένων μεταβολιτών	95
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	99
3.1. Μεταβολίτης 1	101
3.2. Μεταβολίτης 2	106
3.3. Μεταβολίτης 3	109
3.4. Μεταβολίτης 4	112
3.5. Μεταβολίτης 5	115
3.6. Μεταβολίτης 6	118
3.7. Μεταβολίτης 7	121
3.8. Μεταβολίτης 8	125
3.9. Μεταβολίτης 9	129
3.10. Μεταβολίτης 10	133
3.11. Μεταβολίτης 11	136
3.12. Μεταβολίτης 12	140
3.13. Μεταβολίτης 13	143
3.14. Μεταβολίτης 14	146
3.15. Μεταβολίτης 15	151
3.16. Μεταβολίτης 16	155
3.17. Μεταβολίτης 17	158
3.18. Μεταβολίτης 18	161
3.19. Μεταβολίτης 19	164
3.20. Μεταβολίτης 20	167
3.21. Μεταβολίτης 21	170
3.22. Μεταβολίτης 22	173
3.23. Μεταβολίτης 23	177
3.24. Μεταβολίτης 24	180
3.25. Μεταβολίτης 25	183
3.26. Μεταβολίτης 26	186
3.27. Μεταβολίτης 27	189
3.28. Μεταβολίτης 28	192
3.29. Μεταβολίτης 29	195
3.30. Μεταβολίτης 30	201
3.31. Μεταβολίτης 31	207
3.32. Μεταβολίτης 32	210
3.33. Μεταβολίτης 33	214

3.34. Μεταβολίτης 34	219
3.35. Μεταβολίτης 35	224
3.36. Μεταβολίτης 36	229
3.37. Μεταβολίτης 37	234
3.38. Μεταβολίτης 38	239
3.39. Μεταβολίτης 39	243
3.40. Μεταβολίτης 40	245
3.41. Μεταβολίτης 41	247
3.42. Μεταβολίτης 42	250
3.43. Μεταβολίτης 43	252
3.44. Μεταβολίτης 44	255
3.45. Μεταβολίτης 45	257
3.46. Μεταβολίτης 46	259
3.47. Μεταβολίτης 47	261
3.48. Μεταβολίτης 48	265
3.49. Μεταβολίτης 49	267
3.50. Μεταβολίτης 50	272
3.51. Μεταβολίτης 51	274
3.52. Μεταβολίτης 52	276
3.53. Μεταβολίτης 53	278
3.54. Μεταβολίτης 54	281
3.55. Μεταβολίτης 55	284
3.56. Μεταβολίτης 56	289
3.57. Μεταβολίτης 57	293
3.58. Μεταβολίτης 58	295
3.59. Μεταβολίτης 59	297
3.60. Μεταβολίτης 60	299
3.61. Μεταβολίτης 61	301
3.62. Μεταβολίτης 62	303
3.63. Μεταβολίτης 63	305
3.64. Μεταβολίτης 64	307
3.65. Μεταβολίτης 65	312
3.66. Μεταβολίτης 66	315
3.67. Μεταβολίτης 67	318
3.68. Μεταβολίτης 68	321

3.69. Μεταβολίτης 69	324
3.70. Μεταβολίτης 70	327
3.71. Μεταβολίτης 71	330
3.72. Μεταβολίτης 72	332
3.73. Μεταβολίτης 73	336
3.74. Μεταβολίτης 74	342
3.75. Μεταβολίτης 75	348
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	355
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	361

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D NMR	πείραμα NMR μίας διάστασης
2D NMR	πείραμα NMR δύο διαστάσεων
¹H NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
¹³C NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
[α]_D	ειδική στροφική ικανότητα
br	ευρεία (NMR)
C₆D₆	δευτεριωμένο βενζόλιο
CDCl₃	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CD₃OD	δευτεριωμένη μεθανόλη
(CD₃)₂SO	δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο
CH₂Cl₂	διχλωρομεθάνιο
CHCl₃	χλωροφόρμιο
cHex	κυκλοεξάνιο
CIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον χημικό ιονισμό (Chemical Ionization Mass Spectrometry)
COSY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹ H για ² J και ³ J (Correlated Spectroscopy)
d	διπλή (NMR)
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
EIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact Mass Spectrometry)
ESIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
H₂O	νερό
HMBC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ² J και ³ J (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography)
HR-MS	φασματομετρία μάζας υψηλής ευκρίνειας (High Resolution Mass Spectrometry)
HSQC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ¹ J (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IR	φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας
J	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
m	πολλαπλή (NMR)
m/z	λόγος μάζας προς φορτίο
Me₂CO	ακετόνη
MeCN	ακετονιτρίλιο
MeOH	μεθανόλη
MS	φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry)
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Nuclear Overhauser Effect

NOESY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^1H στον χώρο (N uclear O verhauser E ffect S pectroscopy)
q	τετραπλή (NMR)
RI	δείκτης διάθλασης (R efractive I ndex)
s	απλή (NMR)
t	τριπλή (NMR)
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (T hin L ayer C hromatography)
UV-Vis	φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατής ακτινοβολίας
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Φαρμακογνωσία - Χημεία φυσικών προϊόντων

Ο όρος «Φαρμακογνωσία» ετυμολογικά προκύπτει από τις λέξεις «φάρμακο» και «γνώση» και ορίζεται ως ο τομέας της επιστήμης που μελετά πρώτες ύλες φυσικής προέλευσης (φυτικές, ζωικές, μικροβιακές και ανόργανες), οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή φαρμάκων. Για πολλά χρόνια, η έννοια της φαρμακογνωσίας ήταν συνυφασμένη με τον χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση φαρμάκων που προέρχονται από φυτά. Σήμερα όμως έχει διευρυνθεί, με το πεδίο εφαρμογής της να περιλαμβάνει τη μελέτη των φυσικών, χημικών, βιοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των πιθανών φαρμάκων και φαρμακευτικών ουσιών φυσικής προέλευσης από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς χερσαίας ή θαλάσσιας προέλευσης, καθώς και την αναζήτηση νέων φυσικών προϊόντων.

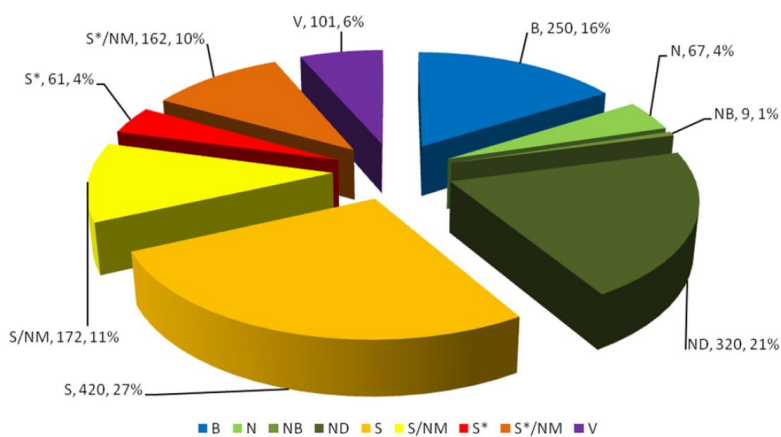
Αν και ο όρος «φυσικά προϊόντα» αναφέρεται σε όλες τις χημικές ενώσεις που βρίσκονται στη φύση, έχει επικρατήσει να χαρακτηρίζονται με τον όρο αυτό οι δευτερογενείς μεταβολίτες, δηλαδή τα μόρια που παράγονται από τους ζωντανούς οργανισμούς για συγκεκριμένους λόγους, χωρίς όμως να είναι αυστηρώς απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Αποτελούν μια «δεξαμενή» πιθανών φαρμάκων, καθώς είναι αποτέλεσμα εκατομμυρίων ετών εξέλιξης και προσαρμογής των χερσαίων και θαλάσσιων οργανισμών σε ποικίλους βιοτικού και αβιοτικού παράγοντες στρες και συνήθως παρουσιάζουν βιοδραστικότητα.

Το ενδιαφέρον για τα φυσικά προϊόντα ξεκινά χιλιάδες χρόνια πριν και συνεχίζεται μέχρι σήμερα (Dias et al., 2012). Από την εποχή των Σουμερίων και την αρχαία Ελλάδα με τον Ιπποκράτη, τον Θεόφραστο και το «Περί ὕλης ἰατρικῆς» του Διοσκουρίδη, έχουμε αναφορές για χρήση εκατοντάδων διαφορετικών φυτών για ιατρικούς σκοπούς. Ο πάπυρος του Ebers, μία από τις σημαντικότερες πηγές πληροφοριών για τη θεραπευτική των αρχαίων Αιγυπτίων, από το 1550 π.Χ., αναφέρει περίπου 1.000 συνταγές φαρμάκων από το φυτικό και ζωικό βασίλειο. 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.

Οι πληροφορίες που μας έρχονται από τα βάθη των αιώνων και το υλικό που έχει διασωθεί κατευθύνουν ακόμη και σήμερα την επιστημονική έρευνα για την ανεύρεση νέων βιολογικά δραστικών ουσιών. Με βάση τη χρήση τους στην παραδοσιακή ιατρική ανακαλύφθηκαν φάρμακα, όπως η μορφίνη που απομονώθηκε από το *Papaver somniferum*

και η ταξόλη που απομονώθηκε από το *Taxus brevifolia*. Στα φυσικά προϊόντα όμως περιλαμβάνονται και ισχυρότατες τοξίνες, όπως η στρυχνίνη από τα σπέρματα του φυτού *Strychnos nux-vomica* και το κουράριο, ένα πολύπλοκο εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε από τους Ινδιάνους της Ν. Αμερικής ως δηλητήριο στα βέλη τους.

Πολλοί φυτικοί, αλλά και ζωικοί οργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί και συχνά χρησιμοποιούνται ακόμη σε εφαρμογές στην ιατρική, στη γεωργία, στις βιομηχανίες καλλυντικών και τροφίμων παγκοσμίως. Η συστηματικότερη απομόνωση και μελέτη των φυσικών προϊόντων έχει την αρχή της περίπου στα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Ο 20^{ος} αιώνας σημαδεύτηκε από την ανακάλυψη της πενικιλίνης και την επακόλουθη εκρηκτική ανάπτυξη των αντιβιοτικών. Σήμερα, ένα μεγάλο ποσοστό των φαρμάκων (Εικ. 1) και των καλλυντικών που κυκλοφορούν στο εμπόριο περιέχουν ως δραστικά συστατικά ουσίες που είναι φυσικά προϊόντα ή έχουν τη βάση τους σε αυτά. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά που ανήκουν στις χημικές κατηγορίες των πενικιλινών και των κεφαλοσπορινών έχουν προκύψει από συνθετικές τροποποιήσεις φυσικών μορίων. Επίσης η ασπιρίνη, ένα από τα ευρύτερα διαδεδομένα και εξαιρετικά αποτελεσματικά παυσίπονα, είναι ένα μερικώς τροποποιημένο φυσικό προϊόν από το φλοιό ειδών του γένους *Salix*.



Εικόνα 1. Εγκεκριμένα φάρμακα 1981-2014 (Newman & Gragg, 2016).

N: φυσικά προϊόντα, ND: παράγωγα φυσικών προϊόντων, NB: φυτικά φάρμακα (καθορισμένης σύστασης), S: συνθετικά προϊόντα, S*: συνθετικά προϊόντα με φυσικό φαρμακοφόρο τμήμα, NM: μιμητής φυσικού προϊόντος, V: εμβόλια, B: βιολογικά μακρομόρια.

Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής των ανθρώπων λόγω της ανάπτυξης της ιατροφαρμακευτικής επιστήμης και τεχνολογίας είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η άνοια, κ.ά. Παράλληλα, η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών οδήγησε στη μείωση της αποτελεσματικότητάς τους και στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων. Αυτές οι συνθήκες κατέστησαν επιτακτική την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών μορίων με αποτελεσματικότερη δράση.

Τα τελευταία χρόνια, η απομόνωση νέων φυσικών προϊόντων καθίσταται δυσκολότερη υπόθεση. Παρά το γεγονός ότι οι φυσικοί οργανισμοί παραμένουν ανεξάντλητοι, η απομόνωση νέων δομών φθίνει με σταθερό ρυθμό στο πέρασμα του χρόνου, καθώς μεγάλο μέρος των ενώσεων που απομονώνονται και ταυτοποιούνται έχουν ήδη μελετηθεί. Η εκμετάλλευση των φυσικών προϊόντων είναι χρονικά και οικονομικά ασύμφορη. Υπολογίζεται ότι για την απομόνωση και ταυτοποίηση μιας δραστικής φαρμακολογικά ουσίας από φυσικές πηγές απαιτείται χρόνος περίπου 3 μηνών, καθώς και ένα κόστος περί τα 50.000 USD (Cordell & Shin, 1999).

Η συνδυαστική χημεία (combinatorial chemistry) με τη δημιουργία βιβλιοθηκών συνθετικών οργανικών μορίων (μεγάλος αριθμός, ποικιλία, ταχύτητα σύνθεσης), τα οποία δοκιμάζονται σχεδόν αυτοματοποιημένα ως προς την βιοδραστικότητα τους (HTS-High throughput screening) δεν κατάφερε να εκπληρώσει τον στόχο της για ανακάλυψη νέων φαρμάκων με μικρότερο κόστος, οδηγώντας τις φαρμακευτικές εταιρείες να τη συνδυάσουν με βελτιωμένα και ταχύτερα προγράμματα μελέτης φυσικών προϊόντων. Η σύζευξη των κλασικών χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών (HPLC-NMR-MS, HPLC-NMR) με τη μελέτη βάσεων δεδομένων μπορεί να ανιχνεύσει γρήγορα την ύπαρξη γνωστών μεταβολιτών (dereplication) και να εκτιμήσει την αξία των ακατέργαστων εκχυλισμάτων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Ακόμη, η μεταβολομική αποτελεί μια νέα προσέγγιση στον χώρο των φυσικών προϊόντων (σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές, βιοπληροφορική με χρήση αλγορίθμων, βιοχημεία, κ.ά.), όπου με την ολοκληρωμένη μελέτη ενός εκχυλίσματος αντλούνται πληροφορίες για τη ποιοτική, αλλά και τη ποσοτική του σύσταση.

1.2. Θαλάσσια Φαρμακογνωσία

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

Παρότι υπάρχει έλλειψη πηγών λαϊκής θεραπευτικής με αναφορές σε θαλάσσιους οργανισμούς, φαίνεται ότι τα αφειψήματα των ροδοφυκών *Chondrus crispus* και *Mastocarpus stellatus* χρησιμοποιούνταν για το κρουολόγημα, τον πονόλαιμο και τις λοιμώξεις του αναπνευστικού, ενώ ο «χυμός» από το ροδοφύκος *Porphyra umbilicalis* θεωρούνταν ότι θα μπορούσε να αντιμετωπίσει τον καρκίνο (Dias et al., 2012).

Η πλειοψηφία των φυσικών προϊόντων που έχουν βρει μέχρι σήμερα φαρμακευτική εφαρμογή προέρχεται από οργανισμούς του χερσαίου περιβάλλοντος, λόγω του σημαντικού

όγκου πληροφοριών που ήταν διαθέσιμες για αυτούς από την κατά τόπους λαϊκή θεραπευτική και της προσβασιμότητας τους. Για τον λόγο αυτό, παρά το γεγονός ότι το υδάτινο περιβάλλον καλύπτει περισσότερο από το 70% της συνολικής επιφάνειας του πλανήτη και αντιπροσωπεύει το 95% της βιόσφαιρας (Ρούσσης & Βάγιας, 2008), η συστηματική μελέτη των μεταβολιτών που παράγονται από θαλάσσιους οργανισμούς καθυστέρησε, καθώς η προσέγγιση και η εξερεύνηση του θαλάσσιου οικοσυστήματος παρουσιάζει δυσκολίες και κινδύνους. Από τη δεκαετία του 1970 και έπειτα έγινε πιο μεθοδικά, με την εξέλιξη της τεχνολογίας να παίζει καθοριστικό ρόλο σε αυτό. Η βελτίωση των μέσων πρόσβασης στον θαλάσσιο χώρο, όπως οι συσκευές αυτόνομης κατάδυσης (SCUBA - Self contained underwater breathing apparatus), η χρήση των επανδρωμένων βαθυσκαφών, καθώς και πιο πρόσφατα η χρήση των τηλεκατευθυνόμενων υποβρύχιων οχημάτων (ROV - Remotely Operated Vehicles), κατέστησε τα βάθη των θαλασσών και τους οργανισμούς που υπήρχαν εκεί ευκολότερα προσβάσιμα.

Όπως είναι γνωστό, η ζωή πρωτοεμφανίστηκε στη θάλασσα πριν από περίπου 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια και η πιο σημαντική βιολογική έκρηξη συνέβη κατά τη διάρκεια της Καμβρίου περιόδου, 600 εκατομμύρια χρόνια πριν (Γαλάτης, Αποστολάκος & Κατσαρός, 1998). Από τα 33 ζωικά φύλα που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, βρίσκουμε τουλάχιστον 32 στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ περίπου τα μισά είναι αποκλειστικά υδρόβια (Martins et al., 2014). Το θαλάσσιο περιβάλλον είναι σχετικά σταθερό (δυνατότητα ρύθμισης pH, θερμοκρασίας, αλατότητας), όμως παράλληλα και αρκετά εχθρικό (ακραίες θερμοκρασίες, αλλαγές στην αλατότητα και μεγάλο εύρος πίεσης από 1 έως 1.000 atm) και ανταγωνιστικό, με διακυμάνσεις στη διαθεσιμότητα φωτός, οξυγόνου και τροφής, για την οποία ανταγωνίζεται ένας εντυπωσιακά μεγάλος αριθμός ειδών (~240.000) (Lindequist, 2016).

Μέσα σε αυτές τις συνθήκες οι οργανισμοί είχαν στη διάθεση τους χρόνο και κίνητρο να επενδύσουν ενέργεια για την εξέλιξη και την προσαρμογή τους. Η βιοποικιλότητα αποτελεί το κλειδί για την ύπαρξη ποικιλίας βιοχημικών διαδικασιών χημικής άμυνας και οι δευτερογενείς μεταβολικές οδοί των θαλάσσιων οργανισμών είναι εξαιρετικά περίπλοκες και διαφοροποιημένες από αυτές των χερσαίων. Σε πολλές περιπτώσεις, π.χ. στα ασπόνδυλα με μαλακό σώμα, η απουσία εμφανών μηχανισμών φυσικής άμυνας (δυνατότητα μετακίνησης, ιστολογική εξειδίκευση και πιο εξελιγμένες ανοσολογικές αποκρίσεις) έκανε επιτακτική την ανάγκη για άμυνα οργανωμένη σε κυτταρικό επίπεδο. Η χημική άμυνα αναπτύσσεται περισσότερο σε τροπικές κοινωνίες και σε ενδιαιτήματα με πολλούς καταναλωτές, ενώ συνδέεται αναλογικά με την εμφάνιση φαρμακολογικής δράσης, καθώς τα μόρια αυτά ως μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί στοχεύουν σε γενικές διαδικασίες ζωτικής σημασίας και μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες (Dančik et al., 2010; Faulkner, 2000).

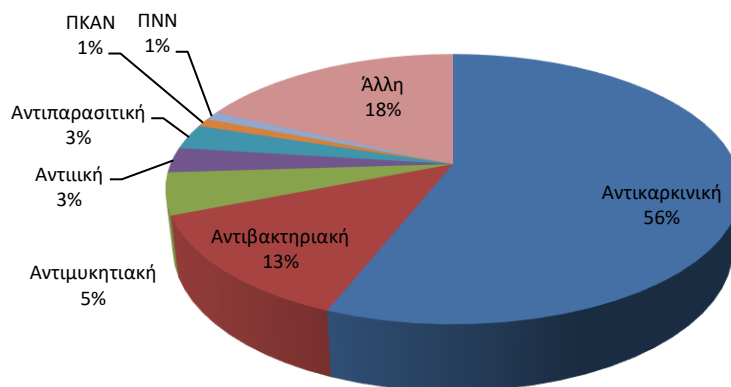
Ως αποτέλεσμα, οι θαλάσσιοι οργανισμοί συνθέτουν βιοδραστικά μόρια με χημικούς σκελετούς ή δραστικές ομάδες σπάνιες ή άγνωστες στους χερσαίους οργανισμούς με εντονότερες βιολογικές δράσεις και συχνά υψηλότερης εξειδίκευσης. Ακόμα και όταν οι δομές τους μπορούν να ενταχθούν στις μεγάλες γνωστές χημικές ομάδες (οξέα, αμίνες, αμινοξέα, ένζυμα, παράγωγα γουανιδίνης, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων, πολυσακχαρίτες, φαινόλες, σαπωνίνες, στερόλες, γλυκοσίδες, τερπενικά παράγωγα, βιταμίνες), φέρουν στο μόριό τους δραστικές ομάδες ή ανθρακικούς σκελετούς που δεν συναντώνται στα χερσαία συστατικά. Μια χαρακτηριστική διαφορά είναι η σπανιότητα αζωτούχων δομών σε σχέση με τους χερσαίους μεταβολίτες και η ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας αλογονωμένων φυσικών προϊόντων στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Το μέλλον της χημείας θαλάσσιων φυσικών προϊόντων διαφαίνεται πραγματικά ελπιδοφόρο. Η μελέτη των θαλάσσιων οργανισμών έχει δείξει ότι είναι αποδοτικότεροι των χερσαίων ως προς την απομόνωση φυσικών προϊόντων με πρωτότυπη δομή, εντονότερη βιοδραστικότητα και πρωτότυπους μηχανισμούς φαρμακολογικής δράσης (Kong et al., 2010; Munro et al., 1999). Η έρευνα προσανατολίζεται στην αναζήτηση πρωτότυπων χημικών δομών με εκλεκτική δράση και οι θαλάσσιοι οργανισμοί έχουν αποδειχτεί μέχρι στιγμής αστείρευτη πηγή τέτοιων ουσιών. Πλέον απομονώνονται εκατοντάδες νέα μόρια κάθε χρόνο από θαλάσσιους οργανισμούς και μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί περισσότεροι από 33.000 μεταβολίτες (MarinLit, 2019), ενώ ο αριθμός τους αναμένεται να αυξηθεί εκθετικά τα επόμενα χρόνια.

1.2.1. Τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα ως φάρμακα

Οι εφαρμογές των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων αφορούν κυρίως τον τομέα της Υγείας και περιλαμβάνουν ένα πολύ ευρύ φάσμα δράσεων, με την αντικαρκινική δράση να ξεχωρίζει. Από τους μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς, πάρα πολλοί έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόρια οδηγό για τη σύνθεση χημικών ενώσεων με θεραπευτικές ιδιότητες, αρκετοί αποτελούν αυτούσια συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων και πολλοί είναι υποψήφια φάρμακα για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών (Mayer et al., 2017).

Περισσότερο από το 50% των θαλάσσιων φυσικών προϊόντων που ανακαλύφθηκαν μεταξύ 1985-2012 παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση (Εικ. 2) και μάλιστα αυτά φαίνεται να ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό βιοδραστικότητας εμφανίζουν τα τερπένια και τα αλκαλοειδή (Hu et al., 2015).



Εικόνα 2. Βιολογικές δράσεις νέων θαλάσσιων φυσικών προϊόντων (1985-2012) (Hu et al., 2015). ΠΚΑΝ: Προληπτική δράση έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων, ΠΝΝ: Προστατευτική των νευρώνων/Νευροτοξική δράση.

Σήμερα κυκλοφορούν στην αγορά οκτώ εγκεκριμένα φάρμακα και ένα είναι μη συνταγογραφούμενο (Lonaza®), ενώ αρκετά μόρια βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών (Πιν. 1). Από αυτά τα περισσότερα υπέστησαν δομικές τροποποιήσεις με σκοπό τη βελτιστοποίηση της δράσης τους (lead optimization) (Jaspars et al., 2016; Jiménez, 2018; Martins et al., 2014).

Ακόμη, από τους θαλάσσιους οργανισμούς απομονώνονται μεταβολίτες με πολύ υψηλή τοξικότητα που είναι γνωστοί ως τοξίνες θαλάσσιας προέλευσης. Αυτά τα μόρια δεν έχουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον, αλλά χρησιμεύουν ως «μοριακά εργαλεία» για τη μελέτη βιοχημικών μηχανισμών του ανθρώπινου οργανισμού. Παραδείγματα τοξινών θαλάσσιας προέλευσης είναι η σαξιτοξίνη (από τα δινομαστιγωτά *Alexandrium* sp., *Gymnodinium* sp. και από τα κυανοβακτήρια *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Lyngbya* sp., *Planktothrix* sp.), η μπρεβετοξίνη Β (από το δινομαστιγωτό *Gymnodinium breve*) και η τετροδοτοξίνη (από τα ψάρια της οικογένειας Tetraodontidae).

1.2.2. Εφαρμογές στα λειτουργικά τρόφιμα και την κοσμητολογία

Οι όροι “nutraceuticals” και “cosmeceuticals” αφορούν προϊόντα διατροφής και καλλυντικών που περιέχουν βιοδραστικά συστατικά και έχουν ως στόχο να προσδώσουν θεραπευτικά οφέλη στους χρήστες. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται και πολλά φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης (καθαρές απομονωμένες ενώσεις ή εξευγενισμένα εκχυλίσματα), λόγω των αναλγητικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους (Suleria et al., 2015).

Πίνακας 1. Φάρμακα από θαλάσσια φυσικά προϊόντα που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα.

Όνομα (εμπορική ονομασία)	Παραγωγός οργανισμός (κατηγορία)	Φυσικό προϊόν (χημική κατηγορία)	Δράση
Cephalosporin C	<i>Cephalosporium acremonium</i> (μύκητας)	β-λακτάμη	αντιβιοτική
Cytarabine (Cytosar-U®)	<i>Tethya crypta</i> (σπόγγος)	spongothymidine (νουκλεοσίδης)	αντικαρκινική
Vidarabine (Vira-A®)	<i>Tethya crypta</i> (σπόγγος)	spongouridine (νουκλεοσίδης)	αντιική (αποσύρθηκε στις ΗΠΑ)
Ziconotide (Prialt®)	<i>Conus magnus</i> (γαστερόποδο)	ω-conotoxin (πεπτίδιο)	αναλγητική
Trabectedin (Yondelis®)	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (ασκίδιο)	ecteinascidin 743 (αλκαλοειδές)	αντικαρκινική
Eribulin (Halaven®)	<i>Halichondria okadaï</i> (σπόγγος)	halichondrin B (πολυαιθερικό μακρολίδιο)	αντικαρκινική
Brentuximab vedotin (SGN-35) (Adcetris®)	<i>Dolabella auricularia</i> (γαστερόποδο)	dolastatin 10 (πεπτίδιο με χιμαιρικό αντίσωμα)	αντικαρκινική
ι-carrageenan (Carragelose®)	<i>Euchema</i> sp. / <i>Chondrus</i> sp. (ροδοφύκη)		αντιική
ω-3-acid ethyl esters (Lovaza®)	ψάρια	ω-3-λιπαρά οξέα	κατά της υπερτριγλυκεριδαιμίας
Salinosporamide A (Marizomib®)	<i>Salinispora tropica</i> (βακτήριο)	β-λακτόνη-γ-λακτάμη	αντικαρκινική

Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν πολλαπλά οφέλη για την υγεία, όπως καρδιοπροστατευτική δράση, βελτίωση της υπέρτασης και των αρθρικών ισχυαλιών (Sijtsma & de Swaaf, 2004) και απομονώνονται κυρίως από ιχθυέλαια και μικροφύκη. Το κολλαγόνο και η ζελατίνη, πρωτεΐνες που αποτελούν λειτουργικά συστατικά τροφίμων και καλλυντικών, εμφανίζουν πλεονεκτήματα όταν απομονώνονται από θαλάσσιους οργανισμούς (Tziveleka et al., 2017).

Οι ψευδοπτεροσίνες, διτερπενικοί γλυκοσίδες από το μαλακό κοράλλι *Pseudopterogorgia elisabethae*, χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα σε δερμοκαλλυντικά προϊόντα (Estee Lauder Resilience™) και τιτλοδοτημένα εκχυλίσματα του κοραλλιού είναι εμπορικά διαθέσιμα (Gorgonia Extract- Lipo Chemicals Inc), παρόλο που βρίσκονται ακόμη στο στάδιο προχωρημένων προκλινικών και κλινικών δοκιμών ως αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά φάρμακα.

Εκχυλίσματα φυκών πλούσια σε πολυσακχαρίτες με θεικές ρίζες χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα συστατικά καλλυντικών για τις ενυδατικές, αναπλαστικές και αντιγηραντικές τους ιδιότητες. Οι εξωπολυσακχαρίτες (exopolysaccharides, EPS) βρίσκονται σε εκχυλίσματα βακτηρίων και χρησιμοποιούνται σε κρέμες για την περιποίηση και την καταπράυνση του ευαίσθητου και ερεθισμένου δέρματος. Αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν επίσης οι φλωροταννίνες (φαινολικές ενώσεις από φαιοφύκη), τα καρτενοειδή (χρωστικές μικροφυκών π.χ. ασταξανθίνη, φουκοξανθίνη κ.ά.), και ένζυμα από βακτήρια που δρουν ως σαρωτές ελευθέρων ριζών.

1.2.3. Λοιπές εφαρμογές θαλάσσιων φυσικών προϊόντων

Εκτός των ανωτέρω, τα θαλάσσια προϊόντα βρίσκουν και άλλες γενικότερες εφαρμογές. Από μύδια του γένους *Mytilus* παραλαμβάνονται ίνες που έχουν μεγάλη αντοχή, είναι βιοαποικοδομήσιμες και χρησιμοποιούνται ως χειρουργικές ίνες. Ο σκελετός των σκληρών κοραλλιών αποτελείται κυρίως από υδροξυαπατίτη, ο οποίος επιτρέπει την ελεύθερη ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων και των οστών και χρησιμοποιείται σε ορθοπεδικά εμφυτεύματα και στην οδοντιατρική. Η ορμόνη καλσιτονίνη από τον σολομό που είναι παρεμφερής με την ανθρώπινη χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Η «γη διατόμων» είναι ένα πορώδες υλικό με πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία (προσρόφηση της νιτρογλυκερίνης στην παρασκευή του δυναμίτη, υλικό χρωματογραφίας, μέσο διήθησης στην οινοποίηση και ζυθοποιία).

Στο αίμα του αρθροπόδου *Limulus polyphemus* υπάρχει ένα συστατικό πρωτεϊνικής φύσης το οποίο προκαλεί πήξη του αίματος όταν έρχεται σε επαφή με ενδοτοξίνες (-)-Gram βακτηρίων. Το **LAL test (Limulus Amoebocyte Lysate test)** χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας ενδοτοξινών σε προϊόντα ιατρικής και φαρμακευτικής χρήσης. Η πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού (**Green Fluorescent Protein**) από τη μέδουσα *Aequora victoria* βρίσκει χρήση στη μοριακή βιολογία και στη μικροσκοπία φθορισμού για την παρατήρηση των ζώντων κυττάρων. Τα ένζυμα *Taq* πολυμεράση και *Pfu* είναι DNA πολυμεράσες που απομονώθηκαν από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και το αρχαίο θερμόφιλο *Pyrococcus furiosus*, αντίστοιχα, και χρησιμοποιούνται στη μοριακή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Τα γαστερόποδα του γένους *Aplysia* διαθέτουν μεγάλα νευρικά κύτταρα και αποτελούν πειραματόζωα για τη μελέτη του εγκεφάλου.

Πολυσακχαρίτες, όπως τα υδροκολλοειδή καρραγενάνη, άγαρ, αλγίνη και αλγινικά άλατα από ροδοφύκη και φαιοφύκη, χρησιμοποιούνται ως πηκτικά μέσα και σταθεροποιητές, ενώ εφαρμογή βρίσκει και η χιτίνη που συνήθως παραλαμβάνεται από τα κελύφη θαλάσσιων καρκινοειδών (καβούρια και γαρίδες) και τα παράγωγά της, όπως η χιτοζάνη που αποτελεί το

αποακετυλιωμένο πολυμερές της χιτίνης και τα COS (Chitin OligoSaccharides) που προκύπτουν μέσω χημικής ή ενζυματικής υδρόλυσης της χιτοζάνης.

Από το προσωβράγχιο *Murex brandaris* παράγεται η χρωστική ουσία ινγκοτίνη και από τα οπισθοβράγχια γαστερόποδα του γένους *Aplysia* η απλυσιοβιολίνη. Από καλλιέργειες μικροφυκών (*Dunaliella* και *Spirulina*) παράγονται φυσικές χρωστικές (καροτένια), πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), στερόλες και βιταμίνες. Οι χρωστικές έχουν αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, κατά της παχυσαρκίας, νευροπροστατευτικές, αντι-αγγειογενείς, κ.ά. δράσεις (Pangestuti & Kim, 2011). Επιπλέον, τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται στον βιολογικό καθαρισμό για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων και στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Τέλος, ιχνοστοιχεία θαλάσσιας προέλευσης, όπως σίδηρος, ιώδιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρος βρίσκουν πολλές εφαρμογές.

Η Θαλάσσια Φαρμακογνωσία δεν εστιάζει το ενδιαφέρον της μόνο στην απομόνωση και μελέτη νέων βιοδραστικών μεταβολιτών και τοξινών από θαλάσσιους οργανισμούς, αλλά και στη διερεύνηση των οικολογικών σχέσεων που αυτοί επηρεάζουν.

Ακόμη, η θαλάσσια χημική οικολογία προσπαθεί να δώσει λύση και στο πρόβλημα της βιοεπίστρωσης, δηλαδή της εγκατάστασης μικροοργανισμών, φυκών και ζώων σε εμβαπτισμένες στο νερό επιφάνειες, η οποία αποτελεί ένα επιζήμιο και καταστροφικό φυσικό φαινόμενο και επηρεάζει οικολογικά και οικονομικά δραστηριότητες, όπως η ναυσιπλοΐα. Συμβαίνει στις επιφάνειες των πλοίων, αυξάνοντας το κόστος κίνησης και επιταχύνει τη διάβρωση των μεταλλικών επιφανειών, αυξάνοντας το κόστος επισκευής και συντήρησης. Παράλληλα, κάποια βακτήρια ή/και μύκητες έχουν τη δυνατότητα να διεισδύουν και να αναπτύσσονται σε διάφορα είδη περιβαλλοντικών κοιλοτήτων, ακόμη και σε ιατρικά εργαλεία (φακοί επαφής, καθετήρες, ενδοτραχειακοί σωλήνες, τεχνητοί σύνδεσμοι, τεχνητές καρδιακές βαλβίδες) (Donlan, 2001). Στην αρχή του φαινομένου αυτού δημιουργείται ένα βιοϋμένιο από μια ποικιλία μικροοργανισμών (κυρίως από μικροαποικίες βακτηρίων) που προσκολλούνται σε επιφάνειες, το οποίο λειτουργεί ως συγκολλητική ύλη ανάμεσα σε διάφορα είδη οργανισμών που στη συνέχεια αυτοπροστατεύονται με τη δημιουργία μιας εξωτερικής μήτρας από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Στη συνέχεια, εποίκίζουν μακροφύκη και ασπόνδυλα, καταλήγοντας σε μια σύνθετη κοινωνία αποτελούμενη από χιλιάδες οργανισμούς (Stoodley et al., 2002). Με την παρατήρηση ότι πάρα πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί ανθίστανται στη βιοεπίστρωση των επιφανειών τους, οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγουν δοκιμάζονται ως προς την αποτελεσματικότητά τους ως αντιβιοεπιστρωτικοί παράγοντες. Η ανάγκη για εύρεση φιλικών προς το περιβάλλον ουσιών είναι επιτακτική λόγω της περιβαλλοντικής ρύπανσης που έχει προκληθεί από τις τοξικές (αν και αποτελεσματικές) οργανομεταλλικές ενώσεις του κασσιτέρου και του χαλκού

που μέχρι πριν λίγο καιρό χρησιμοποιούνταν στα υφαλοχρώματα (Satheesh et al., 2016).

1.2.4. Δυσκολίες και προκλήσεις στη Θαλάσσια Φαρμακογνωσία

Η Θαλάσσια Φαρμακογνωσία είναι ένα σχετικά νέο πεδίο έρευνας, η οποία όμως χαρακτηρίζεται από εγγενείς δυσκολίες. Η αδυναμία καθορισμένης συστηματικής κατάταξης σε ορισμένα θαλάσσια είδη, καθώς και το γεγονός ότι πολλά εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστα, μπορεί να αποτελέσει σημαντική τροχοπέδη στη βιβλιογραφική αναζήτηση για τις χημικές κατηγορίες των μεταβολιτών που παράγει το υπό εξέταση είδος. Η χρήση της χημειοταξινομικής δεν είναι πάντοτε επιτυχής και μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη προσέγγιση στην πορεία απομόνωσης.

Ακόμη, πολλές φορές απαιτείται η συλλογή μεγάλης ποσότητας του υπό μελέτη οργανισμού για την απομόνωση φυσικών προϊόντων που απαντούν σε πολύ μικρή συγκέντρωση, γεγονός που επιφέρει και οικολογικές συνέπειες. Η γεωγραφική και εποχιακή διακύμανση στην παρουσία και συγκέντρωση των μεταβολιτών δυσχεραίνουν συχνά ακόμη περισσότερο την επαναληπτική δειγματοληψία.

Οι συνήθεις τεχνικές απομόνωσης οδηγούν στην απομόνωση νέων φυσικών προϊόντων σε μικρές ποσότητες, πολλές φορές μικρότερες του 1 mg. Η εξέλιξη της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) που αποτελεί το βασικότερο εργαλείο της Φαρμακογνωσίας έχει επιτρέψει την ταυτοποίηση μεταβολιτών σε επίπεδο nmol ή ακόμα και pmol (Dalisy & Molinski, 2010). Άλλες μέθοδοι ανάλυσης, όπως ο κυκλικός διχρωσμός, η φασματομετρία μάζας, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, αλλά και η συνεχής πρόοδος στην οργανική σύνθεση επιτρέπουν σήμερα υπό προϋποθέσεις την ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων που απομονώνονται σε ελάχιστες ποσότητες.

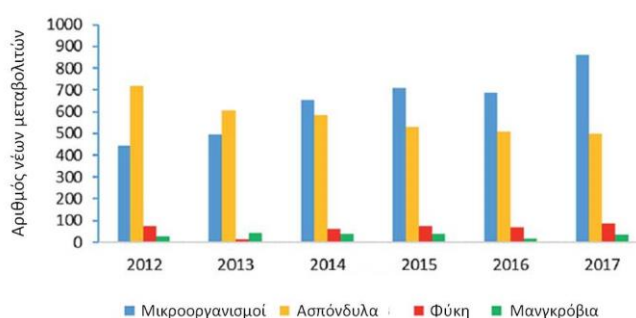
Αν ένας δευτερογενής μεταβολίτης παρουσιάζει ενδιαφέρον για εμπορική αξιοποίηση, θα πρέπει να εξασφαλιστεί όσο το δυνατόν η διαθεσιμότητά του, είτε μέσω της συνθετικής χημείας ή μέσω βιοτεχνολογικών προσεγγίσεων. Η ολική σύνθεση εξαιρετικά πολύπλοκων δομών μπορεί να αποδειχθεί αρκετά δύσκολη, ενώ τα απαραίτητα γονίδια για τη βιοσύνθεση του μεταβολίτη δεν είναι πάντα γνωστά. Αν είναι δυνατή η καλλιέργεια του οργανισμού (ασπόνδυλα, φύκη, μικροοργανισμοί), θα ήταν μια αποτελεσματική λύση, υπό την προϋπόθεση ότι αυτός είναι και ο πραγματικός παραγωγός της ουσίας. Έχει δειχθεί ότι πολλές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ασπόνδυλα παράγονται από μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι είτε συμβιωτικοί ή παθογόνοι (Penesyan et al., 2010).

Αν και σχετικά μικρός αριθμός βιοδραστικών φυσικών προϊόντων απομονωμένων από θαλάσσιους οργανισμούς βρίσκονται σήμερα στο εμπόριο ως φαρμακευτικά προϊόντα, το ποσοστό επιτυχίας για την εύρεση νέων φαρμάκων από τη θάλασσα είναι 1,7-3,3 φορές

μεγαλύτερο από τον μέσο όρο (1 φάρμακο ανά 5.000-10.000 ελεγμένων ενώσεων) (Gerwick & Moore, 2012). Παρά τις δυσκολίες, η Θαλάσσια Φαρμακογνωσία προσελκύει το ενδιαφέρον ερευνητών από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα με αυξανόμενη συχνότητα και αποτελεί έναν βασικό ερευνητικό τομέα με πολλά κοινωνικά και οικονομικά οφέλη.

1.2.5. Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί ως παραγωγοί βιοδραστικών μεταβολιτών

Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, ιδιαίτερα οι μύκητες και τα βακτήρια, έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία 15 χρόνια, καθώς αποτελούν μια αστείρευτη πηγή δομικά διαφορετικών βιοδραστικών μεταβολιτών (Εικ. 3) (Carroll et al., 2019; Gerwick & Fenner, 2013). Τα φυσικά προϊόντα που απομονώνονται από θαλάσσιους μικροοργανισμούς αναμένεται να έχουν μεγάλη συνεισφορά στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, καθώς υπάρχει η δυνατότητα απομόνωσης μεγαλύτερης ποσότητας των ενώσεων ενδιαφέροντος, με μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια ή με τον γενετικό χειρισμό του γονιδιώματος του παραγωγού μικροοργανισμού (Romano et al., 2017; Waters et al., 2010).



Εικόνα 3. Πηγές απομόνωσης νέων μεταβολιτών θαλάσσιας προέλευσης την περίοδο 2012-2017 (Carroll et al., 2019).

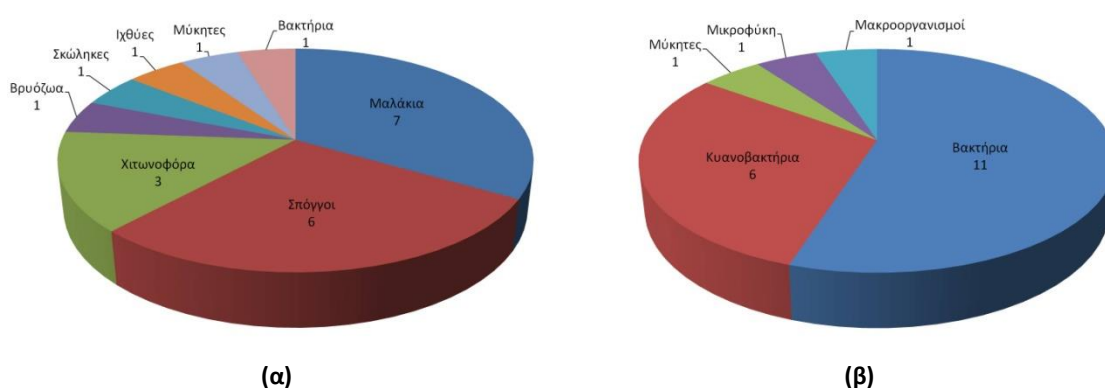
Με την εξέλιξη των τεχνικών απομόνωσης και καλλιέργειας των μικροοργανισμών, όλο και περισσότεροι από αυτούς είναι διαθέσιμοι για μελέτη. Επειδή σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99% από αυτούς δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν με την υπάρχουσα τεχνογνωσία, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι προσέγγισης τους, οι οποίοι βασίζονται στην απομόνωση του συνολικού DNA της βακτηριακής κοινότητας και την ανάλυση του με τη βοήθεια της μεταγενομικής. Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα να εκφραστούν τα γονίδια που βιοσυνθέτουν τους επιθυμητούς δευτερογενείς μεταβολίτες σε ετερόλογα συστήματα (Martins et al., 2014).

Οι μικροοργανισμοί είτε συμβιώνουν με θαλάσσιους μακροοργανισμούς ή βρίσκονται στη στήλη του νερού ή σε θαλάσσια ιζήματα. Το βενθικό θαλάσσιο περιβάλλον θα μπορούσε γλαφυρά να περιγραφεί ως «σούπα μικροοργανισμών», με τους πληθυσμούς των βακτηρίων

να κυμαίνονται από 10^3 έως 10^6 ανά mL στη στήλη του νερού και περίπου 10^9 ανά mL στο ίζημα. Επίσης, διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες και κυανοβακτήρια) που αναπτύσσουν συμβιωτική ή κοινοβιοτική σχέση με μακροοργανισμούς είναι οι πραγματικοί παραγωγοί μεγάλου αριθμού βιοδραστικών ουσιών που αρχικά είχαν απομονωθεί από μακροοργανισμούς (Πίν. 2) (Simmons et al., 2008). Ενδεικτικά, στην Εικόνα 4 φαίνονται οι πηγές απομόνωσης 21 βιοδραστικών προϊόντων που είναι εμπορικά διαθέσιμα ή βρίσκονται σε κλινικές μελέτες, καθώς και οι πραγματικές ή οι αναμενόμενες πηγές αυτών (Gerwick & Fenner, 2013).

Πίνακας 2. Πραγματικές πηγές βιοδραστικών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από θαλάσσιους μακροοργανισμούς.

Βιοδραστικός μεταβολίτης (Δράση)	Οργανισμός πρώτης απομόνωσης	Πραγματικός παραγωγός οργανισμός
Δολοστατίνη 10 (αντιμυτωτική)	<i>Dolabella auricularia</i> (γαστερόποδο)	<i>Symploca hypnoides</i> (κυανοβακτήριο)
Βρουοστατίνη 1 (αντικαρκινική)	<i>Bugula neritina</i> (βρυόζωο)	<i>Candidatus Endobugula sertula</i> (ενδοσυμβιωτικό γ-πρωτεοβακτήριο)
Καχαλαλιδιο F (αντικαρκινική, αντιψωριακή)	<i>Elysia rufescens</i> (μαλάκιο) <i>Bryopsis</i> sp. (χλωροφύκος)	<i>Vibrio</i> sp. (βακτήριο)
Ψευδοπτεροσίνη E (αντιφλεγμονώδης)	<i>Pseudopterozorgia elisabethae</i> (μαλακό κοράλλι)	<i>Symbiodinium</i> sp. (δινωμαστιγωτό)
Εκτεινασιδίνη 743 (αντικαρκινική) Yondelis®	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (ασκίδιο)	<i>Endoecteinascidia frumentensis</i> (υποχρεωτικά συμβιωτικό βακτήριο)



Εικόνα 4. (α) Πηγές απομόνωσης και (β) πραγματικές ή οι αναμενόμενες πηγές 21 βιοδραστικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης που βρίσκονται στην αγορά ή σε κλινικές μελέτες (Gerwick & Fenner, 2013).

1.3. Βακτήρια

1.3.1. Γενικά

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί με απλή οργάνωση, με μέγεθος συνήθως μικρότερο από 5 μm, τα οποία ζουν μεμονωμένα ή δημιουργούν χαλαρά κοινόβια. Η αναπαραγωγή τους γίνεται συνήθως με απλή διχοτόμηση. Μπορεί να είναι υποχρεωτικά αερόβια, υποχρεωτικά αναερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Μερικά είδη σχηματίζουν ενδοσπόρια ή εξωσπόρια που τους προσδίδουν μεγάλη αντοχή σε δυσμενείς συνθήκες. Με βάση την πηγή ενέργειας και την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιούν διακρίνονται σε i) φωτοαυτότροφα (φως και CO₂, αντίστοιχα), ii) φωτοετερότροφα (φως και οργανικές ενώσεις, αντίστοιχα), iii) χημειοαυτότροφα (ανόργανες ενώσεις και CO₂, αντίστοιχα), και iv) χημειοετερότροφα (μόνο οργανικές ενώσεις).

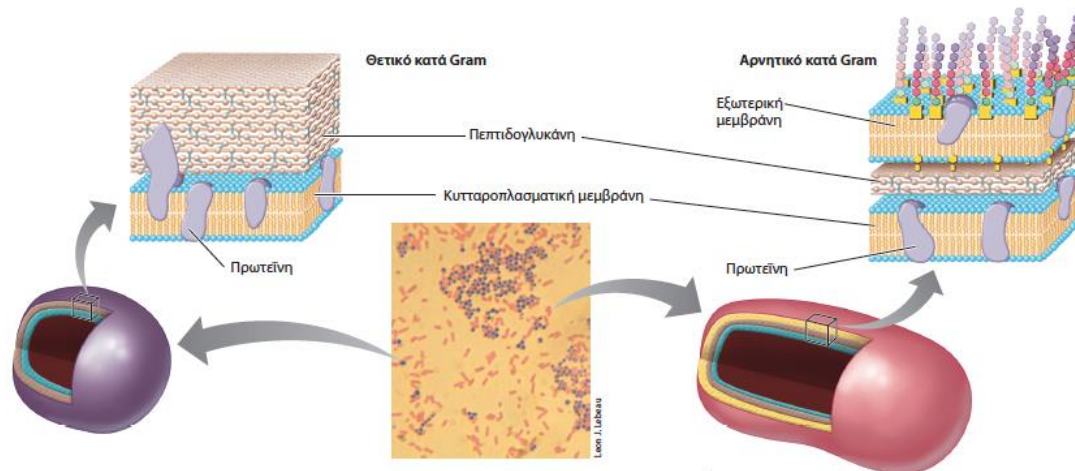
Όσον αφορά τη μορφολογία τους διακρίνονται σε τρεις βασικές μορφές: i) τους κόκκους (σφαιρικό ή ωσειδές σχήμα), ii) τους βάκιλλους (ραβδοειδές/κυλινδρικό σχήμα) και iii) τα σπειρίλλια/δονάκια (σπειροειδή, με ελικοειδές μοτίβο και καμπυλότητες) (Εικ. 5). Επίσης, υπάρχουν και άλλες μορφές, όπως νηματοειδή βακτήρια και σπειροχαίτες, οι οποίες εμφανίζουν έντονη υπερσυσπείρωση. Σε κάποιες περιπτώσεις τα θυγατρικά κύτταρα μετά τη διαίρεση δεν αποχωρίζονται, δημιουργώντας ποικίλους τύπους αποικιών (διπλόκοκκοι, τετράκοκκοι, στρεπτόκοκκοι κλπ.). Κάποια χρησιμοποιούν μαστίγια για την κίνηση τους και ανάλογα με τη θέση αυτών υπάρχουν μονότριχα ή λοφότριχα μονοπολικά, διπολικά ή περίτριχα βακτήρια.



Εικόνα 5. Αντιπροσωπευτικές μορφολογίες βακτηρίων.

Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος αποτελεί ένα αρκετά σαφές διακριτικό χαρακτηριστικό (Εικ. 6). Το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων που είναι θετικά στη χρώση Gram (ιώδης χρωματισμός) αποτελείται έως και 90% από πεπτιδογλυκάνη, ενώ στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια το ποσοστό της πεπτιδογλυκάνης περιορίζεται και αντικαθίσταται από ένα λιπιδικό περίβλημα. Η πολύστοιχη και πολυσύνθετη δομή του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων τα προστατεύει και τα καθιστά ανθεκτικότερα στα

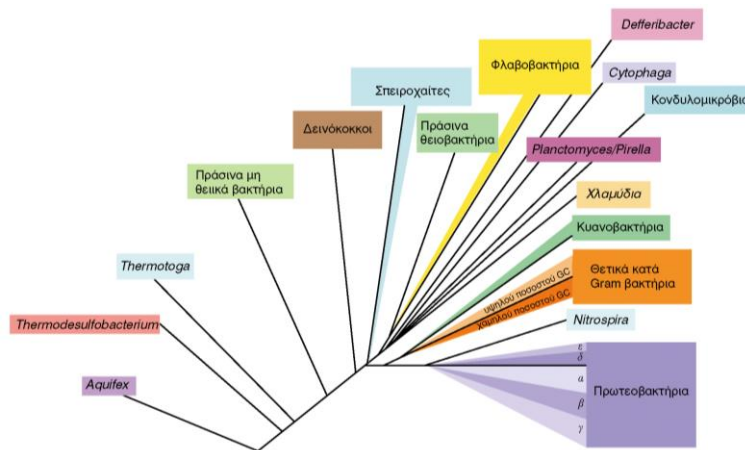
αντιβιοτικά.



Εικόνα 6. Κυτταρικό τοίχωμα θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Madigan et al., 2010).

Για την ταξινόμηση και την επαρκή περιγραφή των βακτηρίων απαιτείται ενδελεχής μελέτη μορφολογικών, βιοχημικών, φυσιολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών (Brenner et al., 2001). Η ταξινομική είναι μία δυναμική επιστήμη και προσαρμόζεται συνεχώς στα νεότερα δεδομένα, οπότε και προκύπτουν αλλαγές στην υπάρχουσα ταξινόμηση και στα κριτήριά της (Larage et al., 1992). Μέχρι το επίπεδο του γένους η φυλογενετική ταξινόμηση βασίζεται στην ανάλυση των αλληλουχιών 16S rRNA (Ludwig & Klenk, 2001).

Ο διαχωρισμός των προκαρυωτικών οργανισμών σε δύο ομάδες, τα Βακτήρια (Bacteria) και τα Αρχαία (Archaea), οι οποίες αναγνωρίζονται ως ξεχωριστά βασίλεια ή υπερβασίλεια, είναι ευρύτατα αποδεκτός (Τζάκου & Κωνσταντινίδης, 2009). Από μελέτες καλλιέργειών είναι γνωστές τουλάχιστον 17 μείζονες γενεαλογικές γραμμές βακτηρίων (Εικ. 7) (Madigan et al., 2010). Οι πολυπληθέστερες ομάδες είναι τα πρωτεοβακτήρια, τα κυανοβακτήρια και τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια διαχωρίζονται σε δύο υποομάδες, με βάση την αναλογία βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης (G+C) πολύ μεγαλύτερο ή πολύ μικρότερο από το 50%, αντιστοίχως, στο DNA τους. Τα πρωτεοβακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια και παρουσιάζουν ευρύτατη μεταβολική ποικιλομορφία.



Εικόνα 7. Φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων γενεαλογικών γραμμών των βακτηρίων, βασισμένο σε συγκρίσεις των αλληλουχιών του rRNA (Madigan et al., 2010).

1.3.2. Οικολογική σημασία των βακτηρίων

Τα βακτήρια είναι ευρύοικοι οργανισμοί και μπορούν να αναπτυχθούν σε ποικίλα οικοσυστήματα. Μερικά είδη ευδοκούν σε ενδιαιτήματα όπου επικρατούν ακραίες τιμές σε μία ή περισσότερες περιβαλλοντικές παραμέτρους και μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους (ακραίοφιλοι) (Πίν. 3) (Madigan et al., 2010). Ανάλογα με τις απαιτήσεις σε pH διακρίνονται σε οξεόφιλους ($\text{pH} < 3$) και αλκαεόφιλους ($\text{pH} > 9$) οργανισμούς. Ανάλογα με τις απαιτήσεις σε θερμοκρασία διακρίνονται σε ψυχρόφιλους ($-10 - 10\text{ }^\circ\text{C}$), θερμόφιλους ($45 - 80\text{ }^\circ\text{C}$) και υπερθερμόφιλους ($70 - 125\text{ }^\circ\text{C}$) οργανισμούς. Ανάλογα με τις απαιτήσεις ή την ανοχή σε συγκέντρωση NaCl διακρίνονται σε αλοανεκτικούς, αλόφιλους ($> 0.2\text{ M}$) και ακραίους αλόφιλους οργανισμούς. Ανάλογα με τις απαιτήσεις ή την ανοχή σε υδροστατική πίεση διακρίνονται σε βαροανεκτικούς, βαρόφιλους ($300 - 1100\text{ atm}$) και ακραίους βαρόφιλους οργανισμούς.

Τα βακτήρια συμμετέχουν στους βιογεωχημικούς κύκλους και παίζουν σημαντικό ρόλο στα οικοσυστήματα, ανακυκλώνοντας στοιχεία στη φύση (C, S, N, O). Τα φωτοσυνθετικά βακτήρια συμβάλλουν στη διατήρηση της ισορροπίας του συνολικού άνθρακα. Τα σαπροφυτικά βακτήρια τρέφονται με νεκρή οργανική ύλη και είναι μερικώς υπεύθυνα για την αποσύνθεση και ανακύκλωση οργανικού υλικού στο έδαφος, παράγοντας περισσότερο από το 90% του CO_2 στην ατμόσφαιρα που χρησιμοποιείται από τα φυτά για τη φωτοσύνθεση. Τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι υπεύθυνα για περισσότερο από το μισό του συνολικού αζώτου που δεσμεύεται στους ωκεανούς. Τα μεθανότροφα βακτήρια αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με θαλάσσιους σπόγγους και δίθυρα και τους βοηθούν να εξασφαλίσουν την τροφή τους.

Πίνακας 3. Κατηγορίες και παραδείγματα ακραιόφιλων οργανισμών^α.

Περιγραφικός όρος	Γένος/ είδος	Χώρος (domain)	Ενδιαίτημα	Ελάχιστο	Άριστο	Μέγιστο
Υπερθερμόφιλο	<i>Methanopyrus kandleri</i>	Αρχαία	Υποθαλάσσιες υδροθερμικές πηγές	90 °C	106 °C	122 °C ^β
Ψυχρόφιλο	<i>Psychromonas ingrahamii</i>	Βακτήρια	Θαλάσσιος πάγος	-12 °C	5 °C	10 °C
Οξεόφιλο	<i>Picrophilus oshimae</i>	Αρχαία	Όξινες θερμές πηγές	-0.06	0.7 ^γ	4
Αλκαλεόφιλο	<i>Natrobacterium gregoryi</i>	Αρχαία	Λίμνες πλούσιες σε Na ₂ CO ₃	8.5	10 ^δ	12
Βαρόφιλο	<i>Moritella yayanosii</i>	Βακτήρια	Ιζήματα ωκεάνιων πυθμένων	500 atm	700 atm ^ε	>1000 atm
Αλόφιλο	<i>Halobacterium salinarum</i>	Αρχαία	Αλυκές	15 %	25%	32%

^α Οι οργανισμοί που αναφέρονται είναι οι σημερινοί «κάτοχοι των ρεκόρ» όσον αφορά την ανάπτυξη σε εργαστηριακή καλλιέργεια υπό την αναφερόμενη ακραία συνθήκη.

^β Αναερόβιο που παρουσιάζει άριστη ανάπτυξη στους 122 °C μόνο υπό πίεση αρκετών ατμοσφαιρών.

^γ Το *P. oshimae* είναι επίσης θερμοόφιλο, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 60 °C.

^δ Το *N. gregoryi* είναι επίσης ακραίο αλόφιλο, με άριστη αύξηση σε περιβάλλον με περιεκτικότητα 20% σε NaCl.

^ε Το *M. yayanosii* είναι επίσης ψυχρόφιλο, με άριστη αύξηση κοντά στους 4 °C.

1.3.3. Οικονομική σημασία των βακτηρίων

Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ως ζύμες σε βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων, ποτών και αρτοποιημάτων (κεφίρ, τυρί, γιαούρτι, κρασί, ξύδι, μπίρα κλπ.). Συμβάλλουν στην αποικοδόμηση παραπροϊόντων μετατρέποντάς τα σε βιοκαύσιμα ή άλλα χρήσιμα υλικά (π.χ. ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *Bacillus stearothermophilus* μας επιτρέπει να παράγουμε με μικρό κόστος αιθανόλη από γεωργικά απόβλητα). Βρίσκουν εφαρμογή στον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων, καθώς μπορούν να πέπτουν πολλά από τα χημικά του πετρελαίου και δεν υπάρχει καμία σχεδόν φυσική ουσία που να μην μπορούν να αποικοδομήσουν. Κάποια αποτοξινώνουν το περιβάλλον από ανθρωπογενείς χημικούς ρυπαντές, όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια PCBs.

Στις καλλιέργειες τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι σημαντικά στη γεωργία, καθώς ζουν και δεσμεύουν άζωτο στα φυμάτια ριζών καλλιεργειών (π.χ. σόγια, μηδική). Επίσης, υπάρχουν είδη που χρησιμοποιούνται για τον βιολογικό έλεγχο εχθρών των καλλιεργειών (π.χ. *Bacillus thuringiensis*). Τέλος, με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας έχει ξεκινήσει η αξιοποίηση των μικροοργανισμών σε μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές διαδικασίες. Με τη

χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών συνθέτονται εξειδικευμένα προϊόντα μεγάλης εμπορικής αξίας. Διάφορα είδη ακτινοβακτηρίων είναι παραγωγοί σημαντικών αντιβιοτικών ουσιών (π.χ. τετρακυκλίνη, νεομυκίνη, αουρεομυκίνη, ερυθρομυκίνη, στρεπτομυκίνη). Είδη του γένους *Arthrospira*, τα οποία ανήκουν στα κυανοβακτήρια, αποτελούν ιδιαίτερα πλούσια πηγή πρωτεΐνης, βιταμινών και ιχνοστοιχείων και χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής και είναι ευρέως γνωστά με την ονομασία σπιρουλίνα.

Αρνητικές επιπτώσεις των βακτηρίων παρουσιάζονται στον τομέα της δημόσιας υγείας, καθώς είναι οι αιτίες διάφορων ασθενειών. Επίσης, συμβάλλουν στην αλλοίωση εδώδιμων γεωργικών προϊόντων. Τα κυανοβακτήρια παράγουν τοξίνες που μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στον τελικό καταναλωτή, τον άνθρωπο. Ακόμη, ευθύνονται πολλές φορές για φαινόμενα «άνθισης φυτοπλαγκτού» (algal blooms) που καλύπτουν μεγάλες εκτάσεις και έχουν αρνητικές οικολογικές συνέπειες (θάνατος ψαριών και άλλων οργανισμών από την έλλειψη οξυγόνου).

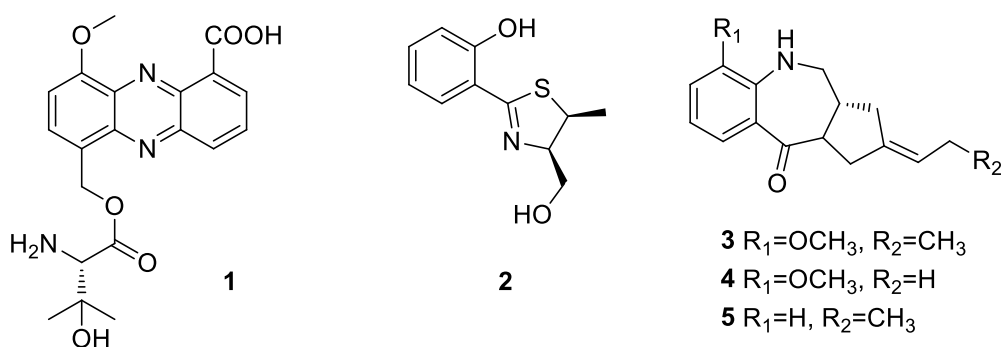
1.4. Βακτήρια θαλάσσιας προέλευσης ως πηγές φυσικών προϊόντων

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώνονται από θαλάσσια βακτήρια χαρακτηρίζονται από ποικιλία ως προς τη δομή και τις δράσεις τους. Τα θαλάσσια βακτήρια επιβιώνουν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να έχουν αναπτύξει μοναδικές βιοσυνθετικές και μεταβολικές οδούς, οι οποίες δεν υπάρχουν στα χερσαία βακτήρια. Δεν υπάρχει σαφής διαχωριστική γραμμή μεταξύ θαλάσσιων και χερσαίων βακτηρίων. Μικροοργανισμοί που βρέθηκαν σε παράκτια ύδατα ενδέχεται να έχουν βρεθεί εκεί από εκβολές ποταμών ή αποχετεύσεων, με αποτέλεσμα από μερικούς μικροοργανισμούς να έχουν απομονωθεί μεταβολίτες που έχουν παρόμοια δομή με τους χερσαίους. Ο έλεγχος της ικανότητας ανάπτυξης σε περιβάλλον με αυξημένη πίεση και αλατότητα, αλλά και η αλληλουχία του 16S ριβοσωμικού RNA μπορούν να αποτελέσουν ενδείξεις για την κατάταξή τους.

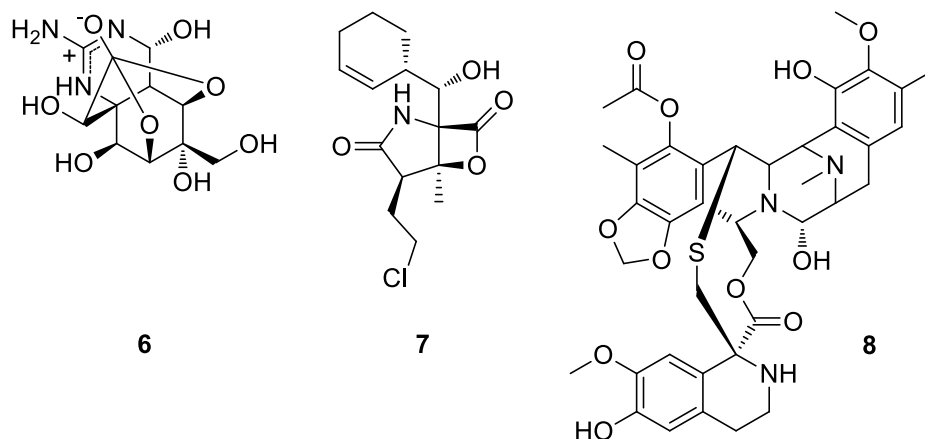
Τα ακτινοβακτήρια του γένους *Streptomyces* αποτελούν τα τελευταία χρόνια την κυριότερη πηγή απομόνωσης νέων μεταβολιτών. Το 2017 έχουν απομονωθεί από εκπροσώπους του γένους αυτού 137 μεταβολίτες, δηλαδή περισσότεροι από τους μισούς μεταβολίτες που απομονώθηκαν την ίδια περίοδο από θαλάσσια βακτήρια γενικά (Carroll et al., 2019). Επίσης, αρκετά παραγωγικά είναι τα γένη *Salinispora*, *Pseudoalteromonas*, *Nocardopsis* και *Bacillus*. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώνονται συνήθως από θαλάσσια βακτήρια είναι αλκαλοειδή, πεπτίδια, πολυκετίδια (μακρολίδια, μακρολακτόνες),

τερπένια, μεροτερπένια κ.ά.

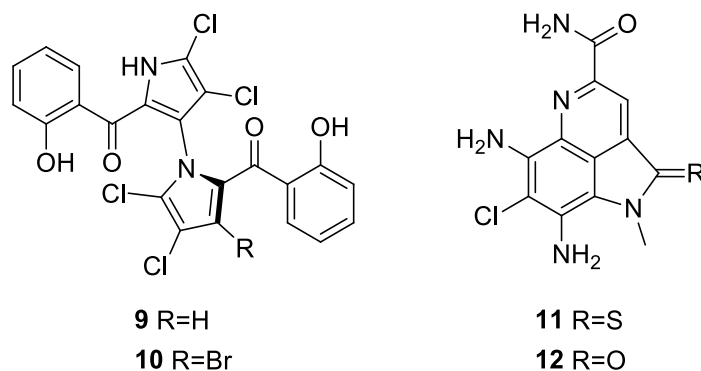
Από στέλεχος του αρνητικού κατά Gram *Pelagibacter variabilis*, το οποίο απομονώθηκε από το φαιοφύκος *Porocockiella variegeta*, ταυτοποιήθηκε μεταξύ άλλων η πελαγιομυκίνη A (pelagiomycin A) (**1**), ένα φαιναζινικό αλκαλοειδές με αντιβακτηριακή δράση έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηριακών στελεχών και κυτταροτοξική δράση έναντι διάφορων καρκινικών σειρών (Imamura et al., 1997). Η πουλικατίνη A (pulicatine A) (**2**) είναι ένα θειαζολικό αλκαλοειδές από ένα στέλεχος *Streptomyces* sp. που σχετίζεται με το μαλάκιο *Conus pulicarius* (Lin et al., 2010). Οι ουσαμπαμυκίνες (usabamycines) A (**3**), B (**4**) και C (**5**) είναι αλκαλοειδή με σκελετό ανθραμυκίνης που απομονώθηκαν από στέλεχος του γένους *Streptomyces* από θαλάσσιο ίζημα (Sato et al., 2011a) και έχουν δείξει ανασταλτική δράση στην πρόσληψη της σεροτονίνης.



Η εξαιρετικά δραστική νευροτοξίνη τετροδοτοξίνη (tetrodotoxin) (**6**) έχει βρεθεί σε πολλούς θαλάσσιους μακροοργανισμούς, όμως αποδείχθηκε ότι παράγεται από συμβιωτικά με αυτούς βακτήρια (*Pseudomonas* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio* sp.) (Yotsu et al., 1987). Το σαλινοσποραμίδιο A (salinosporamide A) (**7**) είναι μία β-λακτόνη-γ-λακτάμη που απομονώθηκε από στέλεχος του υποχρεωτικά θαλάσσιου ακτινοβακτηρίου *Salinispora tropica*. Είναι ένας ισχυρός, μη αναστρέψιμος αναστολέας του 20S πρωτεασώματος που επάγει την απόπτωση και χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος (Marizomib®) (Fenical et al., 2009). Το αλκαλοειδές εκτεινασιδίνη (ecteinascidin) 743, ή αλλιώς τραμπεκτιδίνη (trabectedin) (**8**), αποτελεί τη δραστική ουσία του φαρμάκου Yondelis® που χορηγείται για τη θεραπεία του σαρκώματος των μαλακών ιστών. Απομονώθηκε αρχικά από το ασκίδιο *Ecteinascidia turbinata*, όμως αργότερα διαπιστώθηκε ότι παράγεται από ένα στέλεχος του υποχρεωτικά συμβιωτικού με αυτό βακτηρίου *Candidatus Endoecteinascidia frumentensis* (D'Incalci & Galmarini, 2010).

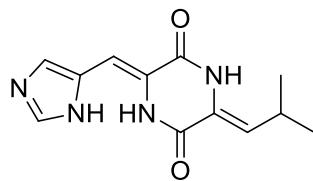


Οι μαρινοπυρρόλες (marine pyrrolones) A (**9**) και B (**10**) είναι αλογονωμένες χειρόμορφες διπυρρόλες που απομονώθηκαν από το υποχρεωτικά θαλάσσιο στέλεχος *Streptomyces* sp. CNQ-418, το οποίο βρέθηκε σε θαλάσσιο ιζημα και παρουσιάζουν ισχυρή δράση έναντι στελέχους *Staphylococcus aureus* ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA) (Hughes et al., 2008). Από θαλάσσιο ιζημα απομονώθηκε και το στέλεχος *Streptomyces* sp. CNP-698, το οποίο βιοσυνθέτει τα αμμοσαμίδια (ammosamides) A (**11**) και B (**12**), τα οποία είναι χλωριωμένα τρικυκλικά αλκαλοειδή πυρρολοκινολίνης (Hughes et al., 2009a). Το αμμοσαμίδιο A διαθέτει έναν πρωτότυπο θείο-γ-λακταμικό δακτύλιο και μετατρέπεται σταδιακά στο αμμοσαμίδιο B με την έκθεση του στον αέρα. Παρουσιάζουν *in vitro* κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς HCT-116 (ορθοκολικό καρκίνωμα) και φαίνεται ότι ο μηχανισμός δράσης τους στοχεύει την πρωτεΐνη μυσίνη (Hughes et al., 2009b).



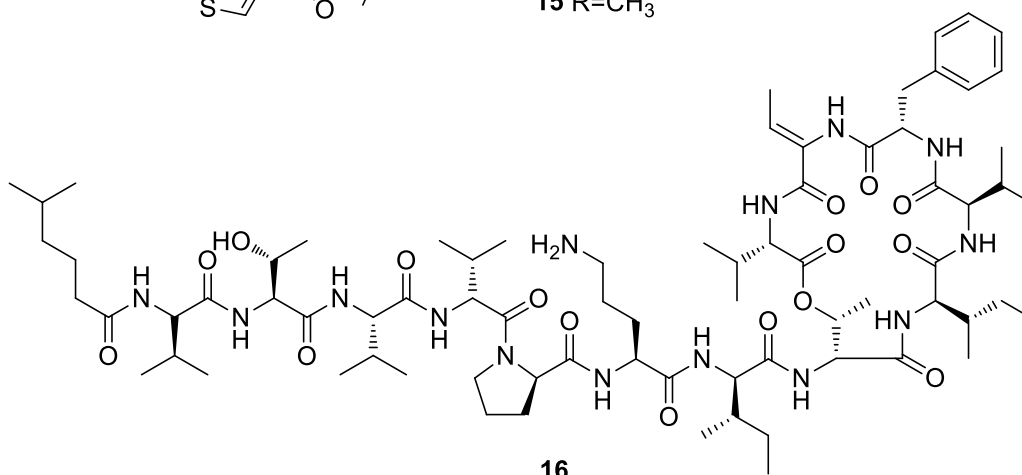
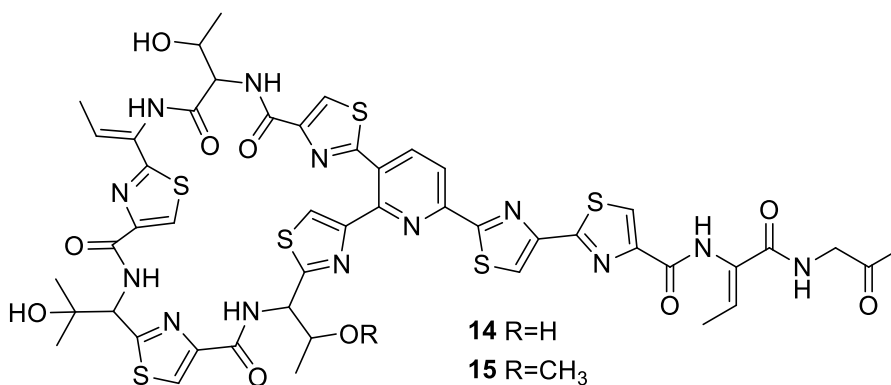
Τα περισσότερα πεπτίδια που απομονώνονται από θαλάσσια ακτινοβακτήρια είναι κυκλικά και περιέχουν σπάνια δομικά στοιχεία, όπως χρωμοφόρα ή ασυνήθιστα αμινοξέα. Τα πιο απλά πεπτίδια δημιουργούνται με συμπύκνωση δύο μόνο αμινοξέων που δημιουργούν έναν 2,5-δικετοπιπεραζινικό δακτύλιο. Αυτή η κατηγορία χημικών ενώσεων γενικά περιλαμβάνει σχετικά απλά μόρια μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες όμως με διάφορες

υποκαταστάσεις δημιουργούν εξαιρετικά πολύπλοκες δομές με ενδιαφέρουσα βιολογική δράση. Από στέλεχος του γένους *Streptomyces* έχει απομονωθεί η 2,5-δικετοπιπεραζίνη **13** που προέκυψε από τη συμπύκνωση μίας λευκίνης και μίας ιστιδίνης (Wang et al., 2013).

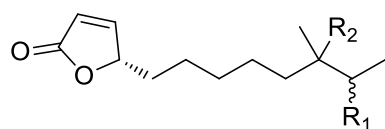


13

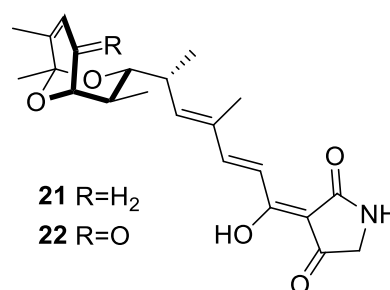
Από συμβιωτικά στελέχη *Bacillus cereus* του σπόγγου *Halichondria japonica* έχουν απομονωθεί τα θειοπεπτιδία **14** και **15** με αντιβακτηριακή δράση έναντι στελεχών σταφυλοκόκκων και εντεροκόκκων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά (Nagai et al., 2003). Το δεψιπεπτίδιο καχαλαλίδιο F (kahalalide F) (**16**), ενώ αρχικά απομονώθηκε από το μαλάκιο *Elysia rufescens* και αργότερα από το ενδιαίτημά του *Bryopsis pennata* (χλωροφύκος), φαίνεται να παράγεται από ενδοσυμβιωτικό στέλεχος του γένους *Vibrio* (Shilabin & Hamman, 2011). Βρίσκεται σε κλινικές μελέτες φάσης I ως αντικαρκινικό φάρμακο, ενώ το παράγωγό του ελισιδεψίνη (elisiderpsin) σε κλινικές δοκιμές φάσης II (Kang et al., 2018a).



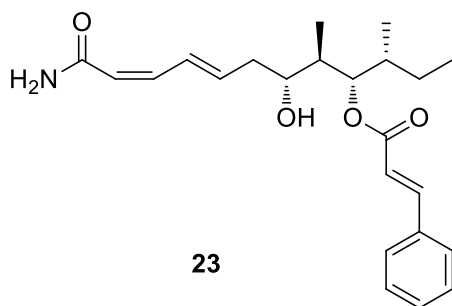
Από ένα στέλεχος *Streptomyces* sp. από θαλάσσιο ίζημα απομονώθηκαν τα βουτενολίδια **17-20** (Mukku et al., 2000). Οι τιρανταμυκίνες (tirandamycins) C (**21**) και D (**22**), με αντιβακτηριακή δράση έναντι στελέχους *Enterococcus faecalis* ανθεκτικού στη βανκομυκίνη, απομονώθηκαν επίσης από στέλεχος του γένους *Streptomyces* και διαθέτουν έναν δακτύλιο 2,4-πυρρολιдиноδιόνης που σχηματίζεται από τη συμπύκνωση ενός αμινοξέος με μία πολυκετιδική αλυσίδα (Carlson et al., 2009). Τα μπασιλίσκαμίδια (basiliskamides) A (**23**) και B (**24**) απομονώθηκαν από καλλιέργεια ενός στελέχους του *Bacillus laterosporus*, το οποίο απομονώθηκε από ένα μη ταυτοποιημένο θαλάσσιο σκώληκα και εμφανίζουν δράση *in vitro* έναντι του μύκητα *Candida albicans* (Barsby et al., 2002). Από το στέλεχος *Streptomyces antibioticus* H74-18 απομονώθηκαν οι αντιμυκίνες (antimycins) A₁₉ (**25**) και A₂₀ (**26**) με ισχυρή δράση έναντι του μύκητα *C. albicans* (Xu et al., 2011).



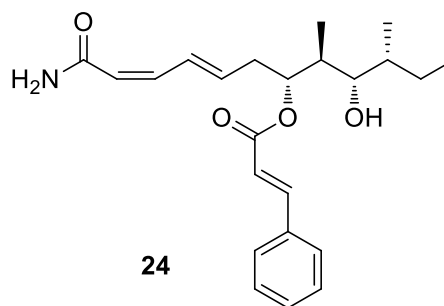
17 R₁=H, R₂=OH
18,19 R₁=OH, R₂=H
20 R₁=O, R₂=H



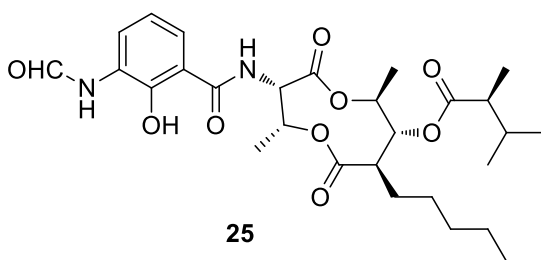
21 R=H₂
22 R=O



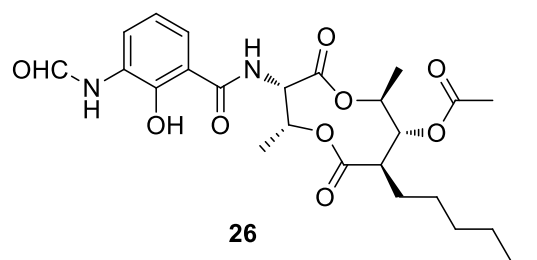
23



24



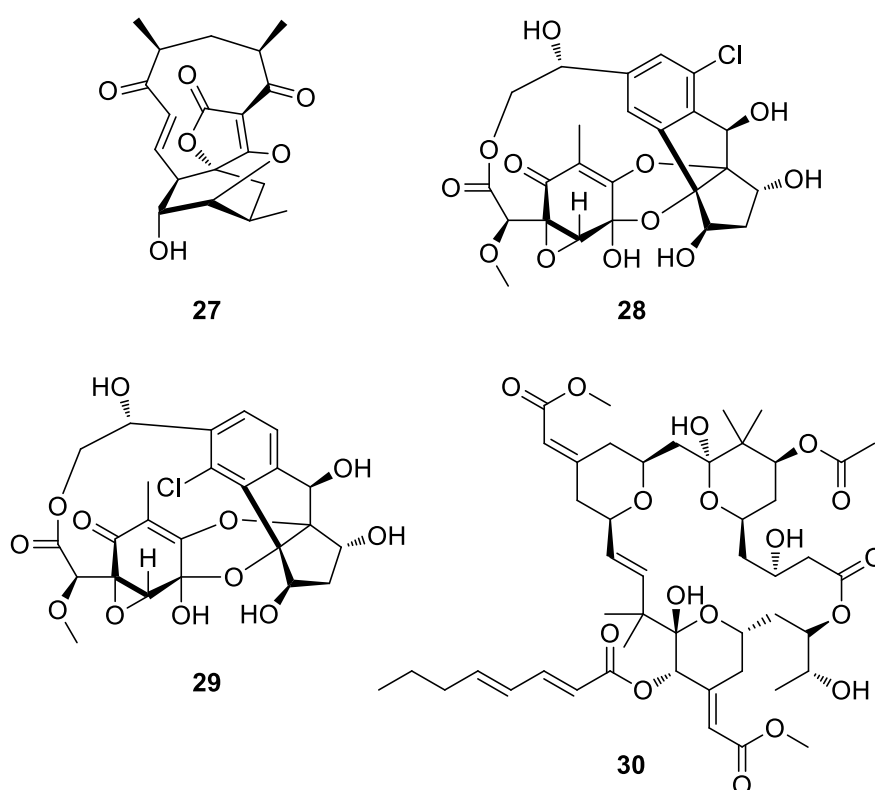
25



26

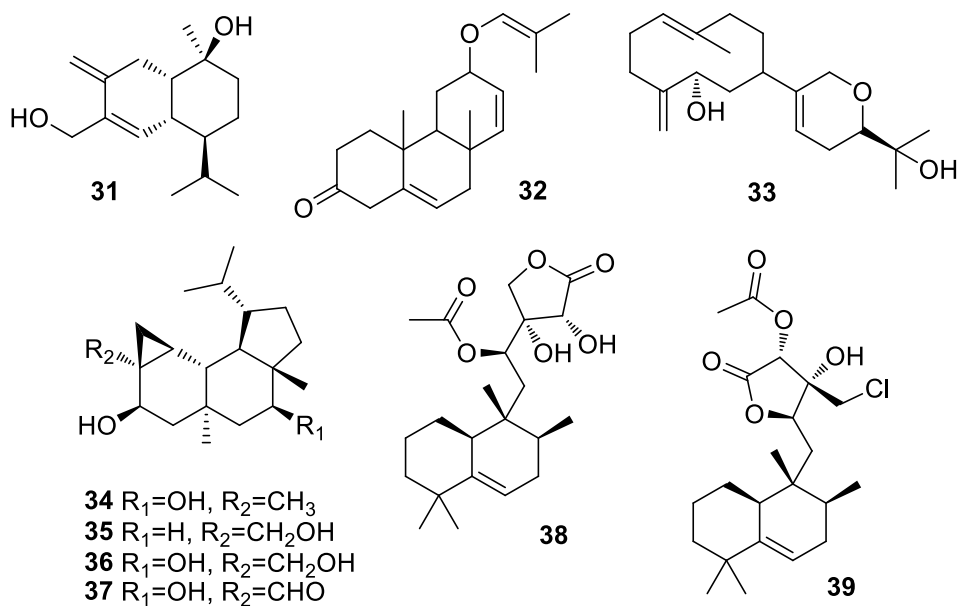
Η αβισσομυκίνη C (abyssomicin C) (**27**), μεταβολίτης ενός στελέχους *Verrucosisspora* sp. που απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα, είναι ένα πολυκυκλικό αντιβιοτικό δραστικό έναντι θετικών κατά Gram βακτηρίων, ακόμα και ανθεκτικών στελεχών του *S. aureus*, καθώς αναστέλλει τη βιοσύνθεση του *p*-αμινοβενζοϊκού οξέος, πρόδρομο μόριο του φολικού οξέος (Bister et al., 2004, Riedlinger et al., 2004). Τα σπορολίδια (sporolides) A (**28**) και B (**29**) είναι

χλωριωμένα μακρολίδια από ένα στέλεχος του υποχρεωτικά θαλάσσιου ακτινοβακτηρίου *S. tropica* (Buchanan et al., 2005). Παρόλο που είναι βιολογικά αδρανής, οι χημικές δομές τους είναι αξιόλογες, καθώς 23 από τους 24 άνθρακες τους είναι οξυγονωμένοι ή sp^2 . Η βρυοστατίνη 1 (bryostatatin 1) (**30**) είναι ένα μακρολίδιο, το οποίο ενώ αρχικά είχε απομονωθεί από το βρυόζωο *Bugula neritina*, διαπιστώθηκε ότι παράγεται από στέλεχος του ενδοσυμβιωτικού γ -πρωτεοβακτηρίου *Candidatus Endobugula sertula* (Sudek et al., 2007). Έχει επιδείξει αντικαρκινική δράση, η οποία οφείλεται στη ρυθμιστική της ικανότητα επί της πρωτεϊνικής κινάσης C και έχει αξιολογηθεί σε κλινικές μελέτες μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα.

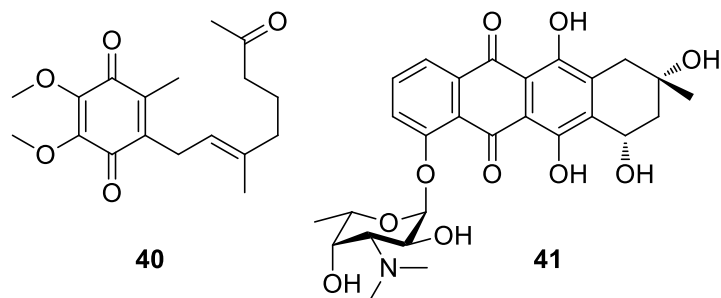


Συστατικά τερπενικής δομής απαντώνται συχνά σε βακτήρια που απομονώνονται από θαλάσσιους βιότοπους. Η 15-υδροξυ-Τ-μουουρολόλη (15-hydroxy-T-muurolol) (**31**), ένα σεσκιτερπένιο με σκελετό αμορφανίου, απομονώθηκε από στέλεχος του γένους *Streptomyces* και έδειξε αντικαρκινική δράση σε 37 ανθρώπινες καρκινικές σειρές (Ding et al., 2009a). Από ένα στέλεχος *Actinobacterium* sp., το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα, ταυτοποιήθηκε το αντιβακτηριακό και κυτταροστατικό διτερπένιο **32** (Saha et al., 2006). Από στέλεχος του *Streptomyces cinnabarinus* απομονώθηκε το διτερπένιο λομποκομπακτόλη (lobocompactol) (**33**), το οποίο έδειξε αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι του χλωροφύκου *Ulva pertusa* και του διατόμου *Navicula annexa* (Cho et al., 2012b). Η παραγωγή του

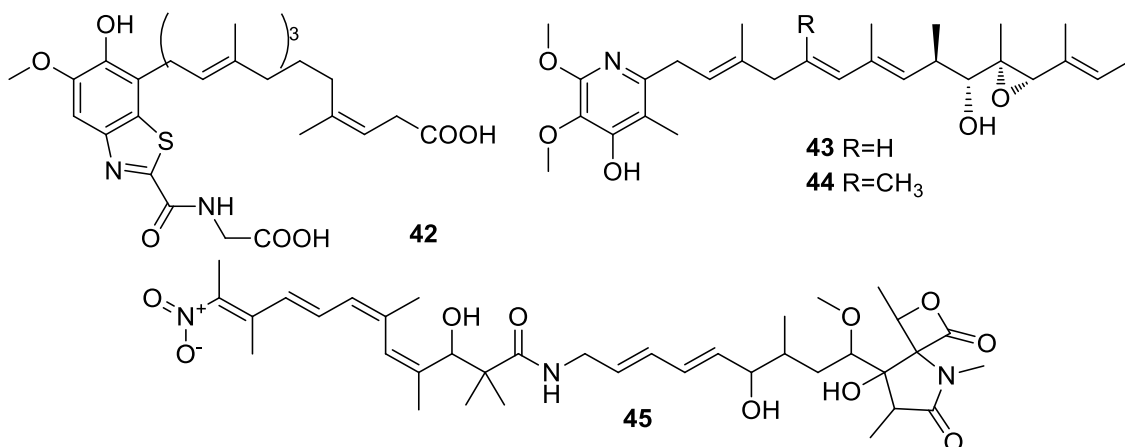
βιοδραστικού προϊόντος αυξήθηκε με τη συγκαλλιέργεια του με στέλεχος του γένους *Alteromonas*. Ένα στέλεχος του *Saprospira grandis* παράγει τα διτερπένια τύπου νεοβερουκοσανίου (neoverrucosane) **34-37** (Spyere et al., 2003). Τα διτερπένια με σκελετό χαλιμανίου μικρομονοχαλιμάνια (micromonohalimanes) A (**38**) και B (**39**) απομονώθηκαν από στέλεχος του γένους *Micromonospora* που καλλιεργήθηκε από το ασκίδιο *Symplegma brakenhielmi* (Zhang et al., 2016). Το μικρομονοχαλιμάνιο B έχει επιδείξει μέτρια βακτηριοστατική δράση έναντι στελέχους *S. aureus* ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA).



Τα προϊόντα μικτής βιοσύνθεσης, όπως είναι τα μεροτερπένια απαντώνται πολύ συχνά στους μεταβολίτες από θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Η ψευδοαλτερομόνη A (pseudoalteromone A) (**40**) είναι ένα μερο-νορ-μονοτερπένιο, παράγωγο ουμπικινόνης, με κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς MOLT-4, από στέλεχος του *Pseudoalteromonas* sp. που απομονώθηκε από το κοράλλι *Lobophytum crassum* (Chen et al., 2012b). Η κομοδοκινόνη A (komodoquinone A) (**41**), μία μοναδική ανθρακυκλίνη με ένα καινούριο αμινοσάκχαρο συνδεδεμένο στον δακτύλιο D, απομονώθηκε από το στέλεχος *Streptomyces* sp. KS3 από θαλάσσιο ιζημα και δρα προάγοντας τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων Neuro 2A (Itoh et al., 2003a; Itoh et al., 2003b).

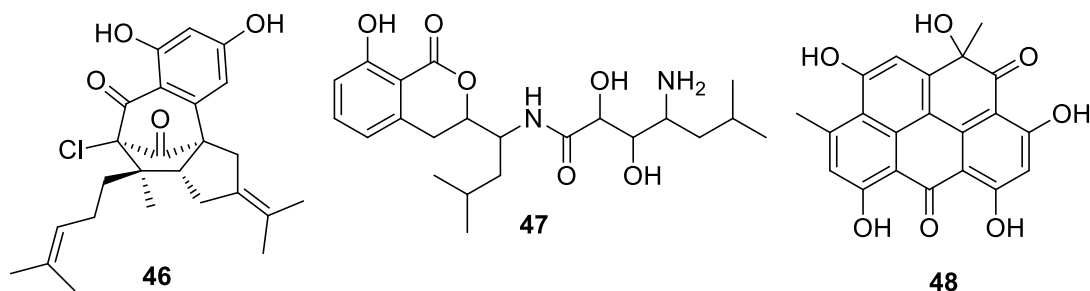


Η ερυθραζόλη Β (erythrazole Β) (**42**), ένα βενζοθειαζολικό μεροδιτερπένιο από στέλεχος του γένους *Erythrobacter*, έχει εμφανίσει κυτταροτοξική δράση στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Hu & MacMillan, 2011). Ένα στέλεχος *Streptomyces* sp. που απομονώθηκε από μη ταυτοποιημένο ασκίδιο παρήγαγε τις κυτταροτοξικές (έναντι διάφορων μη ανθρώπινων καρκινικών σειρών) περισιδίνες (rieigicidins) C₇ (**43**) και C₈ (**44**) (Hayakawa et al., 2007a; Hayakawa et al., 2007b). Η λαχογιαμυκίνη (lajollamycin) (**45**), με σκελετό σπιρο-β-λακτόνης-γ-λακτάμης και τελική νιτροομάδα, η οποία έχει παρουσιάσει αντιβακτηριακή δράση έναντι διάφορων ανθεκτικών και ευαίσθητων στα αντιβιοτικά βακτηριακών στελεχών και κυτταροστατική δράση έναντι της καρκινικής σειράς B16-F10 (μελάνωμα), απομονώθηκε από στέλεχος του *Streptomyces nodosus* που βρέθηκε σε θαλάσσιο ίζημα (Manam et al., 2005).

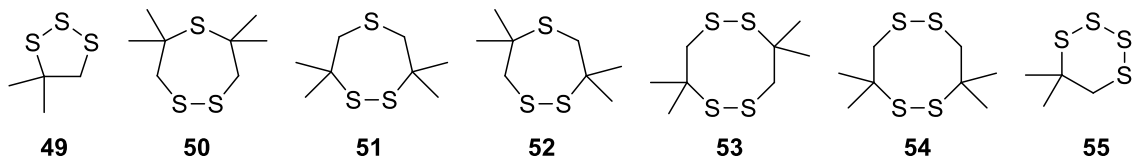


Στέλεχος του γένους *Streptomyces* που απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα παρήγαγε τη μεροχλωρίνη Α (merochlorine Α) (**46**) (Kaysser et al., 2012), στην οποία η απόλυτη στερεοχημεία αποδόθηκε πρόσφατα με την ολική της σύνθεση (Brandstatter et al., 2019). Το παράγωγο ισοκουμαρίνης PM-94128 (**47**) από στέλεχος του γένους *Bacillus* έχει επιδείξει ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι διάφορων καρκινικών σειρών (Cañedo et al., 1997). Από στέλεχος του *Streptomyces chibaensis* απομονώθηκε η 1-υδροξυ-1-νορρεστομυκίνη (1-

hydroxy-1-norrestomycin) (**48**) με κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών σειρών HMO2 (γαστρικό αδενοκαρκίνωμα) και HePG2 (ηπατικό καρκίνωμα) (Gorajana et al., 2005).



Επιπλέον, απαντώνται και θειούχες ενώσεις, όπως τα θειακυκλοαλκάνια **49-55** που απομονώθηκαν από στελέχη του γένους *Cytophaga* (Sobik et al., 2007).



1.5. Σκοπός της μελέτης

Όπως είναι γνωστό μεγάλος αριθμός μεταβολιτών με σημαντικές βιολογικές δράσεις έχει απομονωθεί μέχρι στιγμής από βακτήρια. Ωστόσο, τα βακτήρια που βρίσκονται στη θάλασσα είναι συχνά πηγές ενδιαφερόντων και πρωτότυπων χημικών δομών, οι οποίες διαφέρουν από αυτές των χερσαίων μικροοργανισμών.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση νέων φυσικών προϊόντων με βιολογική δράση ή κάποια άλλη αξιολογή εφαρμογή. Σε αυτή την κατεύθυνση μελετήθηκαν εκχυλίσματα από βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από θαλάσσια ιζήματα που συλλέχθηκαν στο Αιγαίο και Ιόνιο Πέλαγος.

Το βασικό κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων στελεχών που μελετήθηκαν ήταν το ενδιαφέρον χημικό προφίλ τους κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο των οργανικών εκχυλισμάτων τους σε μικρή κλίμακα με φασματοσκοπία ^1H NMR, καθώς και με υγρή χρωματογραφία (HPLC-PDA και LC-MS).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφους Bruker AC 200, Bruker DRX 400, Bruker Avance NEO 700, Bruker Avance NEO 950 και Varian 600. Τα 2D-NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες ακολουθίες παλμών Bruker και Varian. Για τη λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δευτεριωμένοι διαλύτες: CDCl_3 , CD_3OD , C_6D_6 και $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. Οι ^1H και ^{13}C NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά i) την κορυφή του CHCl_3 στα 7.24 και 77.0 ppm, αντίστοιχα, ii) την κορυφή της MeOH στα 3.31 και 49.0 ppm, αντίστοιχα, iii) την κορυφή του C_6H_6 στα 7.16 και 128.0 ppm, αντίστοιχα, και iv) την κορυφή του DMSO στα 2.50 και 39.5 ppm, αντίστοιχα, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα μάζας χαμηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 ή σε φασματογράφο μάζας Thermo Electron Corporation DSQ με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS) ή σε φασματογράφο μάζας Thermo Electron Corporation DSQ με μέθοδο ιονισμού τον χημικό ιονισμό χρησιμοποιώντας CH_4 ως το αέριο ιονισμού (CIMS) ή σε φασματογράφο μάζας Thermo Scientific LCQ Fleet με μέθοδο ιονισμού τον ηλεκτροψεκασμό (ESIMS).

Τα φάσματα μάζας υψηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos με μέθοδο ιονισμού τον ηλεκτροψεκασμό (HR-ESIMS).

Τα φάσματα IR καταγράφηκαν σε φασματογράφο Bruker Alpha II με τη τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR).

Τα φάσματα UV καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 40 χρησιμοποιώντας κυψελίδα πάχους 1 cm.

Η ειδική στροφική ικανότητα ($[\alpha]_D$) μετρήθηκε είτε σε πολωσίμετρο Perkin-Elmer model 341 ή σε Krüss model P300, χρησιμοποιώντας κυψελίδα μήκους 1 dm σε θερμοκρασία 20°C.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφους: i) CECIL 1100 Series Liquid Chromatography Pump με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI GBC LC-1240, ii) Waters 600 με διπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI Waters 410, iii) Pharmacia LKB LCC 2248 με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI Shodex 102, iv) Waters 515 με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή Shimadzu RID-20A ή RI

Shodex 102, και ν) Agilent 1100 Series με τετραπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI 1100 Series.

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC ήταν οι ακόλουθες: (i) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Grace, Econoshpere Silica 10u), (ii) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Supelco, Supelcosil LC-Si 5 μm), (iii) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Akzonobel, Kromasil 100-10-SIL), (iv) στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Grace, Econoshpere C18 10u), (v), στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Akzonobel, Kromasil 100-7-C18) και (vi) στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Phenomenex, Luna C18 (2) 100A 10u).

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.

Οι στερεοχημικές διαμορφώσεις δομής ελάχιστης ενέργειας σχεδιάστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα μοριακής μοντελοποίησης HyperChem 8.0.8 (Hypercube, Inc.).

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 (SiOH) ή αντίστροφης (C₁₈) φάσης 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 (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 15% 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. Ο διαλύτης CHCl_3 ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Οι διαλύτες Me_2CO και MeCN 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. Το H_2O που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποσταγμένο που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν CDCl_3 , CD_3OD , C_6D_6 και $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ χωρίς εσωτερικό πρότυπο των εταιρειών Deutero GmbH ή Aldrich-Sigma Chemical Company.

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν υδατοδιαλυτό άμυλο πατάτας από την εταιρεία Lach-ner, εκχύλισμα ζύμης από την εταιρεία International Diagnostics Group plc, πεπτόνη σόγιας από την εταιρεία AppliChem, CaCO_3 από την εταιρεία Penta, KBr από την εταιρεία Merck, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ από την εταιρεία Acros Organics και ρητίνη Amberlite XAD-7 (20-60 mesh) από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

2.3. Καλλιέργεια των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών και παραλαβή των οργανικών εκχυλισμάτων

Τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν (BI0327, BI0850, BI0918 και BI0980) προέρχονται από τη συλλογή μικροοργανισμών θαλάσσιας προέλευσης του εργαστηρίου. Συγκεκριμένα:

- ✓ το στέλεχος BI0327, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Bacillus endophyticus*, απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε ανατολικά της περιοχής Θειωρυχείο στη Μήλο σε βάθος 4 m τον Ιούλιο του 2012,
- ✓ το στέλεχος BI0850, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Streptomyces althioticus*, απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε στη περιοχή του Αργοστολίου στη Κεφαλονιά σε βάθος 3 m τον Απρίλιο του 2014,
- ✓ το στέλεχος BI0918, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Streptomyces smyrnaeus*, απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε νοτίως της Βάτσας στη Κεφαλονιά σε βάθος 75 m τον Μάιο του 2014, και
- ✓ το στέλεχος BI0980, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Bacillus subtilis*, απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε μεταξύ της Κέρκυρας και της Ερεϊκούσας σε βάθος 18 m τον Αύγουστο του 2014.

Για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών τους, τα βακτηριακά στελέχη υποβλήθηκαν σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα A1BFe+C (Bugni et al., 2006) (Πίν. 4).

Πίνακας 4. Σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος A1BFe+C που χρησιμοποιήθηκε για την υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών.

Σύσταση (g ανά 1 L αποστειρωμένου θαλασσινού νερού)	
Άμυλο	10
Εκχύλισμα ζύμης	4
Πεπτόνη	2
CaCO ₃	1
KBr	0.1
Fe ₂ (SO ₄) ₃ 5H ₂ O	0.04

Για το στέλεχος BI0327 (Εικ. 8) πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια συνολικού όγκου 12 L (σε 8 κωνικές φιάλες όγκου 3 L, οι οποίες περιείχαν 1.5 L θρεπτικό μέσο η κάθε μία). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 27 °C για 14 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα (120 rpm).



Εικόνα 8. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Bacillus endorhizicus* BI0327 σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα A1BFe+C.

Για το στέλεχος BI0850 (Εικ. 9) πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια συνολικού όγκου 10 L (σε 25 κωνικές φιάλες όγκου 1 L, οι οποίες περιείχαν 0.4 L θρεπτικό μέσο η κάθε μία). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 24 °C για 9 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα (120 rpm).



Εικόνα 9. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Streptomyces althioticus* BI0850 σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα A1BFe+C.

Για το στέλεχος BI0918 (Εικ. 10) πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια συνολικού όγκου 19.6 L (σε 49 κωνικές φιάλες όγκου 1 L, οι οποίες περιείχαν 0.4 L θρεπτικό μέσο η κάθε μία). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 24 °C για 8 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα (125 rpm).

Για το ίδιο στέλεχος πραγματοποιήθηκε εκ νέου καλλιέργεια συνολικού όγκου 10 L (σε 20 κωνικές φιάλες όγκου 1 L, οι οποίες περιείχαν 0.5 L θρεπτικό μέσο η κάθε μία). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 24 °C για 9 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα (125 rpm).



Εικόνα 10. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Streptomyces smyrnaeus* BI0918 σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα A1BFe+C.

Για το στέλεχος BI0980 (Εικ. 11) πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια συνολικού όγκου 10 L (σε 20 κωνικές φιάλες όγκου 1 L, οι οποίες περιείχαν 0.5 L θρεπτικό μέσο η κάθε μία). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 24 °C για 9 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα (125 rpm).



Εικόνα 11. Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *Bacillus subtilis* BI0980 σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα A1BFe+C.

Σε κάθε περίπτωση, μετά την ολοκλήρωση της περιόδου επώασης, προστέθηκε σε κάθε κωνική φιάλη κατάλληλη ποσότητα ρητίνης XAD-7 (20 g/L) και η ανάδευση συνεχίστηκε για επιπλέον 12 h. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και το ίζημα που προέκυψε εκχυλίστηκε εξαντλητικά με Me_2CO . Ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα που

προέκυψε εκχυλίστηκε με H₂O και EtOAc. Ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων σε διαχωριστική χοάνη, οπότε και συλλέχθηκε η οργανική στοιβάδα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Στη συνέχεια τα αντίστοιχα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν υπό κενό, οπότε και παραλήφθηκαν τα αρχικά υπολείμματα των βακτηριακών στελεχών.

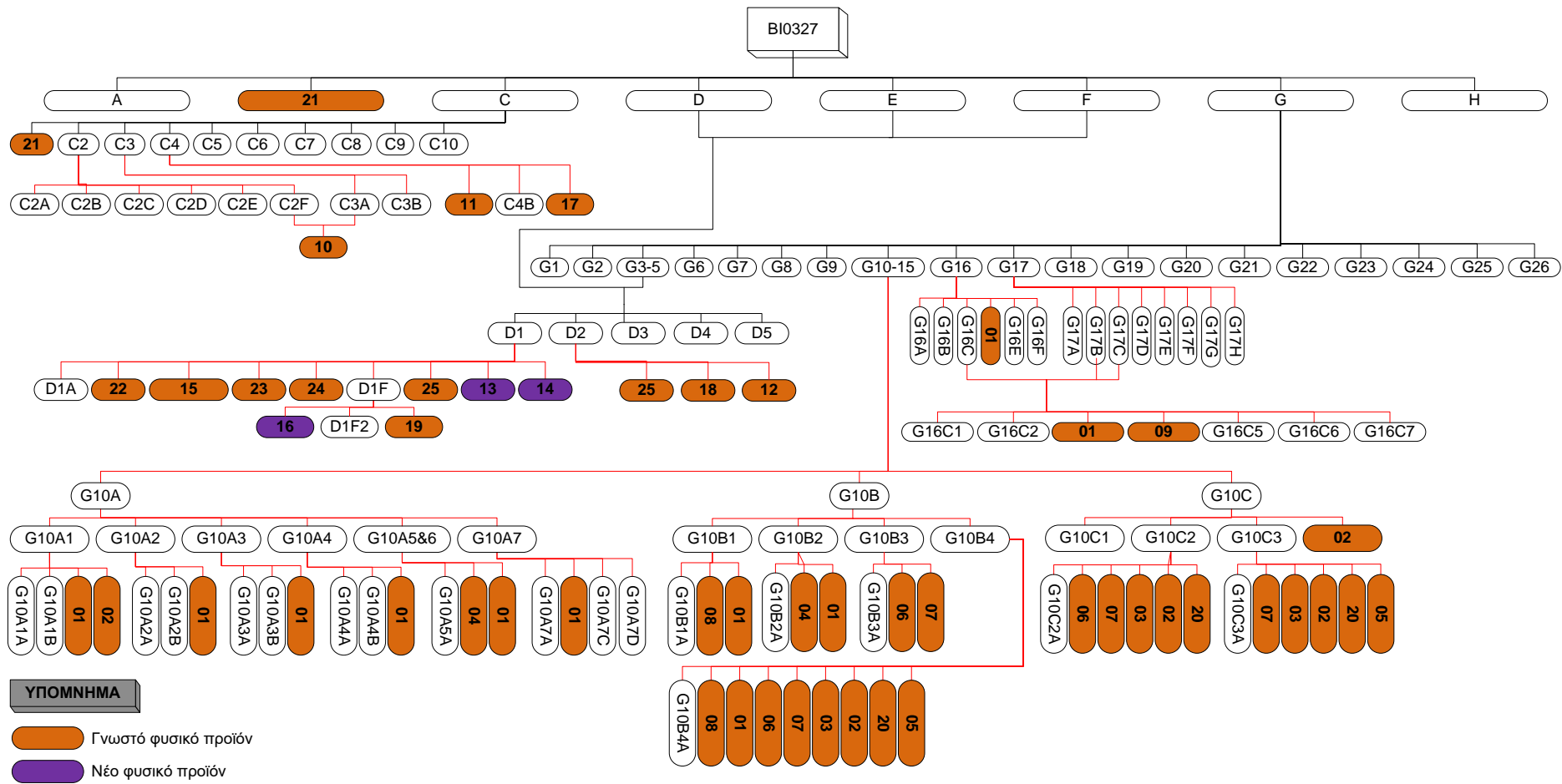
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το βακτηριακό στέλεχος BI0327

Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του βακτηριακού στελέχους BI0327 παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 12, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.

Το αρχικό υπόλειμμα BI0327, σκούρου καφέ χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 2.223 g, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 300 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 8 υπολείμματα, τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327B ήταν καθαρή ουσία (BI0327-21) (Πίν. 5).

Πίνακας 5. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
BI0327A	cHex (100%)	20.9
BI0327B	cHex/EtOAc (80:20)	21.0
BI0327C	cHex/EtOAc (60:40)	43.1
BI0327D	cHex/EtOAc (40:60)	21.1
BI0327E	cHex/EtOAc (20:80)	20.0
BI0327F	EtOAc (100%)	8.0
BI0327G	EtOAc/MeOH (50:50)	1094
BI0327H	MeOH (100%)	490



Εικόνα 12. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος BI0327.

Το υπόλειμμα BI0327C (43.1 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 34 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 6) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 10 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327C1 ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-21**) (Πίν. 7).

Πίνακας 6. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-8	cHex (100%)
9-17	cHex/EtOAc (95:5)
18-25	cHex/EtOAc (90:10)
26-29	cHex/EtOAc (80:20)
30-33	cHex/EtOAc (50:50)
34	MeOH (100%)

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

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-8	BI0327C1	4.0
9-10	BI0327C2	14.1
11	BI0327C3	1.6
12-13	BI0327C4	2.6
14-15	BI0327C5	1.6
16-18	BI0327C6	7.0
19-20	BI0327C7	6.5
21-25	BI0327C8	2.5
26-29	BI0327C9	1.2
30-34	BI0327C10	0.5

Το υπόλειμμα BI0327C2 (14.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 8).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (95:5)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327C2A	4.3	6.20-9.80
BI0327C2B	0.5	10.12
BI0327C2C	0.8	10.54
BI0327C2D	1.0	11.13
BI0327C2E	1.1	13.00
BI0327C2F	2.4	18.34

Το υπόλειμμα BI0327C3 (1.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 9).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (85:15)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327C3A	0.6	8.50
BI0327C3B	0.7	9.50

Τα υπολείμματα BI0327C2F και BI0327C3A (3.0 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-10**) (Πίν. 10).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	nHex/EtOAc (94:6)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327C2F1	2.3	29.81

Το υπόλειμμα BI0327C4 (2.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327C4A και BI0327C4C ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-11** και **BI0327-17**, αντίστοιχα) (Πίν. 11).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (85:15)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327C4A	0.6	14.29
BI0327C4B	0.7	16.04
BI0327C4C	0.5	16.89

Το υπόλειμμα BI0327G (1094 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα EtOAc/MeOH βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 160 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 12) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 26 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 13).

Πίνακας 12. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-25	EtOAc (100%)
26-40	EtOAc/MeOH (99:1)
41-55	EtOAc/MeOH (98:2)
56-65	EtOAc/MeOH (97:3)
66-80	EtOAc/MeOH (95:5)
81-105	EtOAc/MeOH (90:10)
106-120	EtOAc/MeOH (85:15)
121-135	EtOAc/MeOH (80:20)
136-140	EtOAc/MeOH (75:25)
141-145	EtOAc/MeOH (70:30)
146-155	EtOAc/MeOH (50:50)
156-160	MeOH (100%)

Πίνακας 13. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-5	BI0327G1	1.6
6-8	BI0327G2	1.1
9-17	BI0327G3-5	8.3
18-26	BI0327G6	2.8
27-29	BI0327G7	1.0
30-38	BI0327G8	3.7
39-47	BI0327G9	16.3
48-83	BI0327G10-15	110.0
84-89	BI0327G16	29.7
90-92	BI0327G17	26.3
93-98	BI0327G18	34.1
99-107	BI0327G19	42.8
108-122	BI0327G20	91.5
123-131	BI0327G21	40.3
132-143	BI0327G22	91.7
144-146	BI0327G23	34.4
147-155	BI0327G24	68.0
156-159	BI0327G25	305.4
160	BI0327G26	78.9

Τα υπολείμματα BI0327D, BI0327E, BI0327F και BI0327G3-5 (57.4 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 5 mL. Παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 14) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 5 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 15).

Πίνακας 14. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	cHex/EtOAc (70:30)
2	cHex/EtOAc (60:40)
3	cHex/EtOAc (50:50)
4	cHex/EtOAc (25:75)
5	EtOAc (100%)
6	MeOH (100%)

Πίνακας 15. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BI0327D1	28.4
2	BI0327D2	12.9
3	BI0327D3	5.7
4-5	BI0327D4	5.0
6	BI0327D5	5.4

Το υπόλειμμα BI0327D1 (28.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 9 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327D1B, BI0327D1C, BI0327D1D, BI0327D1E, BI0327D1G, BI0327D1H και BI0327D1I ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-22**, **BI0327-15**, **BI0327-23**, **BI0327-24**, **BI0327-25**, **BI0327-13** και **BI0327-14**, αντίστοιχα) (Πίν. 16).

Πίνακας 16. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327D1A	9.4	6.40-8.80
BI0327D1B	1.3	9.30
BI0327D1C	3.6	9.69
BI0327D1D	2.3	10.26
BI0327D1E	1.1	11.18
BI0327D1F	1.8	12.31
BI0327D1G	1.0	13.40
BI0327D1H	2.0	15.19
BI0327D1I	1.2	16.80

Το υπόλειμμα BI0327D1F (1.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327D1F1 και BI0327D1F3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-16** και **BI0327-19**, αντίστοιχα) (Πίν. 17).

Πίνακας 17. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327D1F1	0.8	10.58
BI0327D1F2	0.2	11.61
BI0327D1F3	0.8	13.49

Το υπόλειμμα BI0327D2 (12.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327D2A, BI0327D2B και BI0327D2C ήταν καθαρές ουσίες (BI0327-25, BI0327-18 και BI0327-12, αντίστοιχα) (Πίν. 18).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327D2A	1.0	13.60
BI0327D2B	1.5	23.43
BI0327D2C	1.9	31.92

Το υπόλειμμα BI0327G10-15 (110.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 19).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (70:30)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A	37.0	6.07-9.28
BI0327G10B	30.5	9.68
BI0327G10C	18.1	10.38-10.85

Το υπόλειμμα BI0327G10A (37.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 20).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A1	8.9	6.06-8.69
BI0327G10A2	3.5	9.61
BI0327G10A3	4.9	11.08
BI0327G10A4	4.2	13.52
BI0327G10A5	5.0	15.19
BI0327G10A6	1.7	15.64-16.54
BI0327G10A7	3.2	17.62

Το υπόλειμμα BI0327G10A1 (8.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10A1C και BI0327G10A1D ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-01** και **BI0327-02**, αντίστοιχα) (Πίν. 21).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A1A	5.1	5.89-9.76
BI0327G10A1B	0.4	9.96
BI0327G10A1C	0.3	10.85
BI0327G10A1D	0.4	15.71

Το υπόλειμμα BI0327G10A2 (3.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327G10A2C ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-01**) (Πίν. 22).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A2A	2.4	5.91-9.70
BI0327G10A2B	0.8	9.99
BI0327G10A2C	0.3	10.86

Το υπόλειμμα BI0327G10A3 (4.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327G10A3C ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-01**) (Πίν. 23).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A3A	2.1	5.92-9.71
BI0327G10A3B	1.2	10.06
BI0327G10A3C	0.3	10.86

Το υπόλειμμα BI0327G10A4 (4.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327G10A4C ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-01**) (Πίν. 24).

Πίνακας 24. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A4A	0.8	7.59-9.59
BI0327G10A4B	2.6	10.14
BI0327G10A4C	0.6	10.89

Τα υπολείμματα BI0327G10A5 και BI0327G10A6 (6.7 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10A5B και BI0327G10A5C ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-04** και **BI0327-01**, αντίστοιχα) (Πίν. 25).

Πίνακας 25. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A5A	0.4	7.61-9.96
BI0327G10A5B	4.0	10.50
BI0327G10A5C	1.1	11.52

Το υπόλειμμα BI0327G10A7 (3.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327G10A7B ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-01**) (Πίν. 26).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10A7A	0.4	7.61-9.80
BI0327G10A7B	1.8	11.38
BI0327G10A7C	0.3	12.65
BI0327G10A7D	0.7	13.29

Το υπόλειμμα BI0327G10B (30.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά

με ¹H NMR (Πίν. 27).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10B1	6.1	8.63
BI0327G10B2	6.4	9.35
BI0327G10B3	3.7	10.09
BI0327G10B4	14.3	-

Το υπόλειμμα BI0327G10B1 (6.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10B1B και BI0327G10B1C ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-08** και **BI0327-01**, αντίστοιχα) (Πίν. 28).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10B1A	2.1	9.09
BI0327G10B1B	2.6	10.20
BI0327G10B1C	1.4	11.01

Το υπόλειμμα BI0327G10B2 (6.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10B2B και BI0327G10B2C ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-04** και **BI0327-01**, αντίστοιχα) (Πίν. 29).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10B2A	0.4	9.05
BI0327G10B2B	4.3	10.26
BI0327G10B2C	1.0	11.06

Το υπόλειμμα BI0327G10B3 (3.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10B3B και BI0327G10B3C ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-06** και **BI0327-07**, αντίστοιχα) (Πίν. 30).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10B3A	2.5	5.87-11.76
BI0327G10B3B	0.2	12.45
BI0327G10B3C	1.0	13.05

Το υπόλειμμα BI0327G10B4 (14.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 9 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10B4B, BI0327G10B4C, BI0327G10B4D, BI0327G10B4E, BI0327G10B4F, BI0327G10B4G, BI0327G10B4H και BI0327G10B4I ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-08**, **BI0327-01**, **BI0327-06**, **BI0327-07**, **BI0327-03**, **BI0327-02**, **BI0327-20** και **BI0327-05**, αντίστοιχα) (Πίν. 31).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10B4A	1.8	9.12
BI0327G10B4B	1.6	10.08
BI0327G10B4C	1.5	11.01
BI0327G10B4D	0.7	12.43
BI0327G10B4E	2.7	13.08
BI0327G10B4F	2.5	14.37

BI0327G10B4G	1.5	16.00
BI0327G10B4H	1.2	16.53
BI0327G10B4I	0.8	17.54

Το υπόλειμμα BI0327G10C (18.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327G10C4 ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-02**) (Πίν. 32).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10C1	0.8	5.95-8.52
BI0327G10C2	7.6	15.79
BI0327G10C3	7.8	16.21-18.47
BI0327G10C4	2.7	18.48-20.50

Το υπόλειμμα BI0327G10C2 (7.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10C2B, BI0327G10C2C, BI0327G10C2D, BI0327G10C2E και BI0327G10C2F ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-06**, **BI0327-07**, **BI0327-03**, **BI0327-02** και **BI0327-20**, αντίστοιχα) (Πίν. 33).

Πίνακας 33. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10C2A	0.9	9.14
BI0327G10C2B	1.4	12.42
BI0327G10C2C	2.9	13.09
BI0327G10C2D	1.1	14.33
BI0327G10C2E	0.7	15.90
BI0327G10C2F	0.6	16.40

Το υπόλειμμα BI0327G10C3 (7.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G10C3B, BI0327G10C3C, BI0327G10C3D, BI0327G10C3E και BI0327G10C3F ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-07**, **BI0327-03**, **BI0327-02**, **BI0327-20** και **BI0327-05**, αντίστοιχα) (Πίν. 34).

Πίνακας 34. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-7-C18 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G10C3A	0.7	9.14
BI0327G10C3B	1.4	13.13
BI0327G10C3C	1.6	14.28
BI0327G10C3D	1.1	15.88
BI0327G10C3E	1.9	16.43
BI0327G10C3F	1.1	17.39

Το υπόλειμμα BI0327G16 (29.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0327G16D ήταν καθαρή ουσία (**BI0327-01**) (Πίν. 35).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G16A	1.9	8.46
BI0327G16B	2.0	9.93
BI0327G16C	3.4	11.43
BI0327G16D	5.1	12.71
BI0327G16E	2.0	16.61
BI0327G16F	5.5	32.26

Το υπόλειμμα BI0327G17 (26.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά

με ^1H NMR (Πίν. 36).

Πίνακας 36. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G17A	2.4	9.3
BI0327G17B	2.8	10.7-11.5
BI0327G17C	2.0	12.5
BI0327G17D	0.6	11.3-15.0
BI0327G17E	1.0	15.0-17.5
BI0327G17F	0.8	18.1
BI0327G17G	0.4	18.9
BI0327G17H	2.4	42.4

Τα υπολείμματα BI0327G16C, BI0327G17B και BI0327G17C (8.2 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0327G16C3 και BI0327G16C4 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0327-01** και **BI0327-09**, αντίστοιχα) (Πίν. 37).

Πίνακας 37. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (20:80)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0327G16C1	0.7	15.3
BI0327G16C2	0.6	26.9
BI0327G16C3	1.0	27.9
BI0327G16C4	2.7	29.9
BI0327G16C5	1.4	34.6
BI0327G16C6	0.9	42.0
BI0327G16C7	0.9	46.0

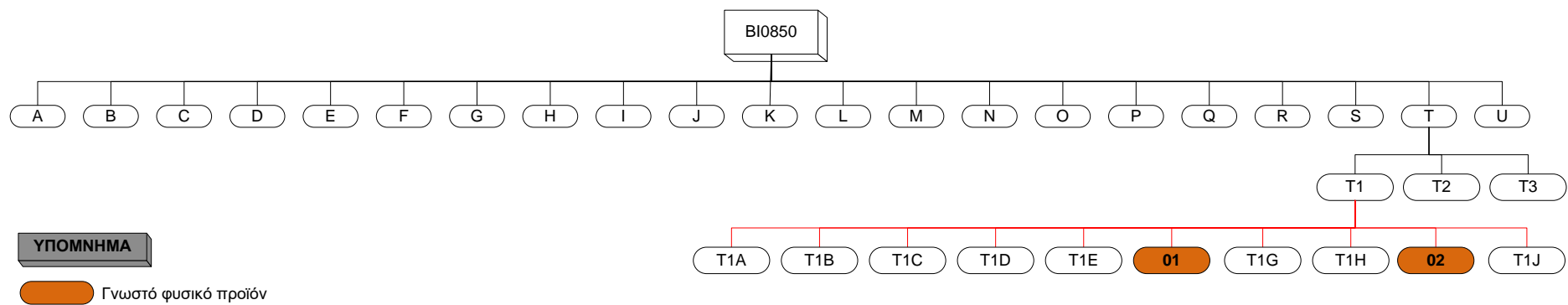
2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος BI0850

Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του βακτηριακού στελέχους BI0850 παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 13, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.

Το αρχικό υπόλειμμα BI0850, σκούρου καφέ χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 1.762 g, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex/EtOAc και στη συνέχεια EtOAc/MeOH βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 121 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 38) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 21 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 39).

Πίνακας 38. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-19	cHex (100%)
20-29	cHex/EtOAc (98:2)
30-41	cHex/EtOAc (95:5)
42-58	cHex/EtOAc (92:8)
59-64	cHex/EtOAc (90:10)
65-70	cHex/EtOAc (85:15)
71-81	cHex/EtOAc (80:20)
82-90	cHex/EtOAc (70:30)
91-102	cHex/EtOAc (50:50)
103-107	cHex/EtOAc (25:75)
108-115	EtOAc (100%)
116-118	EtOAc/MeOH (95:5)
119-120	EtOAc/MeOH (90:10)
121	EtOAc/MeOH (50:50)



Εικόνα 13. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος BI0850.

Πίνακας 39. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-19	BI0850A	35.5
20-41	BI0850B	3.7
42-44	BI0850C	40.5
45-47	BI0850D	1.8
48-50	BI0850E	4.1
51-53	BI0850F	2.6
54-58	BI0850G	34.2
59-71	BI0850H	404.6
72-74	BI0850I	169.6
75-77	BI0850J	127.8
78-80	BI0850K	69.0
81-86	BI0850L	79.3
87-92	BI0850M	40.9
93-98	BI0850N	21.6
99-101	BI0850O	4.5
102-104	BI0850P	8.5
105-110	BI0850Q	338.3
111-118	BI0850R	14.2
119	BI0850S	6.4
120	BI0850T	42.5
121	BI0850U	141.0

Το υπόλειμμα BI0850T (42.5 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 6 mL. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 40) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 3 υπολείμματα (Πίν. 41).

Πίνακας 40. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	MeOH/H ₂ O (50:50)
2	MeOH/H ₂ O (70:30)
3	MeOH/H ₂ O (90:10)
4	MeOH (100%)

Πίνακας 41. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BI0850T1	30.0
2-3	BI0850T2	8.6
4	BI0850T3	3.9

Το υπόλειμμα BI0850T1 (30.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 10 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0850T1F και BI0850T1I ήταν καθαρές ουσίες (**BI0850-01** και **BI0850-02**, αντίστοιχα) (Πίν. 42).

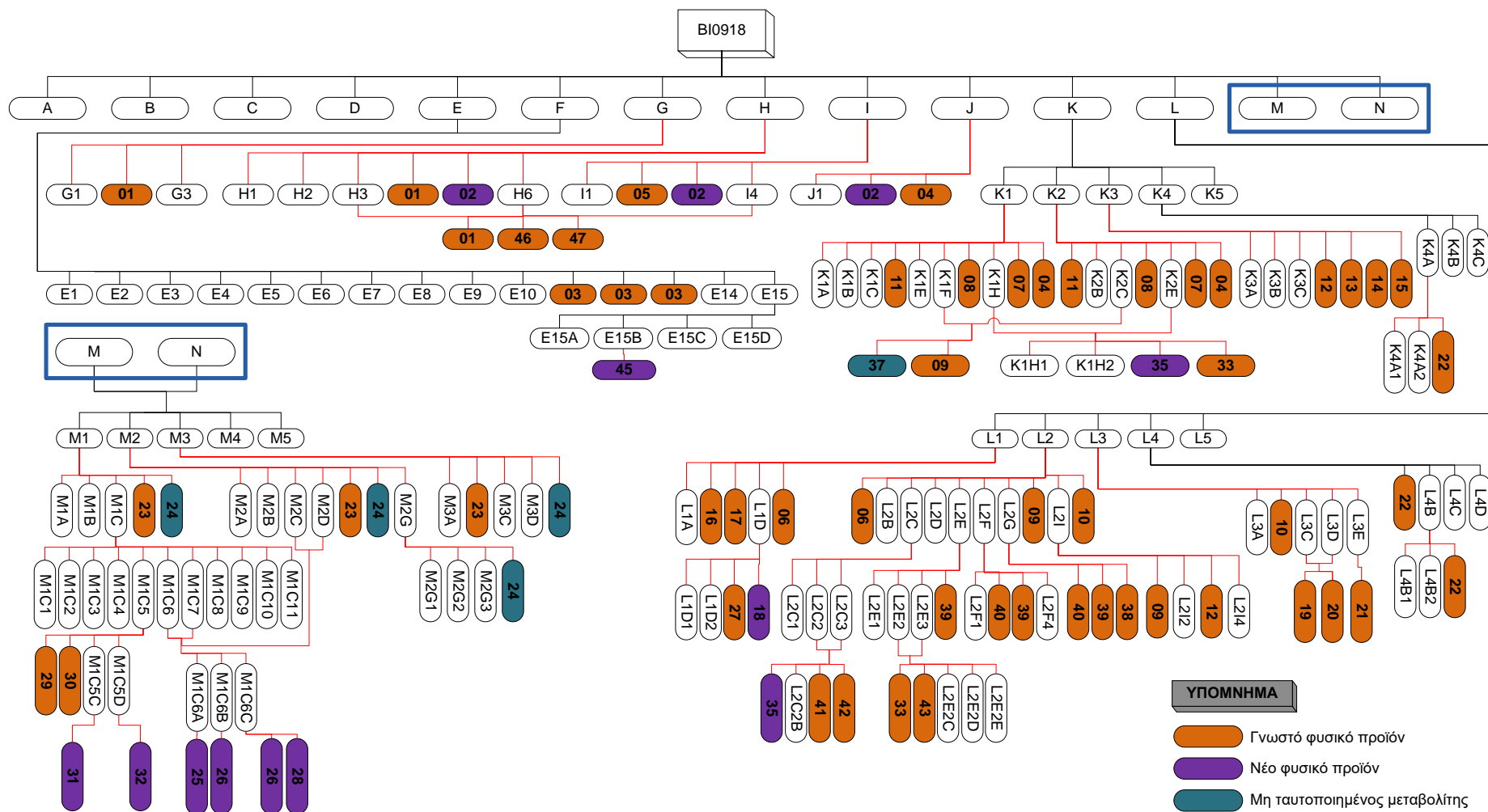
Πίνακας 42. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

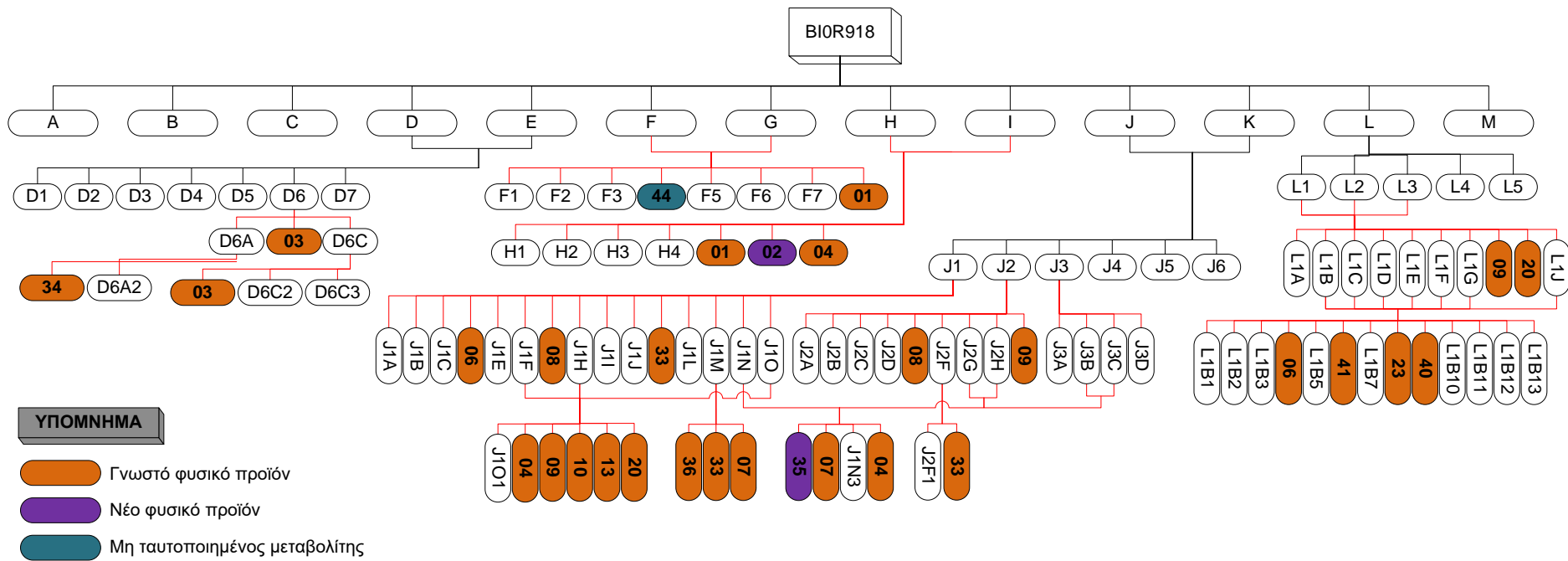
Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0850T1A	0.5	15.03
BI0850T1B	0.5	15.86
BI0850T1C	0.8	16.49
BI0850T1D	0.8	17.53
BI0850T1E	0.7	18.87
BI0850T1F	8.0	19.34
BI0850T1G	0.8	20.93-21.61
BI0850T1H	1.2	23.18-23.80
BI0850T1I	3.1	25.46
BI0850T1J	1.0	26.85

2.6. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος BI0918

Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από τα δύο αρχικά εκχυλίσματα του βακτηριακού στελέχους BI0918 παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 14 για το υπόλειμμα BI0918 και στην Εικόνα 15 για το υπόλειμμα BI0R918, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια τους.



Εικόνα 14. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος BI0918.



Εικόνα 15. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος BI0R918.

Το αρχικό υπόλειμμα BI0918, σκούρου κόκκινου χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 2.165 g, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 200 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 16 κλάσματα, τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 43). Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 14 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 44).

Πίνακας 43. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	cHex (100%)
2	cHex/EtOAc (90:10)
3	cHex/EtOAc (80:20)
4	cHex/EtOAc (70:30)
5	cHex/EtOAc (60:40)
6	cHex/EtOAc (50:50)
7	cHex/EtOAc (40:60)
8	cHex/EtOAc (30:70)
9	cHex/EtOAc (20:80)
10	cHex/EtOAc (10:90)
11	EtOAc (100%)
12	EtOAc/MeOH (95:5)
13	EtOAc/MeOH (90:10)
14	EtOAc/MeOH (75:25)
15	MeOH (100%)
16	MeOH/H ₂ O (99.75:0.25)

Πίνακας 44. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-2	BI0918A	17.1
3	BI0918B	192.8
4	BI0918C	565.6
5	BI0918D	208.8
6	BI0918E	149.2
7	BI0918F	147.5
8	BI0918G	45.8
9	BI0918H	52.0
10	BI0918I	10.5
11-12	BI0918J	59.8
13	BI0918K	114.7

14	BI0918L	113.5
15	BI0918M	464.0
16	BI0918N	23.0

Τα υπολείμματα BI0918E και BI0918F (296.7 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc και στη συνέχεια EtOAc/MeOH βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 114 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 45) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 15 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918E11, BI0918E12 και BI0918E13 ήταν η ίδια καθαρή ουσία (**BI0918-03**) (Πίν. 46).

Πίνακας 45. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-21	cHex/EtOAc (80:20)
22-26	cHex/EtOAc (78:22)
27-35	cHex/EtOAc (75:25)
36-40	cHex/EtOAc (72:28)
41-54	cHex/EtOAc (70:30)
55-59	cHex/EtOAc (65:35)
60-69	cHex/EtOAc (60:40)
70-83	cHex/EtOAc (50:50)
84-93	cHex/EtOAc (40:60)
94-102	cHex/EtOAc (30:70)
103-107	cHex/EtOAc (20:80)
108-109	EtOAc (100%)
110	EtOAc/MeOH (95:5)
111	EtOAc/MeOH (90:10)
112	EtOAc/MeOH (75:25)
113	EtOAc/MeOH (50:50)
114	MeOH (100%)

Πίνακας 46. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-9	BI0918E1	2.1
10-20	BI0918E2	1.4
21-29	BI0918E3	18.2
30-32	BI0918E4	6.1
33-35	BI0918E5	5.1
36-41	BI0918E6	5.2

42-56	BI0918E7	7.5
57-65	BI0918E8	4.9
66-71	BI0918E9	10.1
72-74	BI0918E10	5.2
75-77	BI0918E11	20.4
78-91	BI0918E12	119.4
92-109	BI0918E13	23.4
110-111	BI0918E14	6.5
112-114	BI0918E15	30.3

Το υπόλειμμα BI0918E15 (30.3 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 10 mL. Παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 47) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 4 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 47).

Πίνακας 46. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	H ₂ O (100%)
2	MeOH/H ₂ O (20:80)
3	MeOH/H ₂ O (40:60)
4	MeOH/H ₂ O (60:40)
5	MeOH/H ₂ O (80:20)
6	MeOH (100%)

Πίνακας 47. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BI0918E15A	21.5
2-4	BI0918E15B	2.6
5	BI0918E15C	2.4
6	BI0918E15D	1.3

Το υπόλειμμα BI0918E15B (2.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918E15B1 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-45**) (Πίν. 48).

Πίνακας 48. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918E15B1	1.8	11.3

Το υπόλειμμα BI0918G (45.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918G2 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-01**) (Πίν. 49).

Πίνακας 49. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere Silica 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918G1	8.1	10.5-14.3
BI0918G2	8.0	15.6
BI0918G3	5.0	18.8

Το υπόλειμμα BI0918H (52.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918H4 και BI0918H5 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-01** και **BI0918-02**, αντίστοιχα) (Πίν. 50).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere Silica 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918H1	1.2	7.0
BI0918H2	0.3	14.6-16.3
BI0918H3	0.9	20.8-22.2
BI0918H4	24.1	24.1

BI0918H5	2.0	27.4
BI0918H6	9.2	-

Το υπόλειμμα BI0918I (10.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918I2 και BI0918I3 ήταν καθαρές ουσίες (BI0918-05 και BI0918-02, αντίστοιχα) (Πίν. 51).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (65:35)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918I1	0.7	10.77
BI0918I2	1.0	11.38
BI0918I3	1.5	32.61
BI0918I4	5.4	-

Τα υπολείμματα BI0918H3, BI0918H6 και BI0918I4 (15.5 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα τρία κλάσματα BI0918H3A, BI0918H3B και BI0918H3C ήταν καθαρές ουσίες (BI0918-01, BI0918-46 και BI0918-47, αντίστοιχα) (Πίν. 52).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (65:35)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918H3A	2.4	23.87
BI0918H3B	0.7	12.50
BI0918H3C	0.5	13.20

Το υπόλειμμα BI0918J (59.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918J2 και BI0918J3 ήταν καθαρές ουσίες

(**BI0918-02** και **BI0918-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 53).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (65:35)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918J1	3.3	13.78
BI0918J2	2.0	31.29
BI0918J3	20.2	33.55

Το υπόλειμμα BI0918K (114.7 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 50 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 5 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 54).

Πίνακας 54. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
BI0918K1	MeOH/H ₂ O (20:80)	41.5
BI0918K2	MeOH/H ₂ O (40:60)	28.1
BI0918K3	MeOH/H ₂ O (60:40)	15.4
BI0918K4	MeOH/H ₂ O (80:20)	9.6
BI0918K5	MeOH (100%)	12.4

Το υπόλειμμα BI0918K1 (41.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 10 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918K1D, BI0918K1G, BI0918K1I και BI0918K1J ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-11**, **BI0918-08**, **BI0918-07** και **BI0918-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 55).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλυσης (min)
BI0918K1A	0.8	5.7
BI0918K1B	0.5	8.2
BI0918K1C	0.9	8.9
BI0918K1D	1.8	9.5
BI0918K1E	4.2	10.0-20.3
BI0918K1F	1.2	21.1
BI0918K1G	4.6	25.0
BI0918K1H	8.6	38.7
BI0918K1I	8.0	44.1
BI0918K1J	4.0	48.5

Το υπόλειμμα BI0918K2 (28.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918K2A, BI0918K2D, BI0918K2F και BI0918K2G ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-11**, **BI0918-08**, **BI0918-07** και **BI0918-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 56).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλυσης	MeOH/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλυσης (min)
BI0918K2A	0.5	9.4
BI0918K2B	4.0	10.0-19.
BI0918K2C	0.4	20.3
BI0918K2D	2.4	24.4
BI0918K2E	4.5	36.3
BI0918K2F	5.5	41.8
BI0918K2G	3.3	45.5

Τα υπολείμματα BI0918K1F και BI0918K2C (1.6 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα δύο κλάσματα BI0918K1F1 και BI0918K1F2 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-37** και **BI0918-09**, αντίστοιχα) (Πίν. 57).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918K1F1	0.8	7.95-8.35
BI0918K1F2	0.3	11.37

Τα υπολείμματα BI0918K1H και BI0918K2E (13.1 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918K1H3 και BI0918K1H4 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-35** και **BI0918-33**, αντίστοιχα) (Πίν. 58).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918K1H1	0.4	7.05
BI0918K1H2	0.3	7.88
BI0918K1H3	9.1	9.00
BI0918K1H4	2.0	10.57

Το υπόλειμμα BI0918K3 (15.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918K3D, BI0918K3E, BI0918K3F και BI0918K3G ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-12**, **BI0918-13**, **BI0918-14** και **BI0918-15**, αντίστοιχα) (Πίν. 59).

Πίνακας 59. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλυσης (min)
BI0918K3A	1.4	12.1
BI0918K3B	2.2	15.7
BI0918K3C	0.7	18.2
BI0918K3D	1.1	19.8
BI0918K3E	1.3	28.8
BI0918K3F	5.4	30.8
BI0918K3G	3.3	47.3

Το υπόλειμμα BI0918K4 (9.6 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 5 mL. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 60) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 3 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 61).

Πίνακας 60. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλυσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	cHex/Me ₂ CO (80:20)
2	cHex/Me ₂ CO (70:30)
3	cHex/Me ₂ CO (60:40)
4	cHex/Me ₂ CO (50:50)
5	Me ₂ CO (100%)

Πίνακας 61. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-2	BI0918K4A	5.3
3-4	BI0918K4B	1.4
5	BI0918K4C	0.3

Το υπόλειμμα BI0918K4A (5.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918K4A3 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-22**) (Πίν. 62).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλυσης	cHex/Me ₂ CO (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλυσης (min)
BI0918K4A1	0.1	10.82
BI0918K4A2	0.1	11.75
BI0918K4A3	2.3	12.00-15.00

Το υπόλειμμα BI0918L (113.5 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 50 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 5 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 63).

Πίνακας 63. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλυσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
BI0918L1	MeOH/H ₂ O (20:80)	22.3
BI0918L2	MeOH/H ₂ O (40:60)	47.7
BI0918L3	MeOH/H ₂ O (60:40)	10.7
BI0918L4	MeOH/H ₂ O (80:20)	18.5
BI0918L5	MeOH (100%)	8.0

Το υπόλειμμα BI0918L1 (22.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L1B, BI0918L1C και BI0918L1E ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-16**, **BI0918-17** και **BI0918-06**, αντίστοιχα) (Πίν. 64).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλυσης	MeOH/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλυσης (min)
BI0918L1A	0.3	7.46
BI0918L1B	2.3	10.65
BI0918L1C	0.5	12.40
BI0918L1D	1.5	16.83
BI0918L1E	4.7	17.95

Το υπόλειμμα BI0918L1D (1.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L1D3 και BI0918L1D4 ήταν

καθαρές ουσίες (**BI0918-27** και **BI0918-18**, αντίστοιχα) (Πίν. 65).

Πίνακας 65. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Luna C18 (2) 100A 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L1D1	0.2	23.6
BI0918L1D2	0.5	24.2
BI0918L1D3	0.4	26.1
BI0918L1D4	0.4	50.4

Το υπόλειμμα BI0918L2 (47.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 10 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L2A, BI0918L2H και BI0918L2J ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-06**, **BI0918-09** και **BI0918-10**, αντίστοιχα) (Πίν. 66).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2A	2.0	10.24
BI0918L2B	3.6	11.11
BI0918L2C	7.7	12.33
BI0918L2D	1.6	13.03-13.84
BI0918L2E	7.7	13.84-15.75
BI0918L2F	3.2	16.06
BI0918L2G	5.5	16.71
BI0918L2H	10.4	18.20
BI0918L2I	3.8	19.54-22.77
BI0918L2J	2.2	23.39

Το υπόλειμμα BI0918L2C (7.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 67).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2C1	0.6	7.00-9.00
BI0918L2C2	3.0	9.41
BI0918L2C3	3.4	9.97

Τα υπολείμματα BI0918L2C2 και BI0918L2C3 (6.4 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L2C2A, BI0918L2C2C και BI0918L2C2D ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-35**, **BI0918-41** και **BI0918-42**, αντίστοιχα) (Πίν. 68).

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

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (20:80)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2C2A	1.8	15.60
BI0918L2C2B	0.2	18.72-19.34
BI0918L2C2C	1.1	23.29
BI0918L2C2D	0.5	26.17

Το υπόλειμμα BI0918L2E (7.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918L2E4 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-39**) (Πίν. 69).

Πίνακας 69. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2E1	0.1	8.15
BI0918L2E2	1.0	10.27
BI0918L2E3	6.0	10.90
BI0918L2E4	0.6	12.78

Τα υπολείμματα BI0918L2E2 και BI0918L2E3 (7.0 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L2E2A και BI0918L2E2B ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-33** και **BI0918-43**, αντίστοιχα) (Πίν. 70).

Πίνακας 70. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (20:80)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2E2A	1.1	17.34
BI0918L2E2B	0.9	18.37
BI0918L2E2C	0.3	22.11
BI0918L2E2D	0.5	33.00
BI0918L2E2E	0.6	12.00

Το υπόλειμμα BI0918L2F (3.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L2F2 και BI0918L2F3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-40** και **BI0918-39**, αντίστοιχα) (Πίν. 71).

Πίνακας 71. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2F1	0.9	11.11
BI0918L2F2	1.4	11.83
BI0918L2F3	0.6	13.21
BI0918L2F4	0.3	15.04

Το υπόλειμμα BI0918L2G (5.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα 3 κλάσματα BI0918L2G1, BI0918L2G2 και BI0918L2G3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-40**, **BI0918-39** και **BI0918-38**, αντίστοιχα) (Πίν. 72).

Πίνακας 72. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2G1	1.9	11.90
BI0918L2G2	0.4	13.45
BI0918L2G3	2.0	14.67

Το υπόλειμμα BI0918L2I (3.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918L2I1 και BI0918L2I3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-09** και **BI0918-12**, αντίστοιχα) (Πίν. 73).

Πίνακας 73. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L2I1	0.5	14.57
BI0918L2I2	0.6	15.29
BI0918L2I3	0.6	16.32
BI0918L2I4	0.5	17.46

Το υπόλειμμα BI0918L3 (10.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918L3B ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-10**) (Πίν. 74).

Πίνακας 74. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L3A	1.1	10.36-14.18
BI0918L3B	2.0	14.18-17.50
BI0918L3C	3.3	17.50-22.83
BI0918L3D	1.9	22.83-25.08
BI0918L3E	2.4	25.08-28.90

Τα υπολείμματα BI0918L3C και BI0918L3D (5.2 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα δύο κλάσματα BI0918L3C1 και BI0918L3C2 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-19** και **BI0918-20**, αντίστοιχα) (Πίν. 75).

Πίνακας 75. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (30:70)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L3C1	2.0	26.60
BI0918L3C2	2.0	31.96

Στην προσπάθεια να διαλυθεί το υπόλειμμα BI0918L3E (2.4 mg) σε σύστημα διαλυτών cHex/Me₂CO (30:70) ώστε να υποβληθεί σε HPLC κανονικής φάσης, καταβυθίστηκε ίζημα (2.1 mg), το οποίο διαχωρίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-21**).

Το υπόλειμμα BI0918L4 (18.5 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 5 mL. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 76) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 4 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918L4A ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-22**).

(Πίν. 77).

Πίνακας 76. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	cHex/Me ₂ CO (80:20)
2	cHex/Me ₂ CO (70:30)
3	cHex/Me ₂ CO (60:40)
4	cHex/Me ₂ CO (50:50)
5	Me ₂ CO (100%)

Πίνακας 77. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BI0918L4A	8.7
2	BI0918L4B	5.5
3	BI0918L4C	1.1
4-5	BI0918L4D	2.2

Το υπόλειμμα BI0918L4B (5.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918L4B3 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-22**) (Πίν. 78).

Πίνακας 78. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918L4B1	0.1	8.11
BI0918 L4B2	0.1	10.87
BI0918 L4B3	4.7	12.00-16.00

Τα υπολείμματα BI0918M και BI0918N (487 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 30 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 5 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 79).

Πίνακας 79. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
ΒΙ0918Μ1	MeOH/H ₂ O (20:80)	186.2
ΒΙ0918Μ2	MeOH/H ₂ O (40:60)	30.9
ΒΙ0918Μ3	MeOH/H ₂ O (60:40)	12.9
ΒΙ0918Μ4	MeOH/H ₂ O (80:20)	21.5
ΒΙ0918Μ5	MeOH (100%)	62.6

Το υπόλειμμα ΒΙ0918Μ1 (186.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα ΒΙ0918Μ1D και ΒΙ0918Μ1Ε ήταν καθαρές ουσίες (**ΒΙ0918-23** και **ΒΙ0918-24**, αντίστοιχα) (Πίν. 80).

Πίνακας 80. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
ΒΙ0918Μ1Α	28.4	6.32
ΒΙ0918Μ1Β	92.3	6.80
ΒΙ0918Μ1C	33.0	7.24-13.73
ΒΙ0918Μ1D	1.7	14.17
ΒΙ0918Μ1Ε	1.3	24.88

Το υπόλειμμα ΒΙ0918Μ2 (30.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα ΒΙ0918Μ2Ε και ΒΙ0918Μ2F ήταν καθαρές ουσίες (**ΒΙ0918-23** και **ΒΙ0918-24**, αντίστοιχα) (Πίν. 81).

Πίνακας 81. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
ΒΙ0918Μ2Α	3.9	6.38
ΒΙ0918Μ2Β	1.9	8.21

BI0918M2C	2.5	10.12
BI0918M2D	3.2	11.13
BI0918M2E	1.7	15.00
BI0918M2F	4.3	30.69
BI0918M2G	5.0	-

Το υπόλειμμα BI0918M1C (33.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 11 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 82).

Πίνακας 82. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C1	4.2	6.71
BI0918M1C2	1.6	7.29
BI0918M1C3	1.3	7.82
BI0918M1C4	2.4	8.07
BI0918M1C5	4.2	8.54
BI0918M1C6	2.6	9.73
BI0918M1C7	2.1	10.26
BI0918M1C8	2.0	10.64
BI0918M1C9	1.4	11.33
BI0918M1C10	0.6	12.37
BI0918M1C11	2.0	14.04

Το υπόλειμμα BI0918M1C5 (4.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα τέσσερα κλάσματα BI0918M1C5A, BI0918M1C5B, και BI0918M1C5D ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-29**, **BI0918-30** και **BI0918-32**, αντίστοιχα) (Πίν. 83).

Πίνακας 83. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C5A	0.5	11.26
BI0918M1C5B	0.6	15.48
BI0918M1C5C	0.8	17.67
BI0918M1C5D	0.3	20.73

Το υπόλειμμα BI0918M1C5C (0.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-31**) (Πίν. 84).

Πίνακας 84. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Luna C18 (2) 100A 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C5C1	0.8	19.60

Το υπόλειμμα BI0918M1C5D (0.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-32**) (Πίν. 85).

Πίνακας 85. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Luna C18 (2) 100A 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C5D1	0.3	22.92

Τα υπολείμματα BI0918M1C6, BI0918M1C7, BI0918M2C και BI0918M2D (10.4 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918M1C6A και BI0918M1C6B ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-25** και **BI0918-26**, αντίστοιχα) (Πίν. 86).

Πίνακας 86. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C6A	2.6	14.94
BI0918M1C6B	1.3	15.78
BI0918M1C6C	0.9	17.41

Το υπόλειμμα BI0918M1C6A (2.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-25**) (Πίν. 87).

Πίνακας 87. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Luna C18 (2) 100A 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C6A1	1.1	19.94

Το υπόλειμμα BI0918M1C6B (1.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-26**) (Πίν. 88).

Πίνακας 88. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Luna C18 (2) 100A 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C6B1	0.5	29.50

Το υπόλειμμα BI0918M1C6C (0.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα δύο κλάσματα BI0918M1C6C1 και BI0918M1C6C2 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-26** και **BI0918-28**, αντίστοιχα) (Πίν. 89).

Πίνακας 89. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Luna C18 (2) 100A 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M1C6C1	0.1	29.50
BI0918M1C6C2	0.5	32.30

Το υπόλειμμα BI0918M2G (5.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0918M2G4 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-24**) (Πίν. 90).

Πίνακας 90. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M2G1	0.7	11.14
BI0918M2G2	0.5	11.70
BI0918M2G3	2.1	18.30-21.93
BI0918M2G4	0.5	28.27

Το υπόλειμμα BI0918M3 (12.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0918M3B και BI0918M3E ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-23** και **BI0918-24**, αντίστοιχα) (Πίν. 91).

Πίνακας 91. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.8 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0918M3A	1.8	8.60-14.74
BI0918M3B	0.7	15.21

BI0918M3C	0.4	17.40
BI0918M3D	1.0	25.40
BI0918M3E	1.2	30.91

Το αρχικό υπόλειμμα BI0R918, σκούρου κόκκινου χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 1.098 g, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 200 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 15 κλάσματα, τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 92). Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 13 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 93).

Πίνακας 92. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	cHex (100%)
2	cHex/EtOAc (90:10)
3	cHex/EtOAc (80:20)
4	cHex/EtOAc (70:30)
5	cHex/EtOAc (60:40)
6	cHex/EtOAc (50:50)
7	cHex/EtOAc (40:60)
8	cHex/EtOAc (30:70)
9	cHex/EtOAc (20:80)
10	cHex/EtOAc (10:90)
11	EtOAc (100%)
12	EtOAc/MeOH (95:5)
13	EtOAc/MeOH (90:10)
14	EtOAc/MeOH (75:25)
15	MeOH (100%)

Πίνακας 93. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BI0R918A	19.0
2	BI0R918B	26.8
3	BI0R918C	440.7
4	BI0R918D	246.5
5	BI0R918E	39.4
6	BI0R918F	17.2
7	BI0R918G	29.7
8	BI0R918H	20.3

9-10	BIOR918I	18.3
11-12	BIOR918J	39.6
13	BIOR918K	85.4
14	BIOR918L	33.6
15	BIOR918M	79.5

Τα υπολείμματα BIOR918D και BIOR918E (285.9 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 50 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 14 κλάσματα, τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 94). Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 7 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 95).

Πίνακας 94. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-2	n-Hex/EtOAc (75:25)
3	n-Hex/EtOAc (70:30)
4-6	n-Hex/EtOAc (60:40)
7-8	n-Hex/EtOAc (55:45)
9-10	n-Hex/EtOAc (50:50)
11	n-Hex/EtOAc (30:70)
12-13	EtOAc (100%)
14	MeOH (100%)

Πίνακας 95. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BIOR918D1	13.5
2-3	BIOR918D2	76.0
4	BIOR918D3	15.6
5-6	BIOR918D4	15.3
7-9	BIOR918D5	6.8
10-12	BIOR918D6	145.1
13-14	BIOR918D7	3.4

Το υπόλειμμα BIOR918D6 (145.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BIOR918D6B ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-03**) (Πίν. 96).

Πίνακας 96. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere Silica 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (82.5:17.5)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918D6A	8.2	10.97
BIOR918D6B	57.4	12.60
BIOR918D6C	6.1	-

Το υπόλειμμα BIOR918D6A (8.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BIOR918D6A1 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-34**) (Πίν. 97).

Πίνακας 97. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere Silica 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	n-Hex/Me ₂ CO (82:18)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918D6A1	5.9	15.34
BIOR918D6A2	0.5	7.16-8.28

Το υπόλειμμα BIOR918D6C (6.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BIOR918D6C1 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-03**) (Πίν. 98).

Πίνακας 98. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere Silica 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	n-Hex/Me ₂ CO (82:18)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918D6C1	1.8	19.31
BIOR918D6C2	0.4	19.74-20.87
BIOR918D6C3	0.5	6.16-8.50

Τα υπολείμματα BIOR918F και BIOR918G (46.9 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918F4 και BIOR918F8 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-44** και **BI0918-01**, αντίστοιχα) (Πίν. 99).

Πίνακας 99. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918F1	1.6	6.09-7.67
BIOR918F2	2.0	7.95
BIOR918F3	15.4	8.23
BIOR918F4	1.2	13.79
BIOR918F5	8.2	16.26
BIOR918F6	3.8	16.68
BIOR918F7	1.8	18.33
BIOR918F8	0.5	29.28

Τα υπολείμματα BIOR918H και BIOR918I (38.6 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918H5, BIOR918H6 και BIOR918H7 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-01**, **BI0918-02** και **BI0918-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 100).

Πίνακας 100. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (65:35)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918H1	0.2	6.36
BIOR918H2	0.6	7.18
BIOR918H3	5.6	7.71
BIOR918H4	1.0	12.41
BIOR918H5	17.6	23.16
BIOR918H6	1.2	28.72
BIOR918H7	0.9	32.48

Τα υπολείμματα BIOR918J και BIOR918K (125.0 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 50 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 6 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 101).

Πίνακας 101. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
BIOR918J1	MeOH/H ₂ O (20:80)	44.5
BIOR918J2	MeOH/H ₂ O (40:60)	20.6
BIOR918J3	MeOH/H ₂ O (60:40)	5.1
BIOR918J4	MeOH/H ₂ O (80:20)	26.9
BIOR918J5	MeOH (100%)	26.9
BIOR918J6	EtOAc (100%)	1.0

Το υπόλειμμα BIOR918J1 (44.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 15 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918J1D, BIOR918J1G και BIOR918J1K ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-06**, **BI0918-08** και **BI0918-33**, αντίστοιχα) (Πίν. 102).

Πίνακας 102. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J1A	0.2	8.70
BIOR918J1B	0.1	10.88
BIOR918J1C	0.9	13.00-20.50
BIOR918J1D	1.0	21.28
BIOR918J1E	0.5	21.89-23.55
BIOR918J1F	1.1	23.56-26.70
BIOR918J1G	2.2	27.83
BIOR918J1H	1.0	29.58-33.16
BIOR918J1I	0.2	34.47
BIOR918J1J	0.2	43.95
BIOR918J1K	0.7	46.97
BIOR918J1L	0.2	49.47

BIOR918J1M	2.5	52.49
BIOR918J1N	12.8	55.94
BIOR918J1O	10.0	-

Το υπόλειμμα BIOR918J2 (20.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 9 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918J2E και BIOR918J2I ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-08** και **BI0918-09**, αντίστοιχα) (Πίν. 103).

Πίνακας 103. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J2A	0.1	9.7
BIOR918J2B	0.1	15.0
BIOR918J2C	0.3	17.5
BIOR918J2D	0.1	18.4-22.4
BIOR918J2E	0.3	23.2
BIOR918J2F	0.4	37.2
BIOR918J2G	1.6	40.4
BIOR918J2H	3.8	43.5
BIOR918J2I	0.4	80.0

Το υπόλειμμα BIOR918J3 (5.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 104).

Πίνακας 104. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (25:75)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J3A	0.1	26.40
BIOR918J3B	0.3	48.10
BIOR918J3C	0.6	50.40
BIOR918J3D	0.1	78.76

Τα υπολείμματα BIOR918J1F, BIOR918J1H και BIOR918J1O (12.1 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918J1O2, BIOR918J1O3, BIOR918J1O4, BIOR918J1O5 και BIOR918J1O6 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-04**, **BI0918-09**, **BI0918-10**, **BI0918-13** και **BI0918-20**, αντίστοιχα) (Πίν. 105).

Πίνακας 105. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J1O1	1.0	11.9
BIOR918J1O2	1.8	12.5-13.2
BIOR918J1O3	2.6	13.7-14.4
BIOR918J1O4	0.9	15.3
BIOR918J1O5	1.3	18.1
BIOR918J1O6	1.7	19.7

Το υπόλειμμα BIOR918J1M (2.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα 3 κλάσματα BIOR918J1M1, BIOR918J1M2 και BIOR918J1M3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-36**, **BI0918-33** και **BI0918-07**, αντίστοιχα) (Πίν. 106).

Πίνακας 106. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J1M1	0.4	14.12
BIOR918J1M2	0.1	16.39
BIOR918J1M3	1.8	17.59

Τα υπολείμματα BIOR918J1N, BIOR918J2G, BIOR918J2H, BIOR918J3B και BIOR918J3C (19.1 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά

παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918J1N1, BIOR918J1N2 και BIOR918J1N4 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-35**, **BI0918-07** και **BI0918-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 107).

Πίνακας 107. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J1N1	4.4	14.43
BIOR918J1N2	1.3	18.05
BIOR918J1N3	1.8	18.05-18.67
BIOR918J1N4	6.9	18.67

Το υπόλειμμα BIOR918J2F (0.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και το κλάσμα BIOR918J2F2 ήταν καθαρή ουσία (**BI0918-33**) (Πίν. 108).

Πίνακας 108. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (40:60)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918J2F1	0.2	14.11
BIOR918J2F2	0.1	16.26

Το υπόλειμμα BIOR918L (33.6 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 5 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 5 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 109).

Πίνακας 109. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
BIOR918L1	MeOH/H ₂ O (20:80)	19.9
BIOR918L2	MeOH/H ₂ O (40:60)	4.7
BIOR918L3	MeOH/H ₂ O (60:40)	1.7
BIOR918L4	MeOH/H ₂ O (80:20)	3.3
BIOR918L5	MeOH (100%)	4.0

Τα υπολείμματα BIOR918L1, BIOR918L2 και BIOR918L3 (26.3 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 10 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918L1H και BIOR918L1I ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-09** και **BI0918-20**, αντίστοιχα) (Πίν. 110).

Πίνακας 110. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (50:50)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918L1A	7.2	4.18-7.81
BIOR918L1B	1.2	8.15
BIOR918L1C	1.8	8.65
BIOR918L1D	2.9	9.18
BIOR918L1E	1.1	10.33
BIOR918L1F	0.8	11.52
BIOR918L1G	1.2	12.67
BIOR918L1H	0.8	14.10
BIOR918L1I	0.7	21.83
BIOR918L1J	6.2	-

Τα υπολείμματα BIOR918L1B, BIOR918L1C, BIOR918L1D, BIOR918L1E, BIOR918L1F, BIOR918L1G και BIOR918L1J (14.0 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 13 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BIOR918L1B4, BIOR918L1B6, BIOR918L1B8 και BIOR918L1B9 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0918-06**, **BI0918-41**, **BI0918-23** και **BI0918-40**, αντίστοιχα) (Πίν. 111).

Πίνακας 111. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

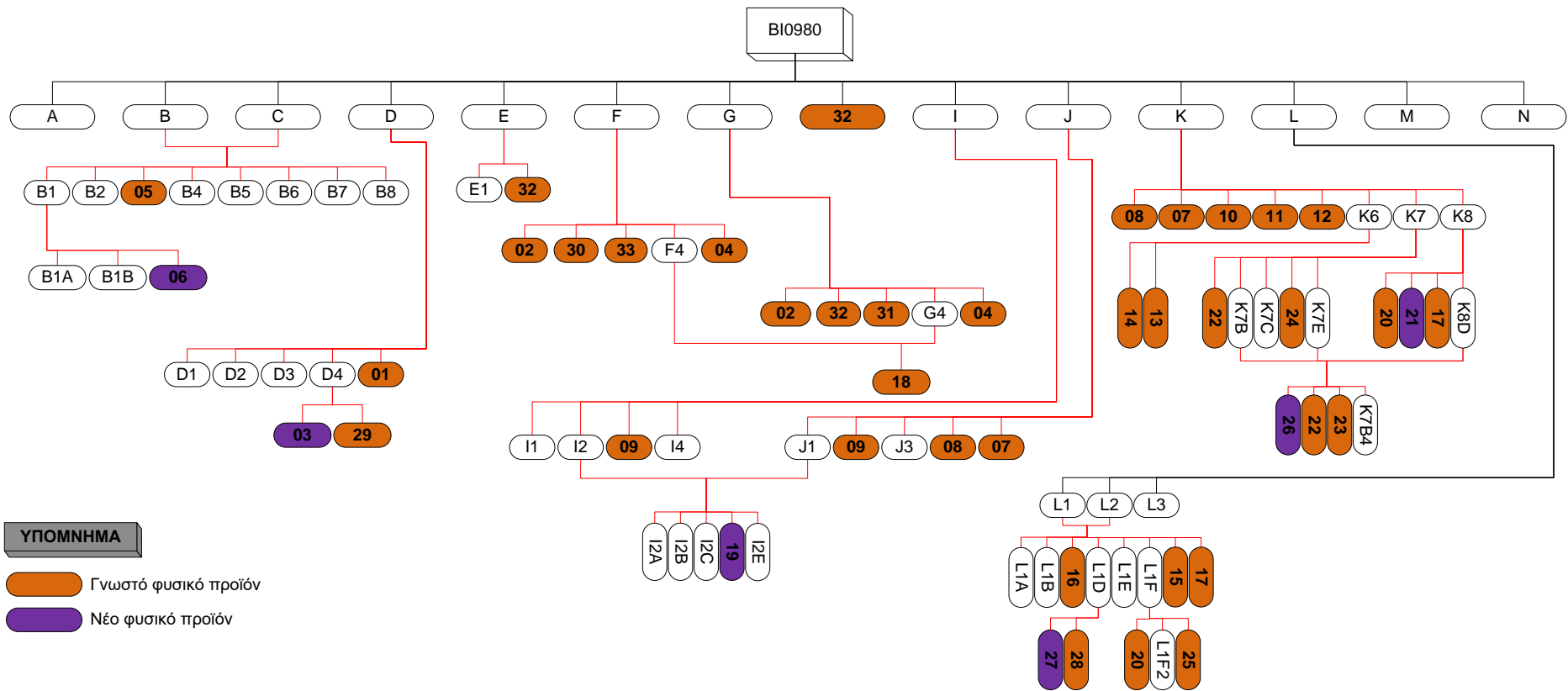
Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (20:80)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BIOR918L1B1	0.1	9.6
BIOR918L1B2	1.0	10.2
BIOR918L1B3	0.9	10.5
BIOR918L1B4	1.2	11.2
BIOR918L1B5	0.9	11.5
BIOR918L1B6	0.7	12.2-12.5
BIOR918L1B7	0.5	13.1
BIOR918L1B8	3.8	15.2
BIOR918L1B9	0.6	21.4
BIOR918L1B10	0.5	24.1
BIOR918L1B11	1.0	14.1
BIOR918L1B12	1.0	16.2
BIOR918L1B13	1.0	24.6

2.7. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος BI0980

Η συνολική πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό εκχύλισμα του βακτηριακού στελέχους BI0980 παρουσιάζεται διαγραμματικά στην Εικόνα 16, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.

Το αρχικό υπόλειμμα BI0980, σκούρου καφέ χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 0.534 g, υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας και όγκου 200 mL. Συνολικά παρελήφθησαν 14 υπολείμματα, τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980H ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-32**) (Πίν. 112).



Εικόνα 16. Πορεία χρωματογραφικών διαχωρισμών του αρχικού εκχυλίσματος BI0980.

Πίνακας 112. Υπολείμματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

Κωδικός υπολείμματος	Σύστημα διαλυτών	Μάζα (mg)
BI0980A	cHex (100%)	5.8
BI0980B	cHex/EtOAc (90:10)	4.1
BI0980C	cHex/EtOAc (80:20)	14.6
BI0980D	cHex/EtOAc (70:30)	32.7
BI0980E	cHex/EtOAc (60:40)	14.5
BI0980F	cHex/EtOAc (50:50)	19.6
BI0980G	cHex/EtOAc (40:60)	27.6
BI0980H	cHex/EtOAc (25:75)	5.5
BI0980I	EtOAc (100%)	12.1
BI0980J	EtOAc/MeOH (95:5)	26.8
BI0980K	EtOAc/MeOH (90:10)	51.8
BI0980L	EtOAc/MeOH (75:25)	89.4
BI0980M	EtOAc/MeOH (50:50)	75.4
BI0980N	MeOH (100%)	46.9

Τα υπολείμματα BI0980B και BI0980C (18.7 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980B3 ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-05**) (Πίν. 113).

Πίνακας 113. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (80:20)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980B1	4.0	6.00-6.87
BI0980B2	4.4	6.88-8.05
BI0980B3	1.8	8.24
BI0980B4	0.6	9.06
BI0980B5	0.5	9.53
BI0980B6	1.8	12.00-12.99
BI0980B7	1.8	13.00-14.24
BI0980B8	1.4	17.41

Το υπόλειμμα BI0980B1 (4.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980B1C ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-06**) (Πίν.

114).

Πίνακας 114. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (98:2)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980B1A	0.3	8.79
BI0980B1B	1.7	9.06
BI0980B1C	0.9	9.49

Το υπόλειμμα BI0980D (32.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980D5 ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-01**) (Πίν. 115).

Πίνακας 115. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980D1	17.0	7.58
BI0980D2	1.5	9.43
BI0980D3	1.0	9.92
BI0980D4	2.8	11.18
BI0980D5	2.4	12.04

Το υπόλειμμα BI0980D4 (2.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα δύο κλάσματα BI0980D4A και BI0980D4B ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-03** και **BI0980-29**, αντίστοιχα) (Πίν. 116).

Πίνακας 116. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980D4A	0.4	9.70
BI0980D4B	1.7	12.42

Το υπόλειμμα BI0980E (14.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980E2 ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-29**) (Πίν. 117).

Πίνακας 117. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980E1	1.4	7.78
BI0980E2	0.9	11.16

Το υπόλειμμα BI0980F (19.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980F1, BI0980F2, BI0980F3 και BI0980F5 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-02**, **BI0980-30**, **BI0980-33** και **BI0980-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 118).

Πίνακας 118. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (50:50)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980F1	3.2	8.58
BI0980F2	1.8	8.80-9.07
BI0980F3	1.8	9.07-9.40
BI0980F4	0.8	15.60
BI0980F5	3.7	16.46

Το υπόλειμμα BI0980G (27.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980G1, BI0980G2, BI0980G3 και BI0980G5 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-02**, **BI0980-32**, **BI0980-31** και **BI0980-04**, αντίστοιχα) (Πίν. 119).

Πίνακας 119. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (50:50)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980G1	0.3	8.55
BI0980G2	5.6	9.11
BI0980G3	0.8	10.90
BI0980G4	0.8	15.53
BI0980G5	5.1	16.51

Το υπολείμμα BI0980F4 και BI0980G4 (1.6 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-18**) (Πίν. 120).

Πίνακας 120. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980F4A	0.4	21.91

Το υπόλειμμα BI0980I (12.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980I3 ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-09**) (Πίν. 121).

Πίνακας 121. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/ Me ₂ CO (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980I1	0.4	11.80
BI0980I2	1.4	12.01
BI0980I3	1.9	14.16
BI0980I4	0.4	15.33

Το υπόλειμμα BI0980I (28.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980I2, BI0980I4 και BI0980I5 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-09**, **BI0980-08** και **BI0980-07**, αντίστοιχα) (Πίν. 122).

Πίνακας 122. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/ Me ₂ CO (50:50)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980J1	1.0	11.98
BI0980J2	2.2	14.10
BI0980J3	0.5	15.31
BI0980J4	11.2	26.66
BI0980J5	3.3	30.85

Το υπολείμματα BI0980I2 και BI0980J1 (2.4 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BI0980I2D ήταν καθαρή ουσία (**BI0980-19**) (Πίν. 123).

Πίνακας 123. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980I2A	0.2	10.46
BI0980I2B	0.4	11.84
BI0980I2C	0.2	12.57
BI0980I2D	0.3	13.74
BI0980I2E	0.3	20.15

Το υπόλειμμα BI0980K (51.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980K1, BI0980K2, BI0980K3, BI0980K4 και BI0980K5 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-08**, **BI0980-07**, **BI0980-10**, **BI0980-11** και **BI0980-12**, αντίστοιχα) (Πίν. 124).

Πίνακας 124. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/ Me ₂ CO (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980K1	3.2	19.79
BI0980K2	6.9	21.73
BI0980K3	4.4	23.97
BI0980K4	1.3	26.12
BI0980K5	4.1	26.97
BI0980K6	8.4	29.38
BI0980K7	10.9	37.56
BI0980K8	4.4	43.50

Το υπόλειμμα BI0980K6 (8.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα δύο κλάσματα BI0980K6A και BI0980K6B ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-14** και **BI0980-13**, αντίστοιχα) (Πίν. 125).

Πίνακας 125. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980K6A	2.1	10.98
BI0980K6B	6.3	14.13

Το υπόλειμμα BI0980K7 (10.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980K7A και BI0980K7D ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-22** και **BI0980-24**, αντίστοιχα) (Πίν. 126).

Πίνακας 126. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (20:80)
Ροή διαλύτη	1.7 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980K7A	2.8	7.18-11.20
BI0980K7B	2.0	11.84
BI0980K7C	0.7	31.06
BI0980K7D	2.9	36.36
BI0980K7E	2.5	-

Το υπόλειμμα BI0980K8 (4.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980K8A, BI0980K8B και BI0980K8C ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-20**, μίγμα των **BI0980-21 & BI0980-34** και **BI0980-17**, αντίστοιχα) (Πίν. 127).

Πίνακας 127. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeCN/H ₂ O (20:80)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980K8A	0.3	14.28
BI0980K8B	0.8	18.41
BI0980K8C	0.9	24.28
BI0980K8D	2.4	-

Τα υπολείμματα BI0980K7B, BI0980K7E και BI0980K8D (6.9 mg) συνενώθηκαν και

υποβλήθηκαν σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980K7B1, BI0980K7B2 και BI0980K7B3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-26**, **BI0980-22** και **BI0980-23**, αντίστοιχα) (Πίν. 128).

Πίνακας 128. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (20:80)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980K7B1	1.6	19.13
BI0980K7B2	1.5	20.88
BI0980K7B3	2.8	22.37
BI0980K7B4	1.0	23.67-27.52

Το υπολείμμα BI0980L (89.4 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία μειούμενης πολικότητας και όγκου 50 mL. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 129) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 3 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 130).

Πίνακας 129. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	MeOH/H ₂ O (20:80)
2	MeOH/H ₂ O (40:60)
3	MeOH/H ₂ O (60:40)
4	MeOH/H ₂ O (80:20)
5	MeOH (100%)

Πίνακας 130. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BI0980L1	32.3
2-3	BI0980L2	11.8
4-5	BI0980L3	45.3

Τα υπολείμματα BI0980L1 και BI0980L2 (44.1 mg) συνενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε HPLC αντίστροφης φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και

ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980L1C, BI0980L1G και BI0980L1H ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-16**, **BI0980-15** και **BI0980-17**, αντίστοιχα) (Πίν. 131).

Πίνακας 131. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econoshpere C18 10u 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	MeOH/H ₂ O (30:70)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980L1A	15.7	7.05
BI0980L1B	2.0	8.18
BI0980L1C	1.7	12.49
BI0980L1D	2.4	13.59-16.99
BI0980L1E	1.5	16.99-20.59
BI0980L1F	4.8	22.40
BI0980L1G	0.8	27.10
BI0980L1H	1.0	44.40

Το υπόλειμμα BI0980L1D (2.4 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι και τα δύο κλάσματα BI0980L1D1 και BI0980L1D2 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-27** και **BI0980-28**, αντίστοιχα) (Πίν. 132).

Πίνακας 132. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (20:80)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980L1D1	0.9	30.66
BI0980L1D2	0.5	42.90

Το υπόλειμμα BI0980L1F (4.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BI0980L1F1 και BI0980L1F3 ήταν καθαρές ουσίες (**BI0980-20** και **BI0980-25**, αντίστοιχα) (Πίν. 133).

Πίνακας 133. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Kromasil 100-10-SIL 25 cm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (20:80)
Ροή διαλύτη	2.0 mL/min

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BI0980L1F1	1.9	25.34
BI0980L1F2	1.2	26.97
BI0980L1F3	1.7	29.41

2.8. Συγκεντρωτική παρουσίαση απομονωμένων μεταβολιτών

Συνολικά από τα οργανικά εκχυλίσματα των βακτηριακών στελεχών BI0327, BI0850, BI0918 και BI0980 απομονώθηκαν 105 μεταβολίτες, εκ των οποίων οι 78 ήταν διαφορετικοί και παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 134.

Πίνακας 134. Απομονωμένοι μεταβολίτες και μάζες αυτών.

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
1	BI0918-27	BI0918L1D3	0.4
2	BI0918-42	BI0918L2C2D	0.5
	BI0980-23	BI0980K7B3	2.8
3	BI0918-41	BI0918L2C2C, BI0R918L1B6	1.8
	BI0980-20	BI0980K8A, BI0980L1F1	2.2
4	BI0918-12	BI0918K3D, BI0918L2I3	1.7
	BI0980-11	BI0980K4	1.3
5	BI0918-14	BI0918K3F	5.4
6	BI0918-13	BI0918K3E, BI0R918J1O5	2.6
	BI0918-23	BI0918M1D, BI0918M2E, BI0918M3B, BI0R918L1B8	7.9
7	BI0980-15	BI0980L1G	0.8
8	BI0980-28	BI0980L1D2	0.5
9	BI0918-10	BI0918L2J, BI0918L3B, BI0R918J1O4	5.1
	BI0980-24	BI0980K7D	2.9
10	BI0918-20	BI0918L3C2, BI0R918J1O6, BI0R918L1I	4.4
11	BI0918-19	BI0918L3C1	2.0
12	BI0980-25	BI0980L1F3	1.7
13	BI0918-36	BI0R918J1M1	0.4
	BI0980-21	BI0980K8B	0.8
14	BI0980-34	BI0980K8B	0.8
15	BI0918-21	BI0918L3E	2.1
16	BI0918-17	BI0918L1C	0.5

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
17	BI0327-08	BI0327G10B1B, BI0327G10B4B	4.2
	BI0918-08	BI0918K1G, BI0918K2D, BI0R918J1G, BI0R918J2E	9.5
	BI0980-10	BI0980K3	4.4
18	BI0327-03	BI0327G10B4F, BI0327G10C2D, BI0327G10C3C	5.2
	BI0850-01	BI0850T1F	8.0
	BI0918-04	BI0918J3, BI0918K1J, BI0918K2G, BI0R918H7, BI0R918J1N4, BI0R918J1O2	37.1
	BI0980-08	BI0980J4, BI0980K1	14.4
19	BI0327-06	BI0327G10B3B, BI0327G10B4D, BI0327G10C2B	2.3
	BI0918-33	BI0918K1H4, BI0918L2E2A, BI0R918J1K, BI0R918J1M2, BI0R918J2F2	4.0
	BI0980-12	BI0980K5	4.1
20	BI0327-07	BI0327G10B3C, BI0327G10B4E, BI0327G10C2C, BI0327G10C3B	8.0
	BI0918-07	BI0918K1I, BI0918K2F, BI0R918J1M3, BI0R918J1N2	16.6
	BI0980-07	BI0980J5, BI0980K2	10.2
21	BI0918-43	BI0918L2E2B	0.9
	BI0980-14	BI0980K6A	2.1
22	BI0327-04	BI0327G10A5B, BI0327G10B2B	8.3
23	BI0327-09	BI0327G16C4	2.7
24	BI0918-29	BI0918M1C5A	0.5
25	BI0327-02	BI0327G10A1D, BI0327G10B4G, BI0327G10C2E, BI0327G10C3D, BI0327G10C4	6.4
	BI0918-09	BI0918K1F2, BI0918L2H, BI0918L2I1, BI0R918J1O3, BI0R918J2I, BI0R918L1H	15.0
	BI0980-13	BI0980K6B	6.3
26	BI0918-40	BI0918L2F2, BI0918L2G1, BI0R918L1B9	3.9
	BI0980-17	BI0980K8C, BI0980L1H	1.9
27	BI0327-01	BI0327G10A1C, BI0327G10A2C, BI0327G10A3C, BI0327G10A4C, BI0327G10A5C, BI0327G10A7B, BI0327G10B1C, BI0327G10B2C, BI0327G10B4C, BI0327G16C3, BI0327G16D	14.4
28	BI0918-06	BI0918L1E, BI0918L2A, BI0R918J1D, BI0R918L1B4	8.9
	BI0980-22	BI0980K7A, BI0980K7B2	4.3
29	BI0980-26	BI0980K7B1	1.6
30	BI0918-18	BI0918L1D4	0.4
	BI0980-27	BI0980L1D1	0.9
31	BI0327-05	BI0327G10B4I, BI0327G10C3F	1.9
	BI0918-38	BI0918L2G3	2.0

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
32	BI0918-01	BI0918G2, BI0918H3A, BI0918H4, BI0R918F8, BI0R918H5	52.6
33	BI0918-35	BI0918K1H3, BI0918L2C2A, BI0R918J1N1	15.3
34	BI0918-32	BI0918M1C5D1	0.3
35	BI0918-28	BI0918M1C6C2	0.5
36	BI0918-25	BI0918M1C6A1	1.1
37	BI0918-31	BI0918M1C5C1	0.8
38	BI0918-26	BI0918M1C6B1, BI0918M1C6C1	0.6
39	BI0327-18	BI0327D2B	1.5
	BI0980-04	BI0980F5, BI0980G5	8.8
40	BI0327-12	BI0327D2C	1.9
41	BI0980-09	BI0980I3, BI0980J2	4.1
42	BI0980-01	BI0980D5	2.4
43	BI0327-20	BI0327G10B4H, BI0327G10C2F, BI0327G10C3E	3.7
	BI0918-39	BI0918L2E4, BI0918L2F3, BI0918L2G2	1.6
44	BI0980-16	BI0980L1C	1.7
45	BI0918-30	BI0918M1C5B	0.6
46	BI0918-16	BI0918L1B	2.3
47	BI0918-15	BI0918K3G	3.3
48	BI0850-02	BI0850T1I	3.1
49	BI0918-02	BI0918H5, BI0918I3, BI0918J2, BI0R918H6	6.7
50	BI0327-17	BI0327C4C	0.5
51	BI0918-05	BI0918I2	1.0
52	BI0980-18	BI0980F4A	0.4
53	BI0327-11	BI0327C4A	0.6
54	BI0327-19	BI0327D1F3	0.8
55	BI0327-14	BI0327D1I	1.2
56	BI0327-13	BI0327D1H	2.0
57	BI0327-22	BI0327D1B	1.3
	BI0980-30	BI0980F2	1.8
58	BI0327-25	BI0327D1G, BI0327D2A	2.0
	BI0918-46	BI0918H3B	0.7
	BI0980-31	BI0980G3	0.8
59	BI0918-47	BI0918H3C	0.5
60	BI0327-23	BI0327D1D	2.3
	BI0980-32	BI0980G2, BI0980H	11.1
61	BI0327-24	BI0327D1E	1.1
	BI0980-29	BI0980D4B, BI0980E2	2.6
62	BI0980-33	BI0980F3	1.8
63	BI0918-11	BI0918K1D, BI0918K2A	2.3
64	BI0980-19	BI0980I2D	0.3
65	BI0980-03	BI0980D4A	0.4
66	BI0980-05	BI0980B3	1.8
67	BI0980-06	BI0980B1C	0.9

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
68	BI0327-15	BI0327D1C	3.6
	BI0980-02	BI0980F1, BI0980G1	3.5
69	BI0918-45	BI0918E15B1	1.8
70	BI0327-16	BI0327D1F1	0.8
71	BI0327-21	BI0327B, BI0327C1	25.0
72	BI0327-10	BI0327C2F1	2.3
73	BI0918-03	BI0918E11, BI0918E12, BI0918E13, BI0R918D6B, BI0R918D6C1	222.4
74	BI0918-34	BI0R918D6A1	5.9
75	BI0918-22	BI0918K4A3, BI0918L4A, BI0918L4B3	15.3
-	BI0918-24	BI0918M1E, BI0918M2F, BI0918M2G4, BI0918M3E	7.3
-	BI0918-37	BI0918K1F1	0.8
-	BI0918-44	BI0R918F4	1.2

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η χημική σύσταση των οργανικών εκχυλισμάτων τεσσάρων επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών θαλάσσιας προέλευσης με αποτέλεσμα την απομόνωση συνολικά 78 διαφορετικών μεταβολιτών, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι 75 (1-75).

Συγκεκριμένα, το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus endophyticus* BI0327, το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε ανατολικά της περιοχής Θειωρυχείο στη Μήλο σε βάθος 4 m τον Ιούλιο του 2012, υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα. Το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά την εκχύλιση της υγρής καλλιέργειας υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση και ταυτοποίηση 25 δευτερογενών μεταβολιτών (17-20, 22, 23, 25, 27, 31, 39, 40, 43, 50, 53-58, 60, 61, 68, 70-72).

Το βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces althiolicus* BI0850, το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε στη περιοχή του Αργοστολίου στη Κεφαλονιά σε βάθος 3 m τον Απρίλιο του 2014, υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα. Το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά την εκχύλιση της υγρής καλλιέργειας υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση και ταυτοποίηση 2 δευτερογενών μεταβολιτών (18, 48).

Το βακτηριακό στέλεχος *Streptomyces smyrnaeus* BI0918, το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε νοτιώς της Βάτσας στη Κεφαλονιά σε βάθος 75 m τον Μάιο του 2014, υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα δύο φορές. Τα οργανικά εκχυλίσματα που προέκυψαν μετά την εκχύλιση των υγρών καλλιέργειών υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση 47 δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι 44 (1-7, 9-11, 13, 15-21, 24-26, 28, 30-38, 43, 45-47, 49, 51, 58, 59, 63, 69, 73-75).

Το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus subtilis* BI0980, το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσιο ίζημα που συλλέχθηκε μεταξύ της Κέρκυρας και της Ερεικούσας σε βάθος 18 m τον Αύγουστο του 2014, υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα. Το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε μετά την εκχύλιση της υγρής καλλιέργειας υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση και ταυτοποίηση 34 δευτερογενών μεταβολιτών (2-4, 7-9, 12, 13, 14, 17-21, 25, 26, 28-30, 39, 41, 42, 44, 52, 57, 58, 60-62, 64-68).

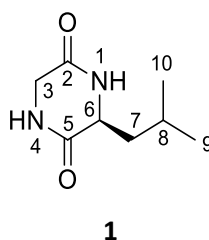
Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών βασίστηκε στην ανάλυση των

φασματοσκοπικών τους δεδομένων (κυρίως NMR και MS) και στη σύγκρισή τους με τα δεδομένα ανάλογων δομών της βιβλιογραφίας.

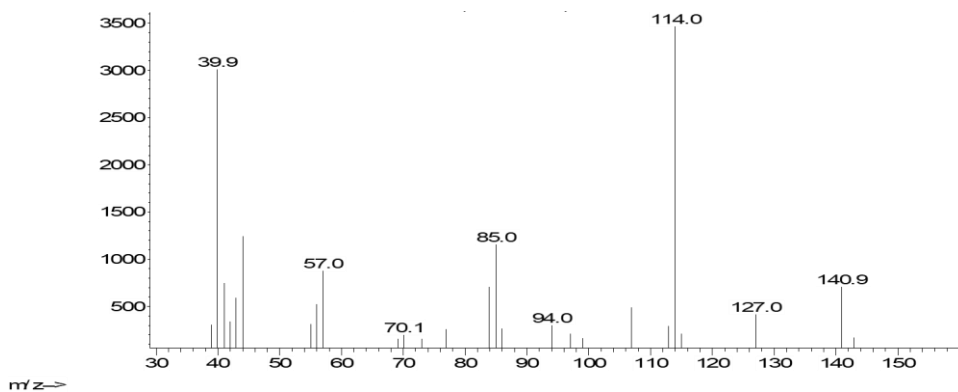
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών **1–75** και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

3.1. Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.4 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα (NMR και MS) του μεταβολίτη **1** παρέπεμπαν σε μόριο της κατηγορίας των 2,5-δικετοπιπεραζινών (2,5-DKPs), δηλαδή ετεροκυκλικά μόρια που προκύπτουν από συμπύκνωση δύο αμινοξέων και συνιστούν τα μικρότερα πεπτίδια που απαντώνται στη φύση.



Συγκεκριμένα, το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **1** (Εικ. 17) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσμα $[M-CH_3N]^+$ σε m/z 141 και θραύσματα $[M-(CH_3)_2CH]^+$ και $[C_4H_6N_2O_2]^+$ σε m/z 127 και 114, αντίστοιχα.



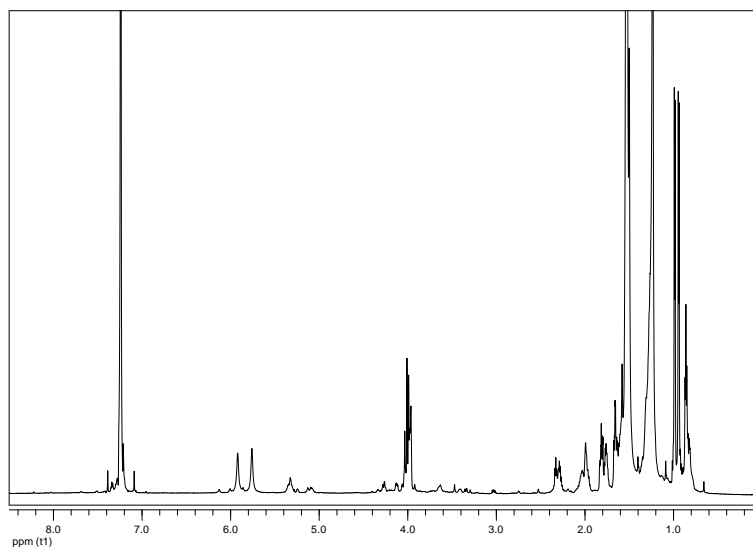
Εικόνα 17. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **1**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **1** (Εικ. 18) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

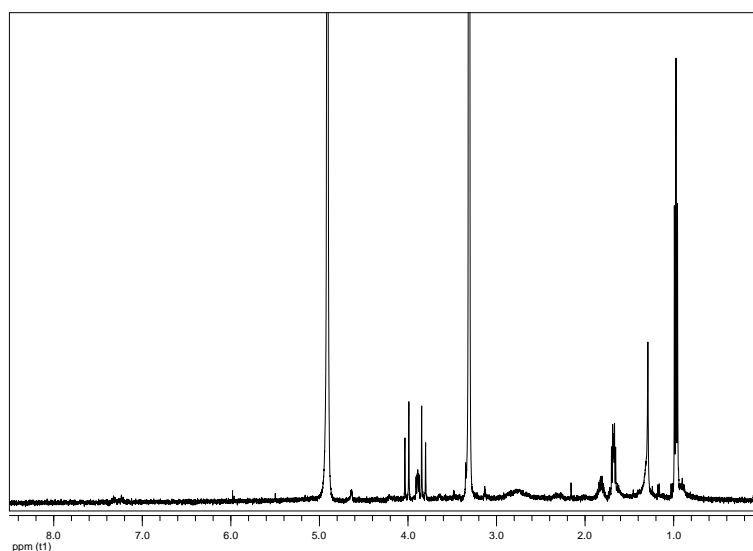
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.94 και 0.99, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία πολλαπλή και δυο διπλές κορυφές σε δ 3.97-4.02, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν σε τρία αποθωρακισμένα πρωτόνια πιθανώς λόγω γειννίασης με ετεροάτομα.

- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.76 και 5.92, οι οποίες ολοκλήρωσαν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο ευκίνητα πρωτόνια.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** (Εικ. 19) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτά των ευκίνητων πρωτονίων που είχαν ανταλλαχθεί με δευτέριο.



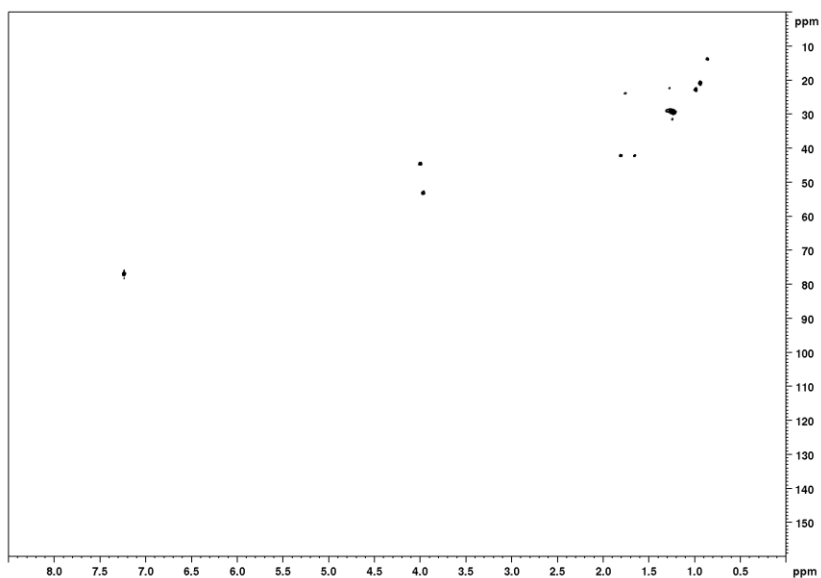
Εικόνα 18. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** σε CDCl_3 .



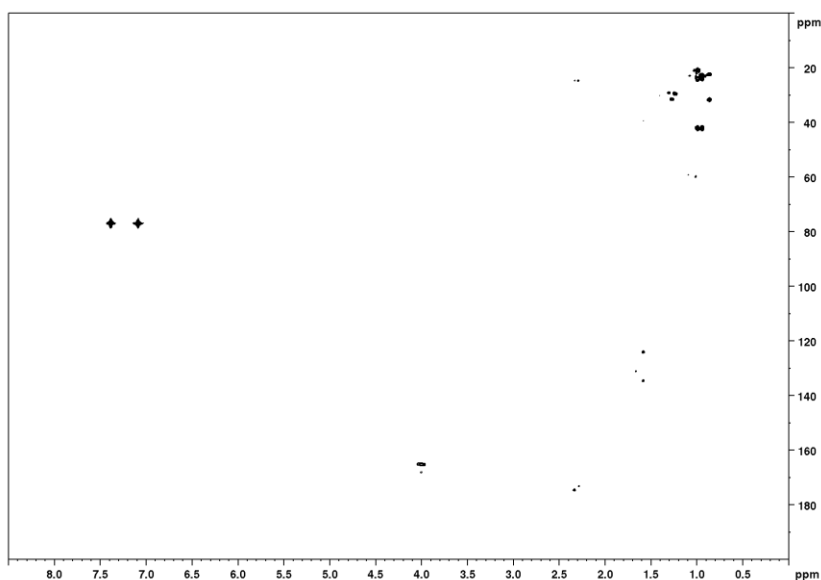
Εικόνα 19. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 20) και HMBC (Εικ. 21) έγινε εμφανής η παρουσία οκτώ ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτοταγή, δύο δευτεροταγή, δύο τριτοταγή και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ

αυτών παρατηρήθηκαν ένα μεθυλένιο σε δ 3.98, 4.02 / 44.6 και ένα μεθίλιο σε δ 3.97 / 53.2 που αποδόθηκαν σε ένα μεθυλένιο H_α και ένα μεθίλιο H_β δύο αμινοξέων, καθώς και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 165.3 και 168.1 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



Εικόνα 20. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 1 σε CDCl₃.

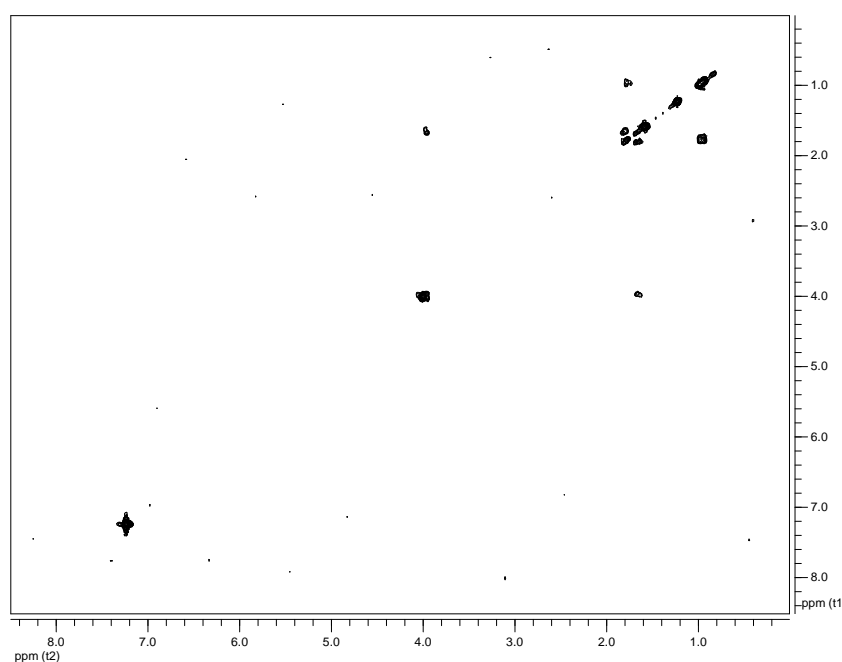


Εικόνα 21. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 1 σε CDCl₃.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **1** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₈H₁₄N₂O₂. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τρεις

βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι μονοκυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **1** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 22). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν το απομονωμένο spin σύστημα H-6 / H₂-7 / H-8 / (H₃-10) H₃-9 που παρέπεμπε στην ύπαρξη μίας λευκίνης, ενώ το απομονωμένο μεθυλένιο H₂-3, το οποίο δεν εμφάνιζε κάποια συσχέτιση, παρέπεμπε σε μία γλυκίνη.



Εικόνα 22. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **1** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **1** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν κυκλο(λευκίνη-γλυκίνη) [cyclo(Leu-Gly)], το οποίο έχει επιδείξει φυτοτοξική δράση (Wei et al., 2017b). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** παρατίθενται στον Πίνακα 135.

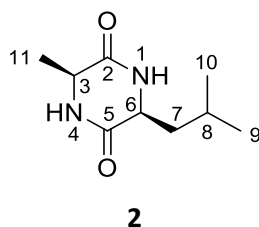
Πίνακας 135. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.92 (br s)		
2	165.3	-	-	-
3	44.6	4.02 (d, 17.4), 3.98 (d, 17.4)	4.01 (d, 17.8), 3.82 (d, 17.8)	3.99 (d, 17.8), 3.81 (d, 17.8)
4	-	5.76 (br s)		
5	168.1	-	-	-
6	53.2	3.97 (m)	3.89 (dd, 8.0, 5.7)	3.88 (t, 6.6)
7	42.3	1.82 (ddd, 13.3, 9.6, 4.3), 1.66 (ddd, 13.3, 9.7, 4.5)	1.68 (m)	1.67 (m)
8	24.0	1.76 (m)	1.83 (m)	1.81 (m)
9	21.0	0.94 (d, 6.4)	0.96 (d, 6.7)	0.96 (d, 6.8)
10	22.8	0.99 (d, 6.4)	0.98 (d, 6.7)	0.97 (d, 6.7)

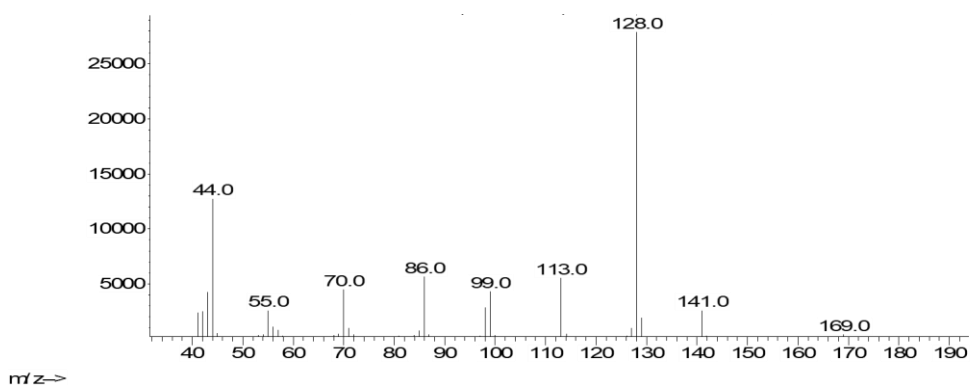
^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Wei et al. (2017b).

3.2. Μεταβολίτης 2

Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 8.4 mg.



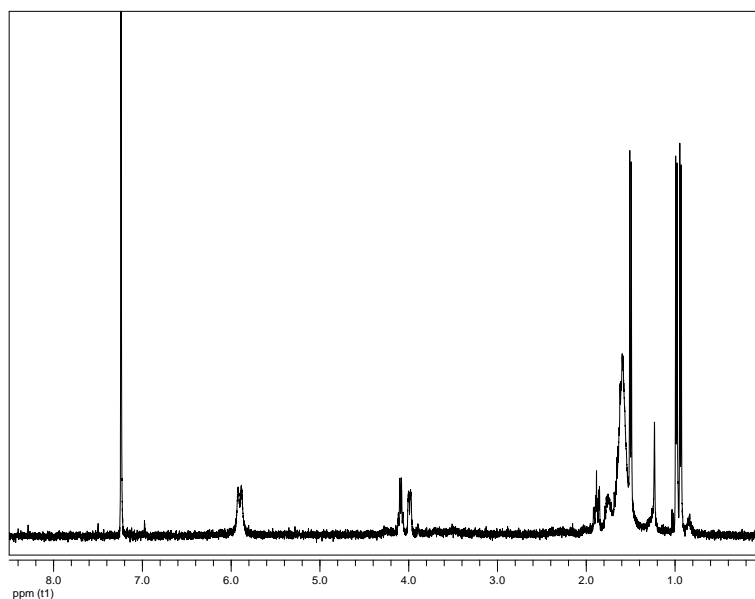
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **2** (Εικ. 23) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 169 και θραύσμα $[M-(CH_3)_2CH]^+$ σε m/z 141.



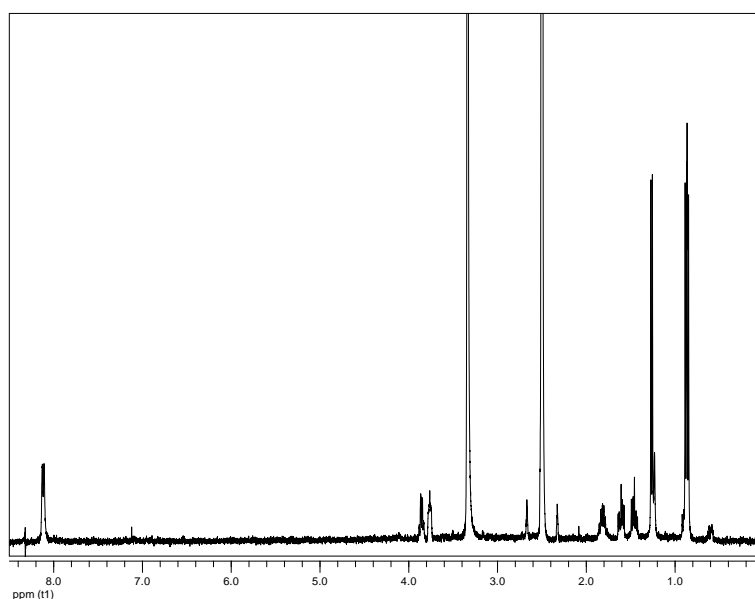
Εικόνα 23. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **2**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **2** (Εικ. 24) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με αυτά του μεταβολίτη **1** που παρέπεμπαν σε ένα μόριο με 2,5-δικετοπιπεραζινικό σκελετό. Η διαφορά εντοπίστηκε στην αντικατάσταση του αποθωρακισμένου μεθυλενίου H_α της γλυκίνης από ένα μεθίλιο H_α , με παράλληλη εμφάνιση μίας ακόμη διπλής κορυφής σε δ 1.50 που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγή άνθρακα.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **2** (Εικ. 25) σε $(CD_3)_2SO$ παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα.



Εικόνα 24. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **2** σε CDCl_3 .

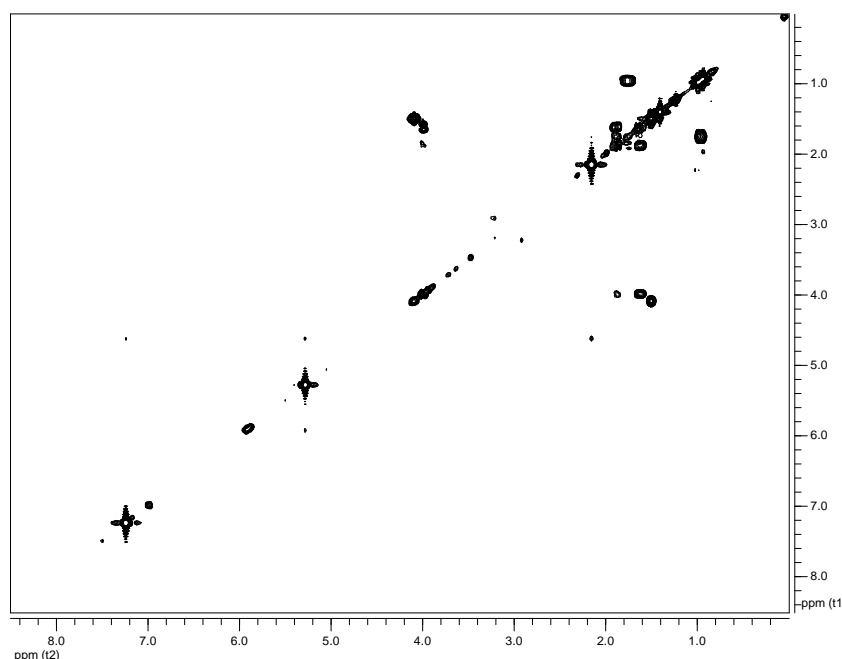


Εικόνα 25. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **2** σε $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **2** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τρεις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι μονοκυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **2** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 26). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 / H-8 / (H₃-10) H₃-9 που παρέπεμπε σε μία λευκίνη και ii) H-3 /

H₃-11 που παρέπεμπε σε μία αλανίνη.



Εικόνα 26. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 2 σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 2 με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(λευκίνη-αλανίνη) [*cis*-cyclo(Leu-Ala)] (Ding et al., 2009b), το οποίο έχει επιδείξει αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι του χλωροφύκου *U. pertusa* και του διατόμου *N. annexa* (Cho et al., 2012a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 2 παρατίθενται στον Πίνακα 136.

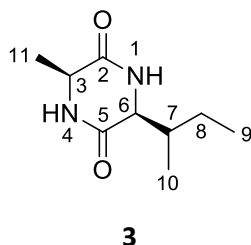
Πίνακας 136. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 2 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.92 (br s)	8.13 (br s)	8.12 (br s)
3	51.1	4.09 (q, 7.0)	3.86 (q, 6.9)	3.86 (q, 6.7)
4	-	5.89 (br s)	8.11 (br s)	8.10 (br s)
6	53.7	3.99 (m)	3.76 (m)	3.77 (m)
7	42.7	1.89 (ddd, 13.9, 9.5, 3.8), 1.62 (ddd, 13.9, 9.7, 4.8)	1.61 (ddd, 13.6, 8.5, 4.7), 1.46 (ddd, 13.6, 8.0, 5.5)	1.61 (m), 1.46 (m)
8	25.2	1.75 (m)	1.82 (m)	1.82 (m)
9	21.7	0.94 (d, 6.5)	0.86 (d, 6.6)	0.86 (d, 6.7)
10	23.6	0.98 (d, 6.5)	0.88 (d, 6.7)	0.88 (d, 6.7)
11	20.4	1.50 (d, 7.0)	1.26 (d, 6.9)	1.27 (d, 6.7)

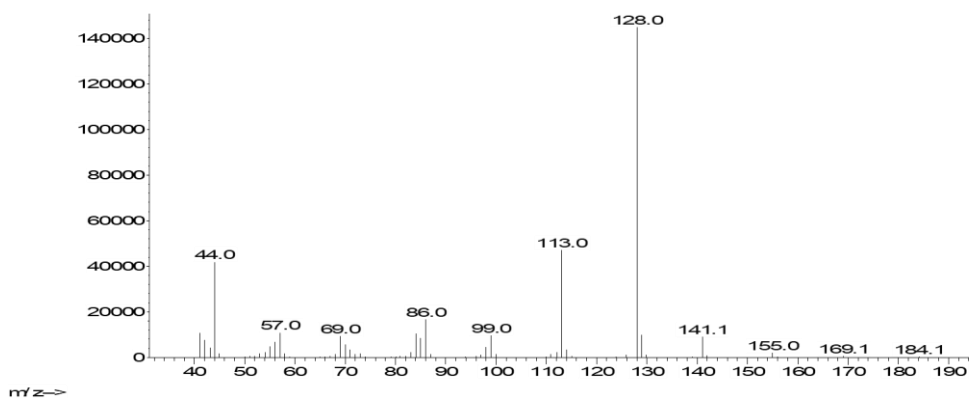
^a Σε CDCl₃, ^b Σε (CD₃)₂SO. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ding et al. (2009b).

3.3. Μεταβολίτης 3

Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 4.0 mg.



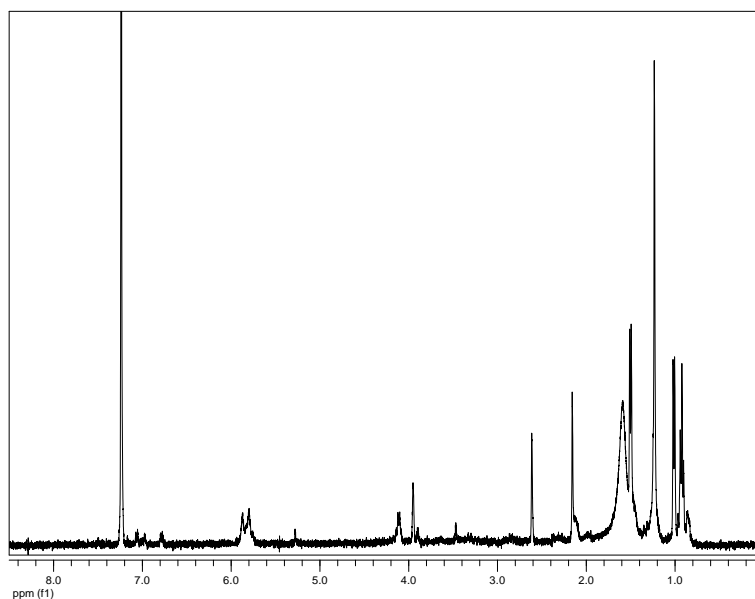
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **3** (Εικ. 27) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 184 και θραύσματα $[M-CH_3]^+$ και $[M-(CH_3)_2CH]^+$ σε m/z 169 και 141, αντίστοιχα.



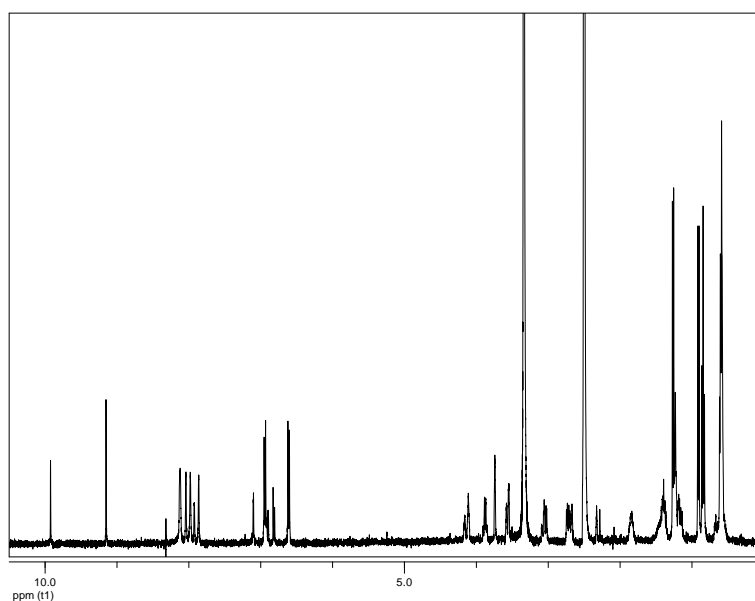
Εικόνα 27. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **3**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **3** (Εικ. 28) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **2**, με κύρια διαφορά την πολλαπλότητα μίας εκ των τριών κορυφών των μεθυλίων που εμφανίστηκε ως τριπλή σε δ 0.93 αντί για διπλή.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **3** (Εικ. 29) σε $(CD_3)_2SO$ παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα.



Εικόνα 28. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** σε CDCl_3 .

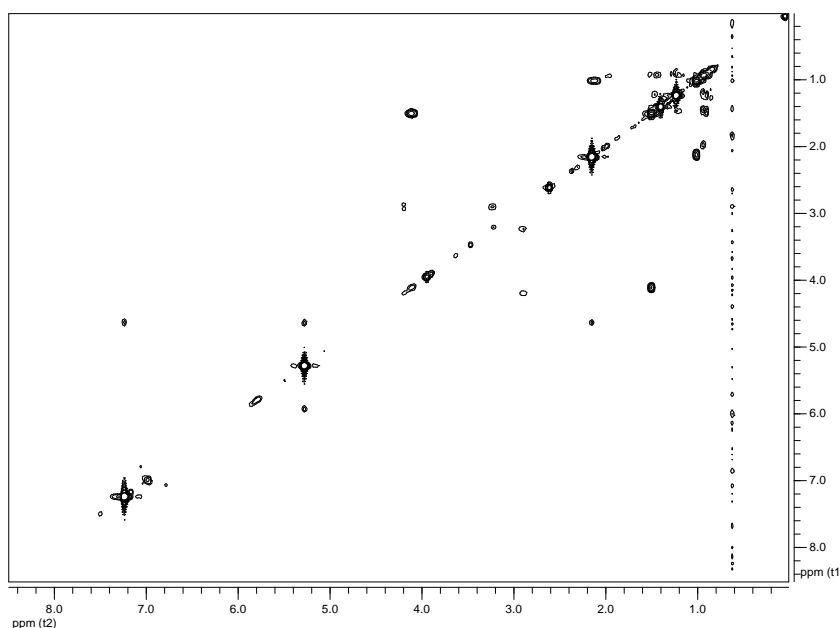


Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** σε $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **3** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **2** ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **3** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 30). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 / H-8 (H₃-10) / H₃-9 που παρέπεμπε σε μία ισολευκίνη και ii) H-3

/ H₃-11 που παρέπεμπε σε μία αλανίνη, επιβεβαιώνοντας την αντικατάσταση της λευκίνης από μία ισολευκίνη.



Εικόνα 30. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **3** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **3** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(ισολευκίνη-αλανίνη) [*cis*-cyclo(Ile-Ala)] (Ding et al., 2009b), για το οποίο δεν υπάρχουν αναφορές ως προς την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** παρατίθενται στον Πίνακα 137.

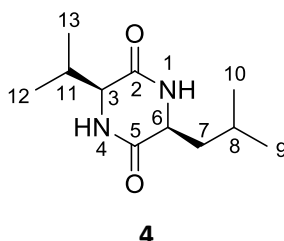
Πίνακας 137. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.88 (br s)	7.98 (br s)	8.00 (br s)
3	50.6	4.11 (q, 7.0)	3.88 (q, 7.0)	3.88 (q, 6.7)
4	-	5.83 (br s)	8.12 (br s)	8.14 (br s)
6	60.0	3.95 (br s)	3.74 (br s)	3.74 (m)
7	37.7	2.12 (m)	1.85 (m)	1.85 (m)
8	23.6	1.46 (m), 1.25 (m)	1.39 (m), 1.17 (m)	1.39 (m), 1.17 (m)
9	11.5	0.93 (t, 7.5)	0.84 (t, 7.4)	0.84 (t, 7.6)
10	15.0	1.01 (d, 7.3)	0.91 (d, 7.1)	0.91 (d, 6.7)
11	20.5	1.50 (d, 7.0)	1.26 (d, 7.0)	1.26 (d, 6.7)

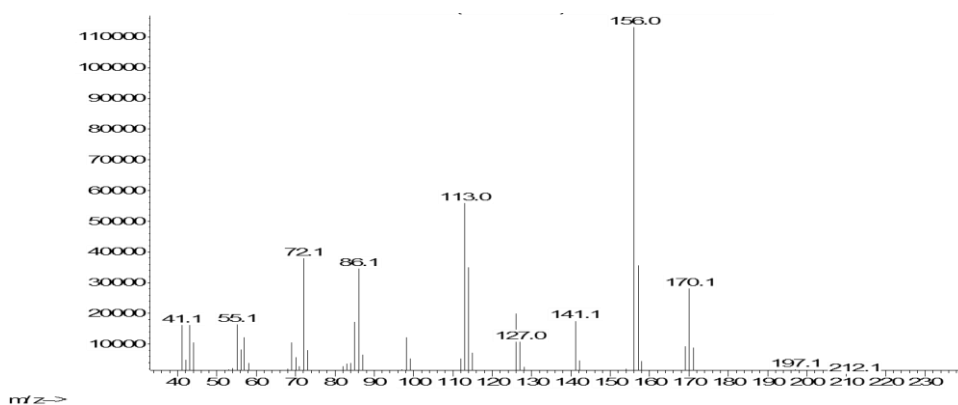
^a Σε CDCl₃. ^b Σε (CD₃)₂SO. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ding et al. (2009b).

3.4. Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.0 mg.

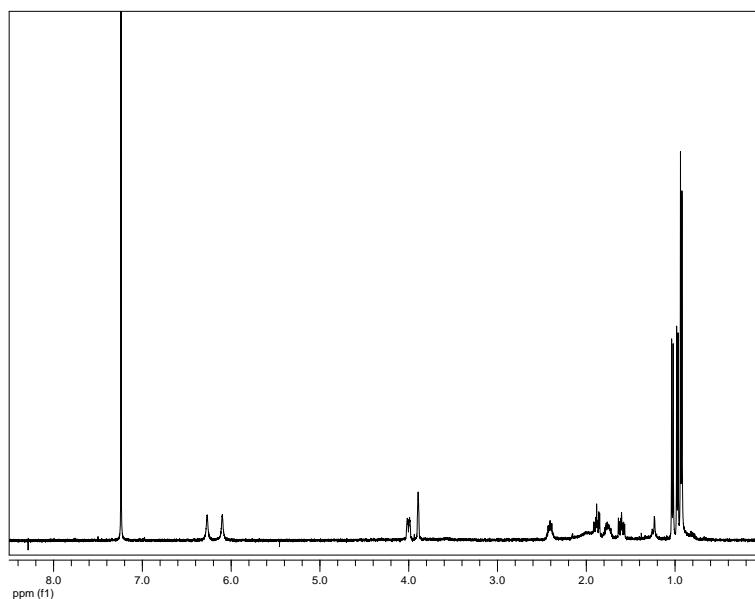


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **4** (Εικ. 31) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 212 και θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 197.



Εικόνα 31. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **4**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **4** (Εικ. 32) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα που παρέπεμπαν σε σκελετό 2,5-δικετοπιπεραζίνης, δηλαδή τα σήματα των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων και τα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων. Ακόμη, παρατηρήθηκαν τρεις διπλές κορυφές σε δ 0.93, 0.97 και 1.03, οι οποίες ολοκλήρωναν για έξι, τρία και τρία πρωτόνια η κάθε μία, αντίστοιχα, και αποδόθηκαν σε πρωτόνια τεσσάρων αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.

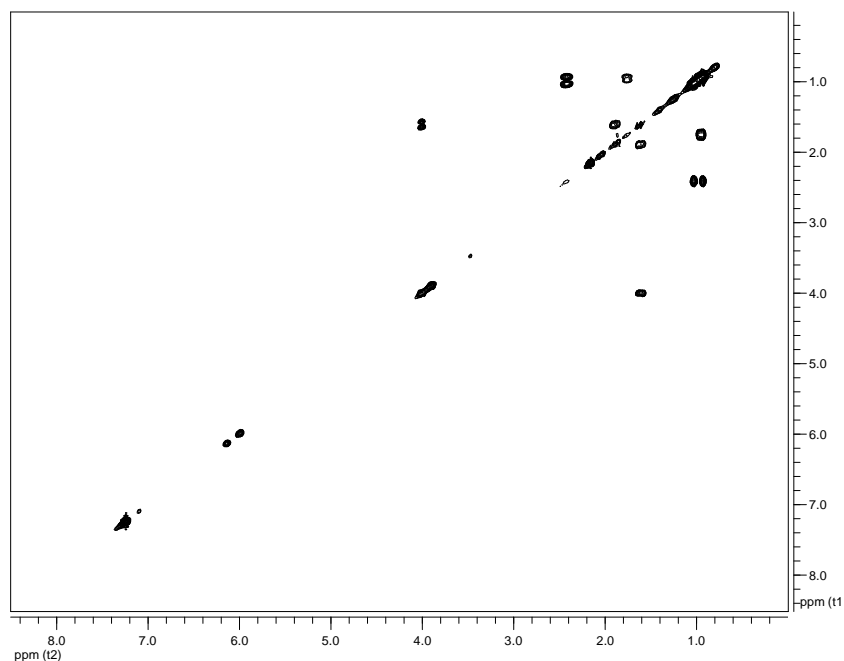


Εικόνα 32. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **4** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **4** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τρεις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι μονοκυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **4** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 33). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 / H-8 / (H₃-10) H₃-9 που παρέπεμπε σε μία λευκίνη και ii) H-3 / H₂-11 / (H₃-13) H₃-12 που παρέπεμπε σε μία βαλίνη.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **4** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(λευκίνη-βαλίνη) [*cis*-cyclo(Leu-Val)] (He et al., 2013), το οποίο έχει δείξει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Vibrio anguillarum*, ενός θαλάσσιου παθογόνου ιδιαίτερα συχνού στις καλλιέργειες διθύρων, οστρακόδερμων και ψαριών (Fdhila et al., 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** παρατίθενται στον Πίνακα 138.



Εικόνα 33. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4 σε CDCl_3 .

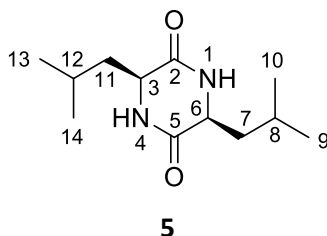
Πίνακας 138. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 4 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	6.27 (br s)	6.68 (br s)
3	3.89 (br s)	3.89 (br s)
4	6.10 (br s)	6.46 (br s)
6	4.00 (br d, 10.1)	4.01 (br d)
7	1.88 (ddd, 13.7, 9.8, 3.7), 1.60 (ddd, 13.7, 10.1, 4.6)	1.88 (m), 1.61 (m)
8	1.76 (m)	1.77 (m)
9	0.93 (d, 6.9)	0.94 (d)
10	0.97 (d, 6.5)	0.97 (d)
11	2.41 (qqd, 7.0, 6.9, 3.4)	2.41 (m)
12	0.93 (d, 6.9)	0.94 (d)
13	1.03 (d, 7.0)	1.04 (d)

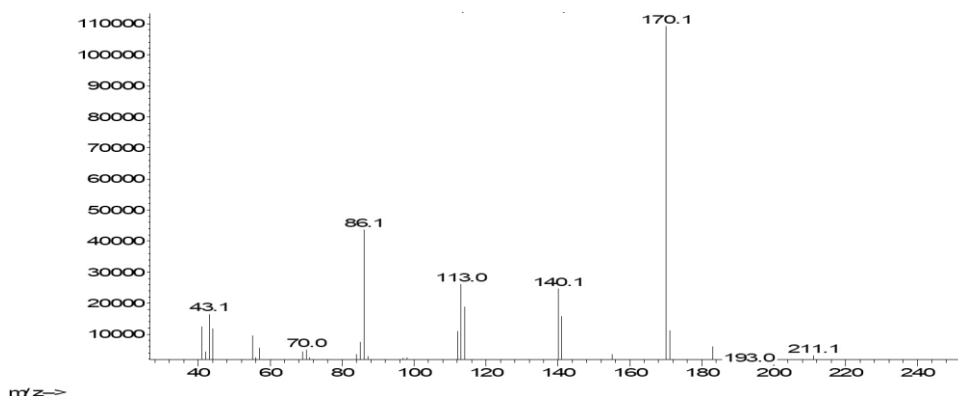
^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από He et al. (2013).

3.5. Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης **5** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 5.4 mg.



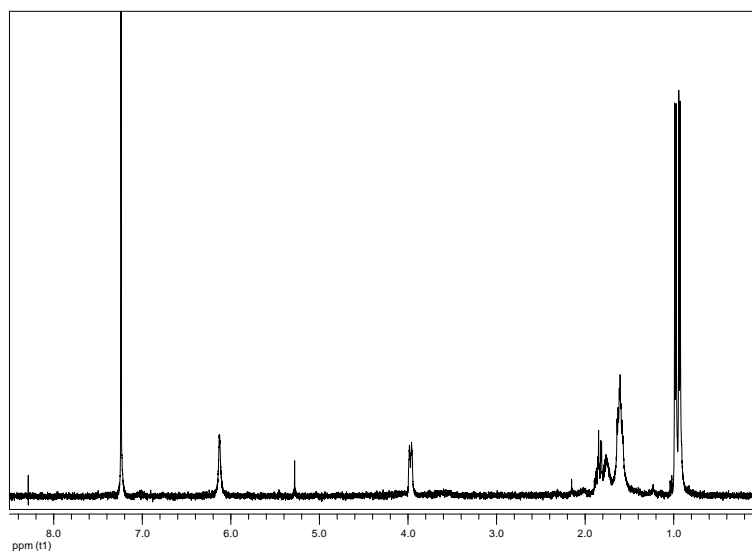
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **5** (Εικ. 34) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 211 και θραύσμα $[M-(CH_3)_2CH]^+$ σε m/z 183.



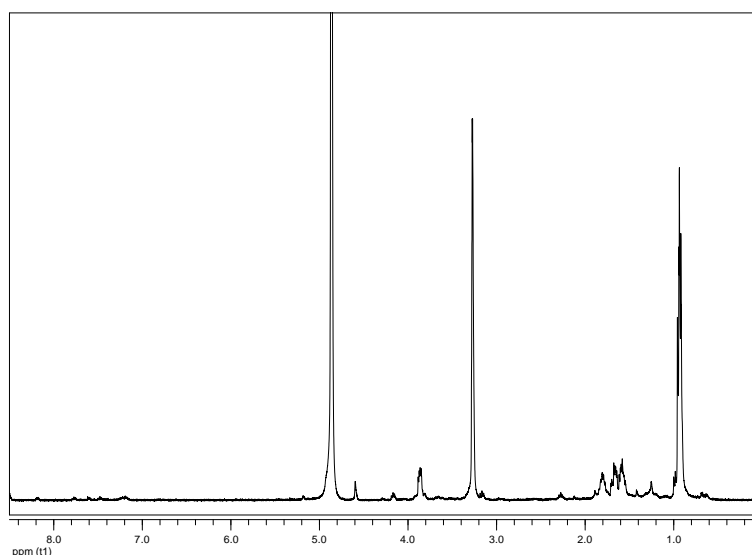
Εικόνα 34. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **5**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **5** (Εικ. 35) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν λιγότερα από τα αναμενόμενα σήματα με βάση το μοριακό βάρος που υποδεικνύεται από το φάσμα μάζας, παραπέμποντας σε συμμετρική δομή μίας 2,5-DKP που έχει προκύψει από τη συμπύκνωση δύο ίδιων αμινοξέων. Οι δύο διπλές κορυφές σε δ 0.93 και 0.98, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία, αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **X** (Εικ. 36) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτά των ευκίνητων πρωτονίων που είχαν ανταλλαχθεί με δευτέριο.



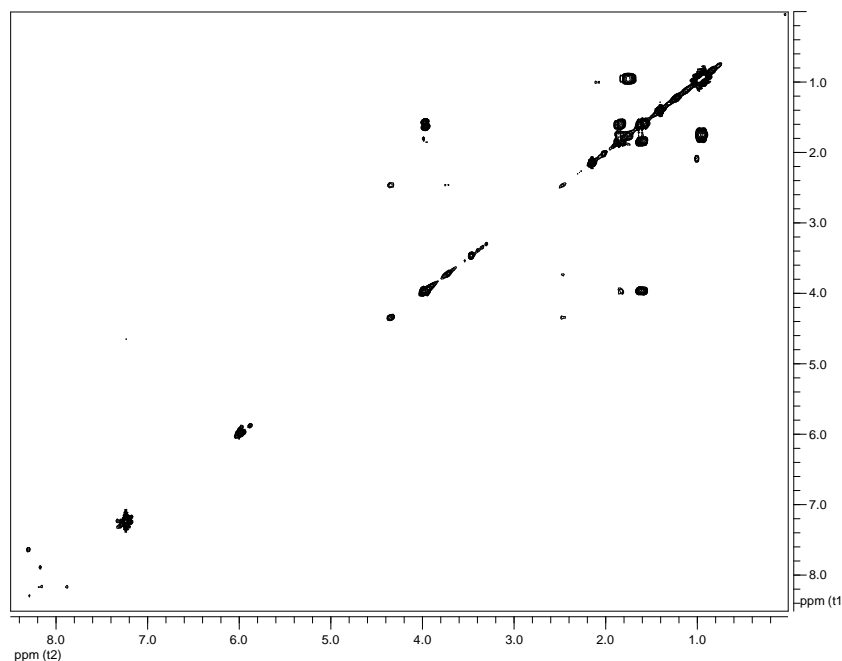
Εικόνα 35. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **5** σε CDCl_3 .



Εικόνα 36. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **5** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **5** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τρεις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι μονοκυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **5** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 37). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY παρέπεμπαν σε μία λευκίνη.



Εικόνα 37. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5 σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 5 με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό συμμετρικό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(λευκίνη-λευκίνη) [*cis*-cyclo(Leu-Leu)] (He et al., 2013), το οποίο έχει παρουσιάσει πολύ ήπια αντιοξειδωτική δράση (Furukawa et al., 2012), ενώ δεν εμφάνισε αντιβακτηριακή δράση έναντι διάφορων βακτηριακών στελεχών (Li et al., 2016a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 5 παρατίθενται στον Πίνακα 139.

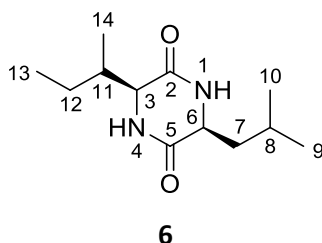
Πίνακας 139. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 5 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	6.13 (br s)		
3	53.0	3.97 (br d, 9.9)	3.87 (m)	3.90 (m)
4	-	6.13 (br s)		
6	53.0	3.97 (br d, 9.9)	3.87 (m)	3.90 (m)
7	42.7	1.85 (ddd, 13.4, 9.6, 3.7), 1.61 (m)	1.68 (m), 1.59 (m)	1.72 (m), 1.62 (m)
8	24.3	1.76 (m)	1.81 (m)	1.85 (m)
9	20.8	0.93 (d, 6.4)	0.93 (d, 6.4)	0.96 (d)
10	23.0	0.98 (d, 6.4)	0.95 (d, 6.7)	0.98 (d)
11	42.7	1.85 (ddd, 13.4, 9.6, 3.7), 1.61 (m)	1.68 (m), 1.59 (m)	1.72 (m), 1.62 (m)
12	24.3	1.76 (m)	1.81 (m)	1.85 (m)
13	20.8	0.93 (d, 6.4)	0.93 (d, 6.4)	0.96 (d)
14	23.0	0.98 (d, 6.4)	0.95 (d, 6.7)	0.98 (d)

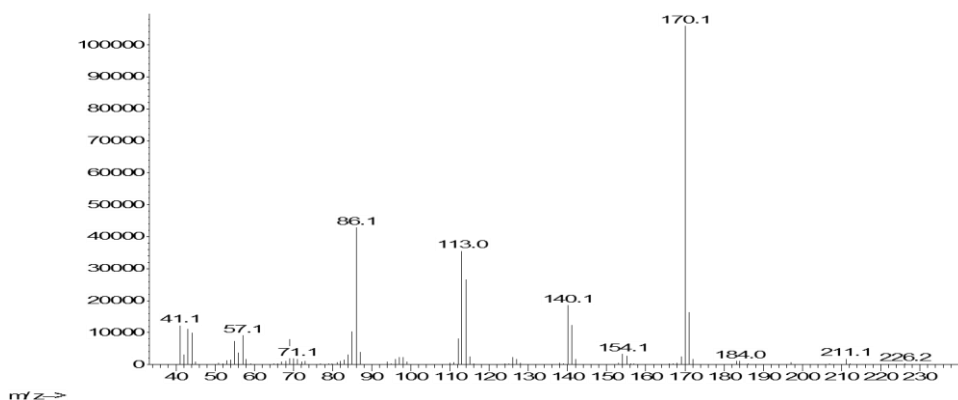
^a Σε CDCl_3 . ^b Σε CD_3OD . ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από He et al. (2013).

3.6. Μεταβολίτης 6

Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.6 mg.

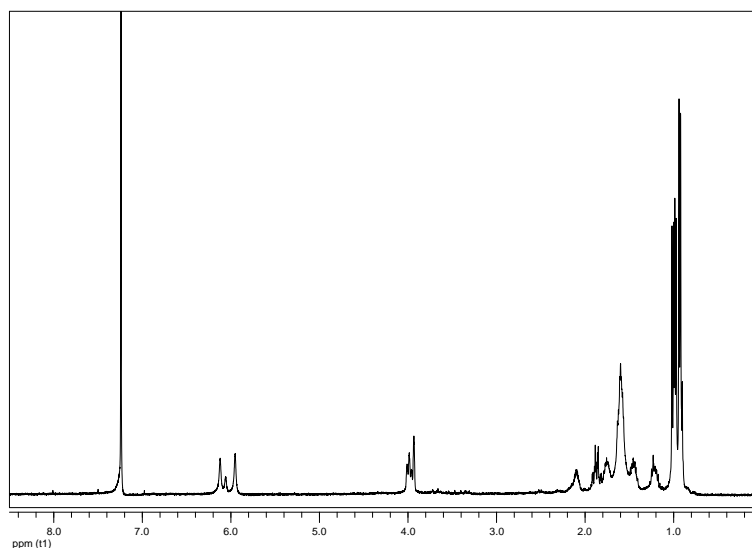


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **6** (Εικ. 38) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 226 και θραύσματα $[M-CH_3]^+$ και $[M-(CH_3)_2CH]^+$ σε m/z 211 και 183, αντίστοιχα.



Εικόνα 38. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **6**.

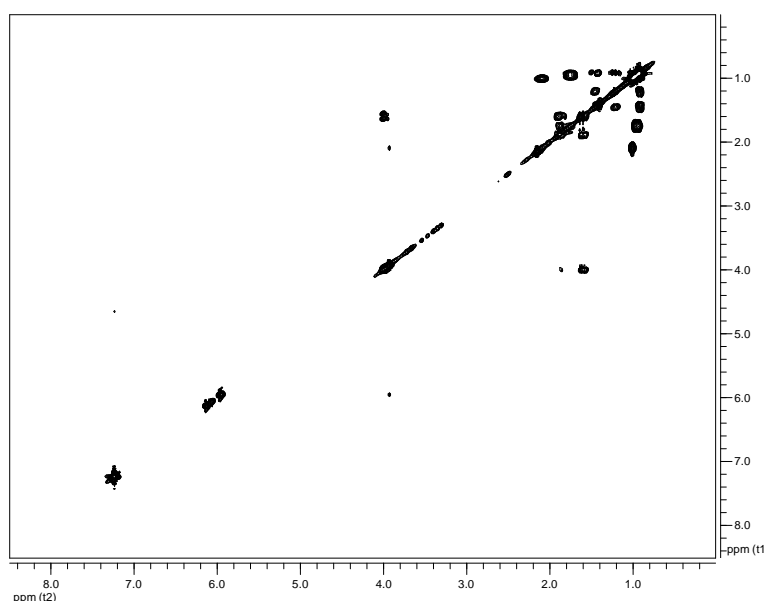
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **6** (Εικ. 39) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα που παρέπεμπαν σε σκελετό 2,5-δικετοπιπεραζίνης, δηλαδή τα σήματα των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων και τα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων. Ακόμη, παρατηρήθηκαν τρεις διπλές κορυφές (δ 0.93, 0.98 και 1.01) και μία τριπλή κορυφή (δ 0.92), οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία, και αποδόθηκαν σε πρωτόνια τριών αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα και ενός αλειφατικού μεθυλίου σε δευτεροταγές άτομο άνθρακα.



Εικόνα 39. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **6** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **5** ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **6** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 40). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 / H-8 / (H₃-10) / H₃-9 που παρέπεμπε σε μία λευκίνη και ii) H-6 / H₂-7 / H-8 (H₃-10) / H₃-9 που παρέπεμπε σε μία ισολευκίνη.



Εικόνα 40. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **6** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **6** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(λευκίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Leu-Ile)] (Laville et al., 2015), το οποίο έχει παρουσιάσει ήπια αντιοξειδωτική δράση (Furukawa et al., 2012), ενώ δεν εμφάνισε αντιβακτηριακή δράση έναντι διάφορων βακτηριακών στελεχών (Li et al., 2016a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** παρατίθενται στον Πίνακα 140.

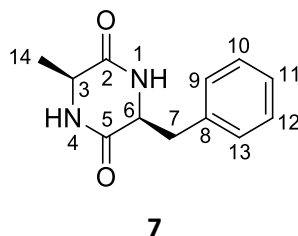
Πίνακας 140. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	5.97 (br s)	5.94 (br s)
3	3.94 (br s)	3.95 (br dd, 5.0, 1.8)
4	5.84 (br s)	5.79 (br s)
6	4.00 (br d, 10.2)	4.01 (ddd, 10.1, 3.7, 1.8)
7	1.89 (ddd, 13.6, 9.9, 3.7), 1.60 (m)	1.92 (ddd, 14.0, 9.9, 3.8), 1.62 (ddd, 14.0, 10.2, 4.9)
8	1.76 (m)	1.78 (m)
9	0.93 (d, 6.7)	0.96 (d, 6.6)
10	0.98 (d, 6.5)	1.00 (d, 6.4)
11	2.10 (m)	2.12 (m)
12	1.45 (m), 1.22 (m)	1.48 (m), 1.26 (m)
13	0.92 (t, 7.5)	0.95 (t, 7.5)
14	1.01 (d, 7.1)	1.03 (d, 7.1)

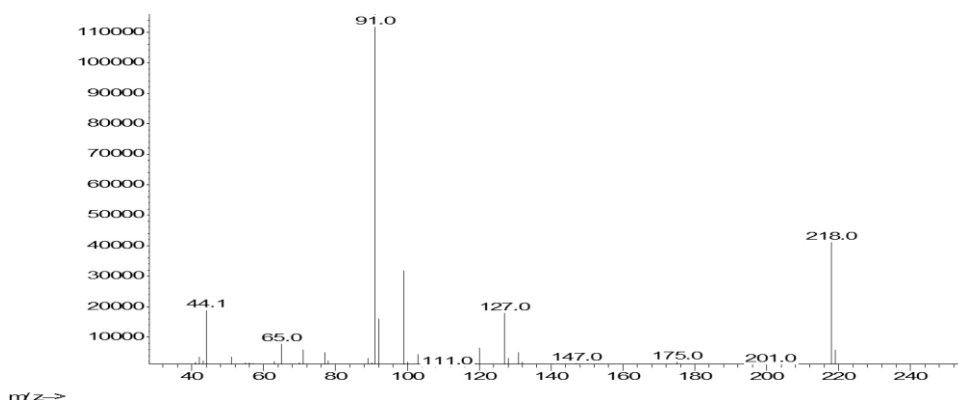
^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Laville et al. (2015).

3.7. Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης **7** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.8 mg.



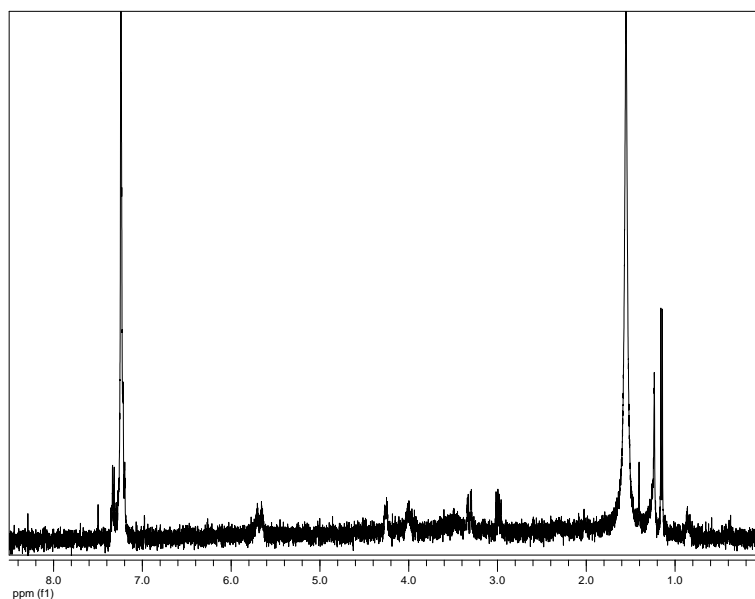
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **7** (Εικ. 41) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 218 και θραύσμα $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 91.



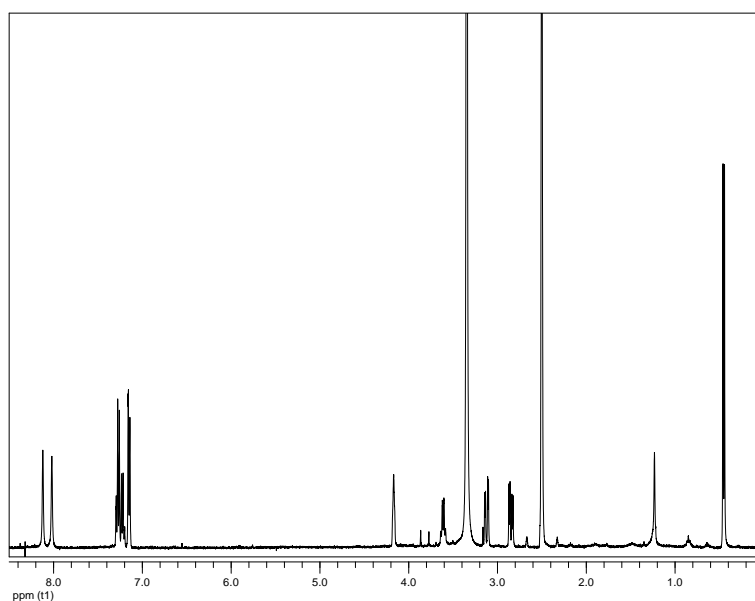
Εικόνα 41. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **7**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **7** (Εικ. 42) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν, εκτός από τα σήματα του 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου, δηλαδή τα σήματα των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων και τα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων, μία διπλή κορυφή σε δ 1.14, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός αλειφατικού μεθυλίου σε τριτοταγές άτομο άνθρακα και τρεις κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.19-7.36), οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **7** (Εικ. 43) σε $(CD_3)_2SO$ παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα.



Εικόνα 42. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **7** σε CDCl_3 .

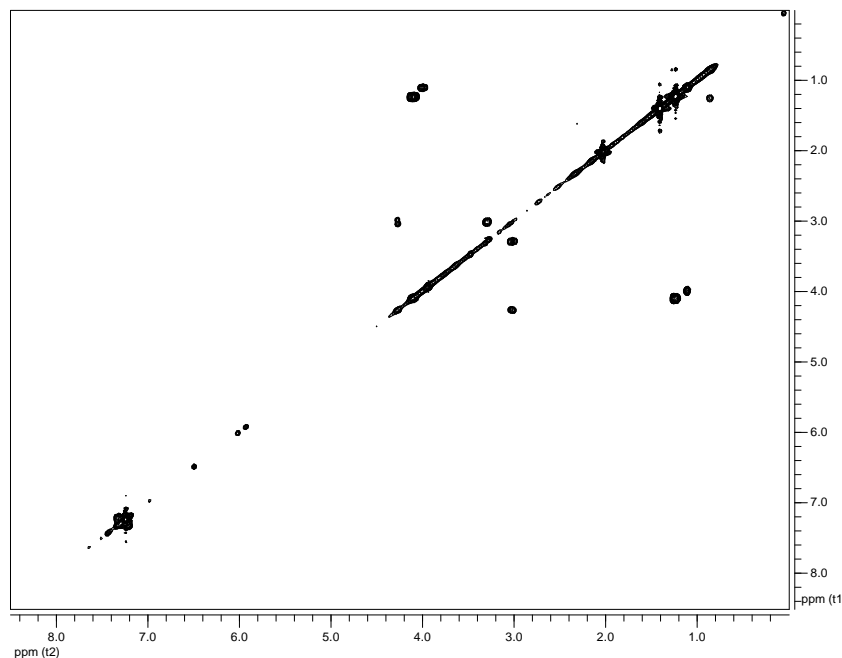


Εικόνα 43. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **7** σε $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **7** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο και τα δύο καρβονύλια ως έξι από τους επτά βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δicyclic.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **7** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 44). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τρία απομονωμένα

spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 και ii) έναν μονούποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-9 έως H-13) που παρέπεμπαν σε μία φαινυλαλανίνη και iii) H-3/H₃-12 που παρέπεμπαν σε μία αλανίνη.



Εικόνα 44. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **7** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **7** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-αλανίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Ala)] (Stark & Hofmann, 2005), το οποίο έχει επιδείξει αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι του χλωροφύκου *U. pertusa* και του διατόμου *N. annexa* (Cho et al., 2012a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** παρατίθενται στον Πίνακα 141.

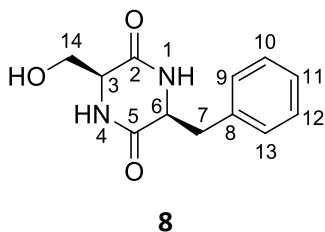
Πίνακας 141. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.73 (br s)	8.12 (br s)	8.06 (s)
3	50.7	4.00 (q, 7.0)	3.61 (q, 7.0)	3.63 (m)
4	-	5.79 (br s)	8.02 (br s)	7.98 (s)
6	56.2	4.26 (br d, 8.2)	4.17 (br s)	4.17 (m)
7	39.8	3.31 (dd, 14.0, 3.6), 3.00 (dd, 14.0, 8.2)	3.12 (dd, 13.4, 3.6), 2.85 (dd, 13.4, 4.9)	3.12 (dd, 13.4, 3.8), 2.87 (dd, 13.4, 5.0)
9	129.6	7.21 (br d, 7.6)	7.15 (br d, 7.3)	7.22 (m)
10	128.8	7.32 (br t, 7.6)	7.28 (br t, 7.3)	7.22 (m)
11	127.5	7.28 (br t, 7.6)	7.23 (br t, 7.3)	7.22 (m)
12	128.8	7.32 (br t, 7.6)	7.28 (br t, 7.3)	7.22 (m)
13	129.6	7.21 (br d, 7.6)	7.15 (br d, 7.3)	7.22 (m)
14	19.8	1.14 (d, 7.0)	0.45 (d, 7.0)	0.49 (d, 7.0)

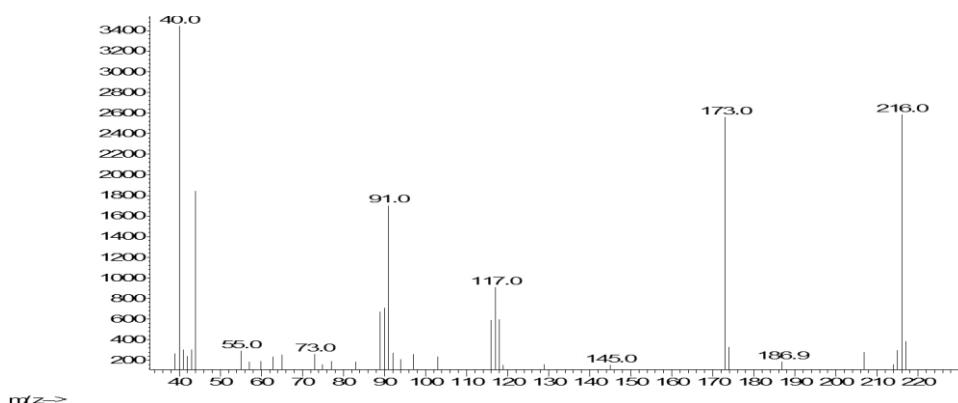
^a Σε CDCl₃. ^b Σε (CD₃)₂SO. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Stark & Hofmann (2005).

3.8. Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.5 mg.



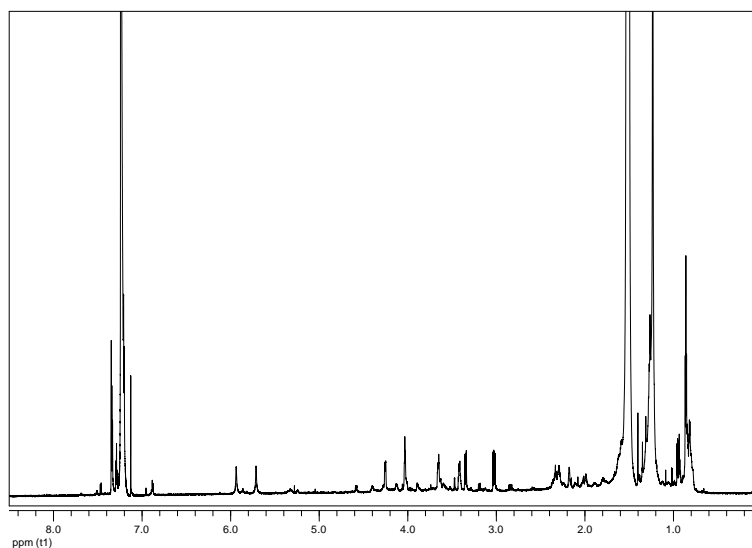
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **8** (Εικ. 45) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσματα $[M-H_2O]^+$ και $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 216 και 91, αντίστοιχα.



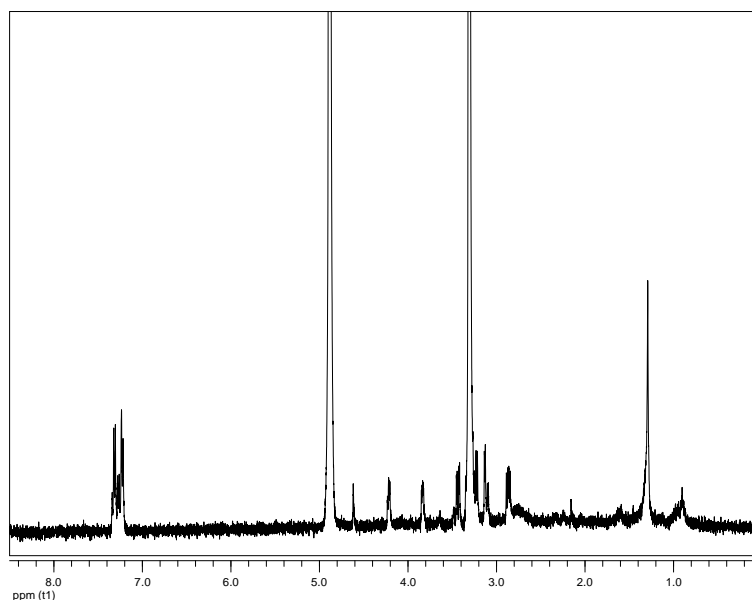
Εικόνα 45. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **8**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **8** (Εικ. 46) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με αυτά του μεταβολίτη **7**. Η σημαντικότερη διαφορά εντοπίστηκε στην αντικατάσταση του μεθυλίου της αλανίνης από ένα αποθωρακισμένο μεθυλένιο σε δ 3.65 και 3.42 πιθανώς λόγω γειτνίασης με ετεροάτομο.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **8** σε CD_3OD (Εικ. 47) και σε $(CD_3)_2SO$ (Εικ. 48) παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτά των ευκίνητων πρωτονίων που είχαν ανταλλαχθεί με δευτέριο στο φάσμα σε CD_3OD .

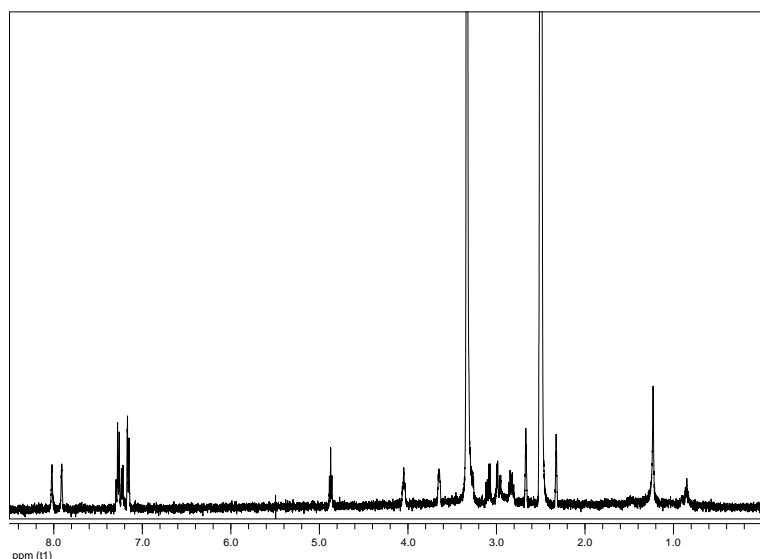


Εικόνα 46. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** σε CDCl_3 .



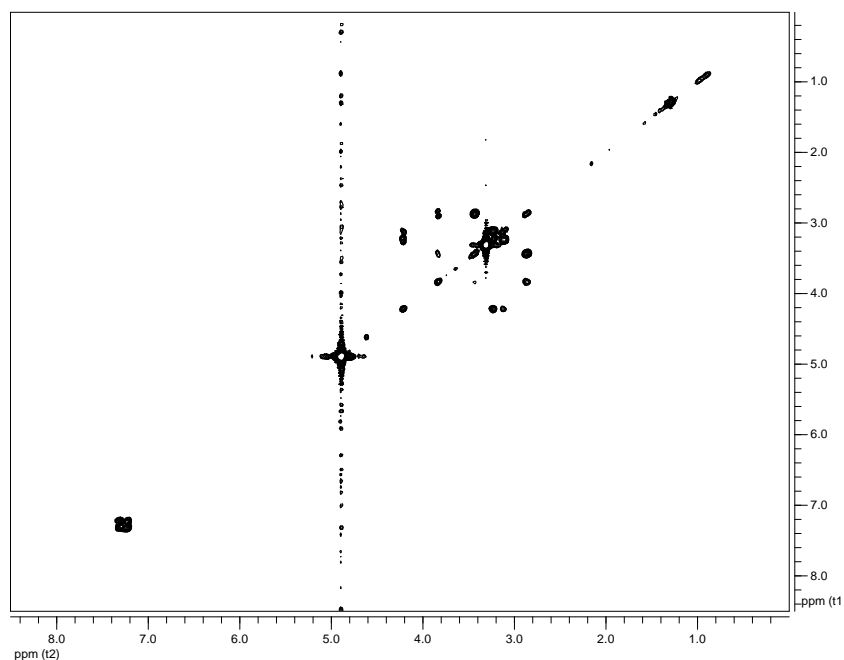
Εικόνα 47. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **8** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο και τα δύο καρβονύλια ως έξι από τους επτά βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.



Εικόνα 48. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** σε $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **8** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 49). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία φαινυλαλανίνη και σε μία σερίνη ($\text{H}-3 / \text{H}_2-14$).



Εικόνα 49. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **8** σε CD_3OD .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **8** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-σερίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Ser)] (Isaka et al., 2005), για το οποίο δεν υπάρχουν αναφορές ως προς την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** παρατίθενται στον Πίνακα 142.

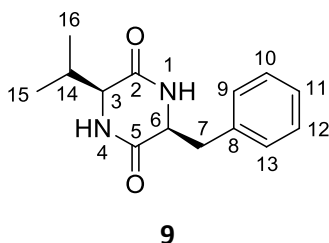
Πίνακας 142. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	δ_H^c	$\delta_H^{c,d}$
1	-	5.94 (br s)		8.02 (s)	8.02 (d, 2.1)
2	n.d. ^e	-	-	-	-
3	55.8	4.03 (dd, 5.2, 4.6)	3.84 (m)	3.65 (m)	3.65 (m)
4	-	5.71 (br s)		7.91 (s)	7.91 (d, 1.8)
5	n.d. ^e	-	-	-	-
6	55.8	4.25 (dd, 8.9, 3.6)	4.21 (m)	4.05 (t, 5.2)	4.05 (m)
7	39.8	3.35 (dd, 14.0, 3.6), 3.02 (dd, 14.0, 8.9)	3.24 (dd, 13.5, 6.7), 3.11 (dd, 13.5, 4.2)	3.09 (dd, 13.5, 5.2), 2.97 (dd, 13.5, 5.2)	3.09 (dd, 13.5, 6.1), 2.98 (dd, 13.5, 4.9)
8	134.9	-	-	-	-
9	129.3	7.20 (br d, 7.4)	7.23 (br d, 7.2)	7.16 (br d, 7.5)	7.17 (dd, 7.0, 1.4)
10	128.9	7.34 (br t, 7.4)	7.32 (br t, 7.2)	7.28 (br t, 7.5)	7.28 (dd, 7.5, 7.0)
11	127.4	7.29 (br t, 7.4)	7.27 (br t, 7.2)	7.23 (br t, 7.5)	7.22 (dt, 7.3, 1.3)
12	128.9	7.34 (br t, 7.4)	7.32 (br t, 7.2)	7.28 (br t, 7.5)	7.28 (dd, 7.5, 7.0)
13	129.3	7.20 (br d, 7.4)	7.23 (br d, 7.2)	7.16 (br d, 7.5)	7.17 (dd, 7.0, 1.4)
14	63.7	3.65 (dd, 11.0, 4.6), 3.42 (dd, 11.0, 5.2)	3.44 (dd, 11.1, 3.3), 2.86 (dd, 11.1, 6.2)	3.30 (m), 2.83 (m)	3.28 (ddd, 10.7, 5.2, 3.5), 2.83 (ddd, 10.8, 5.9, 5.5)
OH	-			4.87 (t, 5.8)	4.88 (t, 5.6)

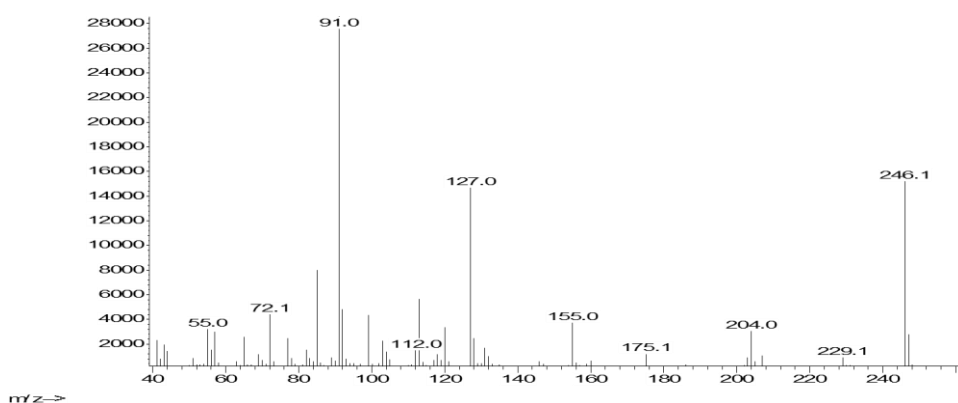
^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Σε (CD₃)₂SO. ^d Βιβλιογραφικά δεδομένα από Isaka et al. (2005). ^e Δεν ανιχνεύθηκε.

3.9. Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 8.0 mg.



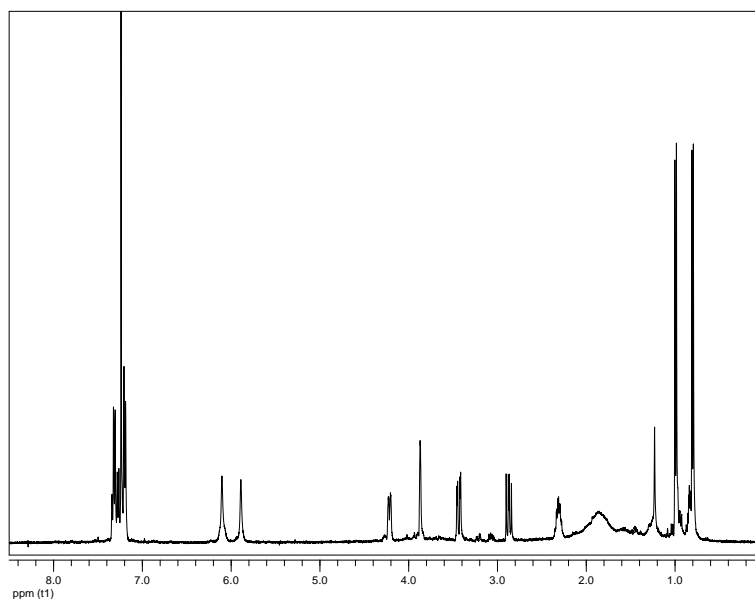
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **9** (Εικ. 50) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 246 και θραύσμα $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 91.



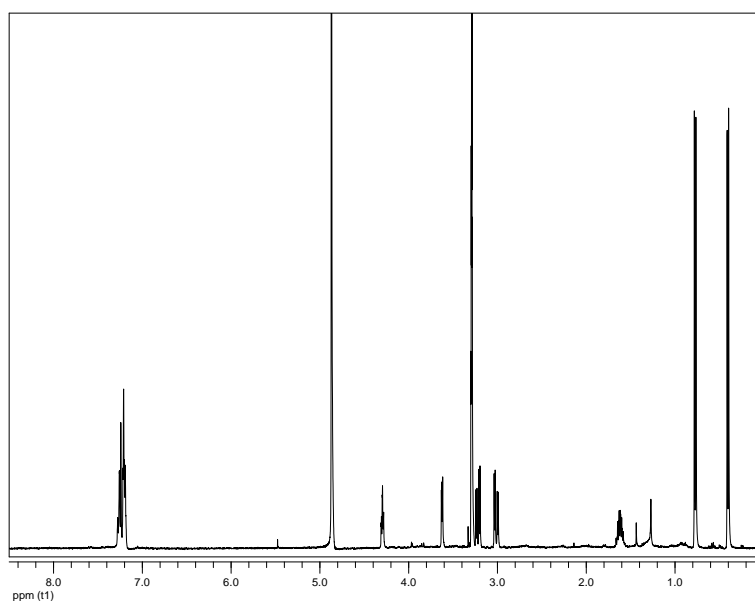
Εικόνα 50. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 51) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα ενός 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου και ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Ακόμη, παρατηρήθηκαν δύο διπλές κορυφές σε δ 0.80 και 0.99, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 52) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτά των ευκίνητων πρωτονίων που είχαν ανταλλαχθεί με δευτέριο.



Εικόνα 51. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl_3 .

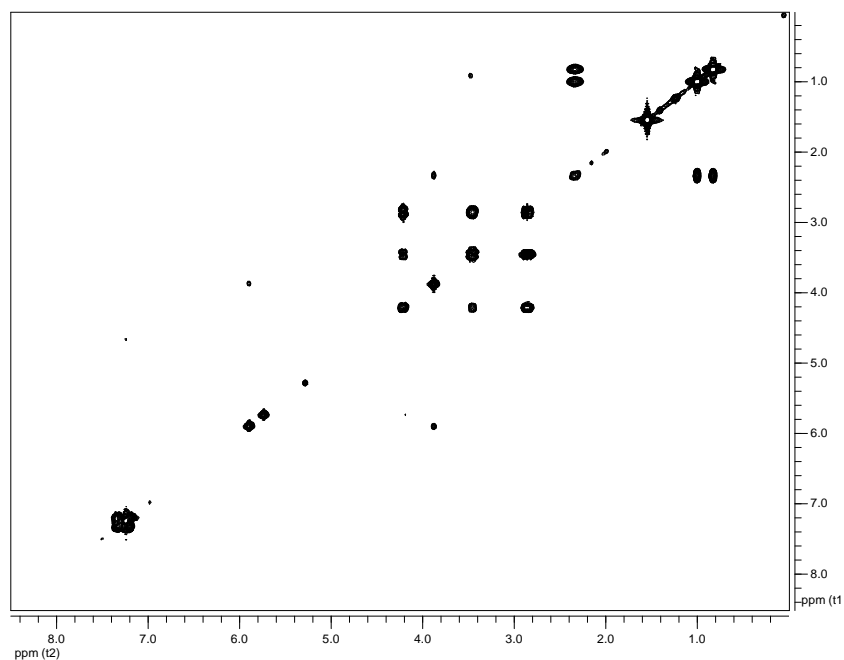


Εικόνα 52. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **9** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο και τα δύο καρβονύλια ως έξι από τους επτά βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δicyclic.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **9** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 53). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY υπέδειξαν την ύπαρξη μίας

φαινυλαλανίνης και μίας βαλίνης (H-3 / H₂-14 / (H₃-16) H₃-15).



Εικόνα 53. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **9** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-βαλίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Val)] (Laville et al., 2015), το οποίο έχει εμφανίσει αντιπαρασιτική δράση έναντι του *Plasmodium berghei* (Pérez-Picaso et al., 2012). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** παρατίθενται στον Πίνακα 143.

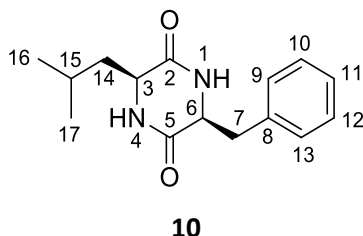
Πίνακας 143. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	6.10 (br s)		
3	60.4	3.87 (br s)	3.62 (dd, 4.6, 1.6)	3.66 (dd, 4.4, 1.6)
4	-	5.89 (br s)		
6	56.5	4.22 (br d, 9.7)	4.30 (dt, 5.0, 1.6)	4.34 (dt, 4.9, 1.9)
7	41.0	3.44 (dd, 13.8, 3.5), 2.87 (dd, 13.8, 9.7)	3.22 (dd, 13.8, 5.0), 3.01 (dd, 13.8, 4.7)	3.23 (dd, 13.9, 5.4), 3.05 (dd, 13.8, 4.7)
9	129.3	7.20 (br d, 7.1)	7.20 (d, 7.1)	7.22 (d, 6.8)
10	129.3	7.33 (br t, 7.1)	7.26 (t, 7.1)	7.28 (t, 7.2)
11	129.9	7.26 (br t, 7.1)	7.21 (t, 7.0)	7.23 (d, 7.2)
12	129.3	7.33 (br t, 7.1)	7.26 (t, 7.1)	7.28 (t, 7.2)
13	129.3	7.20 (br d, 7.1)	7.20 (d, 7.1)	7.22 (d, 6.8)
14	31.6	2.32 (qqd, 7.0, 7.0, 3.2)	1.62 (qqd, 7.0, 7.0, 4.6)	1.60 (m)
15	16.4	0.80 (d, 7.0)	0.77 (d, 7.0)	0.79 (d, 7.1)
16	19.3	0.99 (d, 7.0)	0.40 (d, 7.0)	0.49 (d, 6.9)

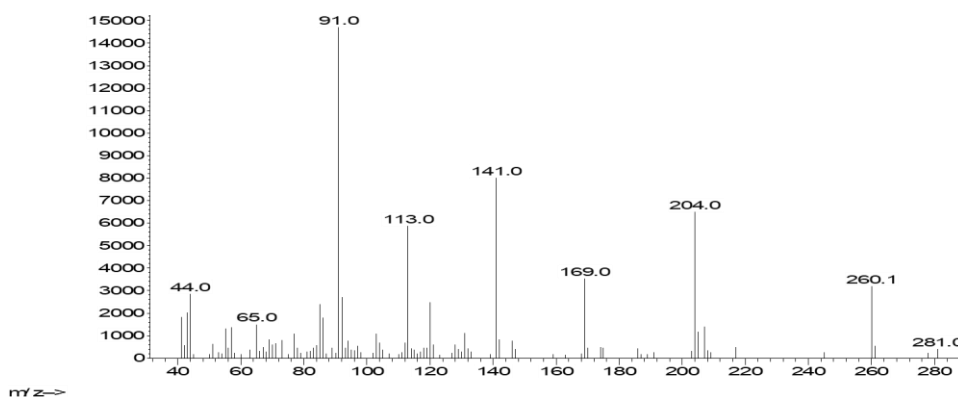
^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Laville et al. (2015).

3.10. Μεταβολίτης 10

Ο μεταβολίτης **10** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 4.4 mg.



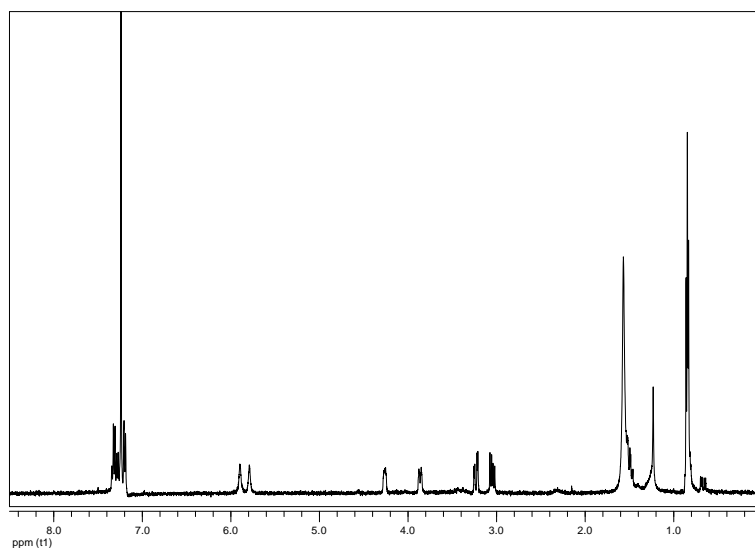
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **10** (Εικ. 54) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 260 και θραύσματα $[M-(C_4H_8)]^+$ και $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 204 και 91, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την παρουσία ενός επιπλέον μεθυλενίου σε σύγκριση με τη δομή του μεταβολίτη **9**.



Εικόνα 54. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **10**.

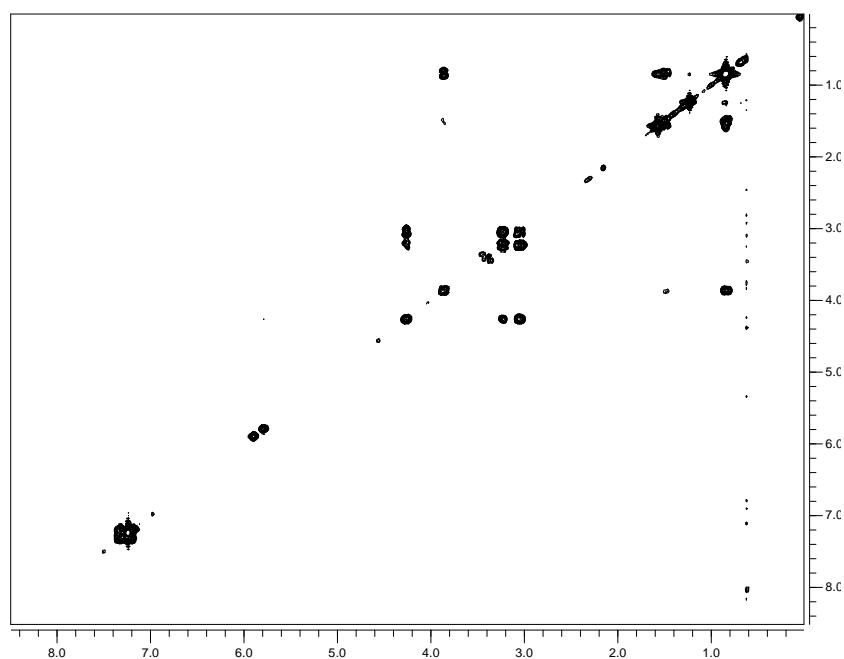
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **10** (Εικ. 55) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **9**, σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **10** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{20}N_2O_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο και τα δύο καρβονύλια ως έξι από τους επτά βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δicycλικό.



Εικόνα 55. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **10** σε CDCl_3 .

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **10** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συζεύξεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 56) και καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα που υπέδειξαν την παρουσία μίας φαινυλαλανίνης και μίας λευκίνης.



Εικόνα 56. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **10** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **10** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό

φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-λευκίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Leu)] (Tullberg et al., 2006), το οποίο έχει εμφανίσει ήπια αντιβακτηριακή δράση έναντι στελεχών των βακτηρίων *Bacillus subtilis* και *Escherichia coli* (Cabrera et al., 2006). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** παρατίθενται στον Πίνακα 144.

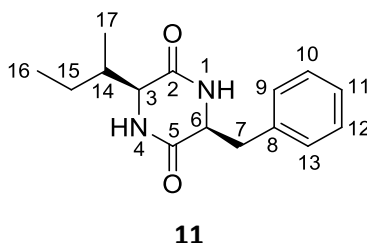
Πίνακας 144. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	5.79 (br s)	
3	3.86 (br d, 10.2)	3.90-3.85 (m)
4	5.90 (br s)	
6	4.26 (dd, 7.9, 3.9)	4.28-4.24 (m)
7	3.23 (dd, 13.8, 3.9), 3.05 (dd, 13.8, 7.9)	3.28-3.22 (m), 3.09-3.02 (m)
9	7.20 (br d, 7.3)	7.18-7.36 (m)
10	7.33 (br t, 7.3)	7.18-7.36 (m)
11	7.27 (br t, 7.3)	7.18-7.36 (m)
12	7.33 (br t, 7.3)	7.18-7.36 (m)
13	7.20 (br d, 7.3)	7.18-7.36 (m)
14	1.57 (m), 0.82 (m)	1.54 (app s)
15	1.49 (m)	1.24 (app s)
16	0.84 (d, 6.8)	0.86 (app t, 6.2)
17	0.85 (d, 6.8)	0.86 (app t, 6.2)

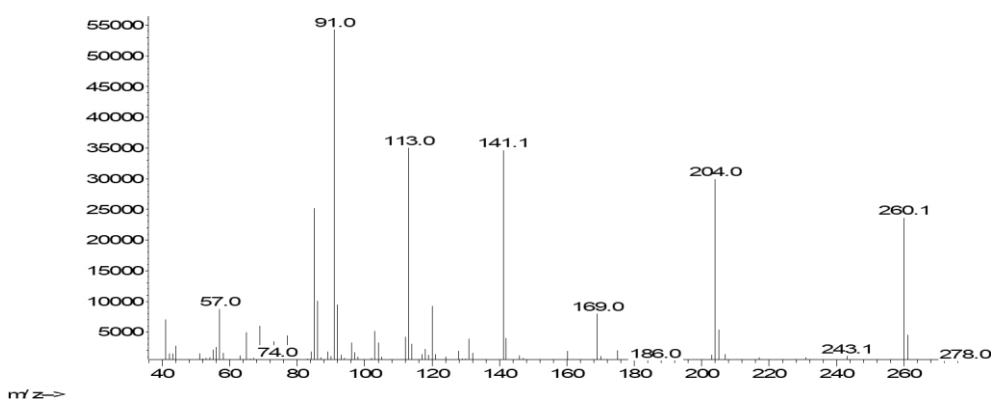
^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Tullberg et al. (2006).

3.11. Μεταβολίτης 11

Ο μεταβολίτης **11** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.0 mg.



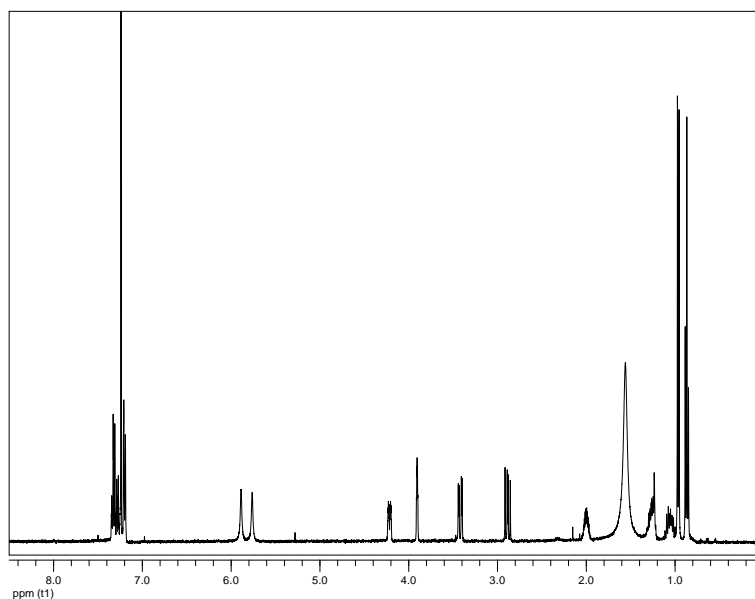
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **11** (Εικ. 57) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 260 και θραύσματα $[C_{11}H_{12}N_2O_2]^+$ και $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 204 και 91, αντίστοιχα.



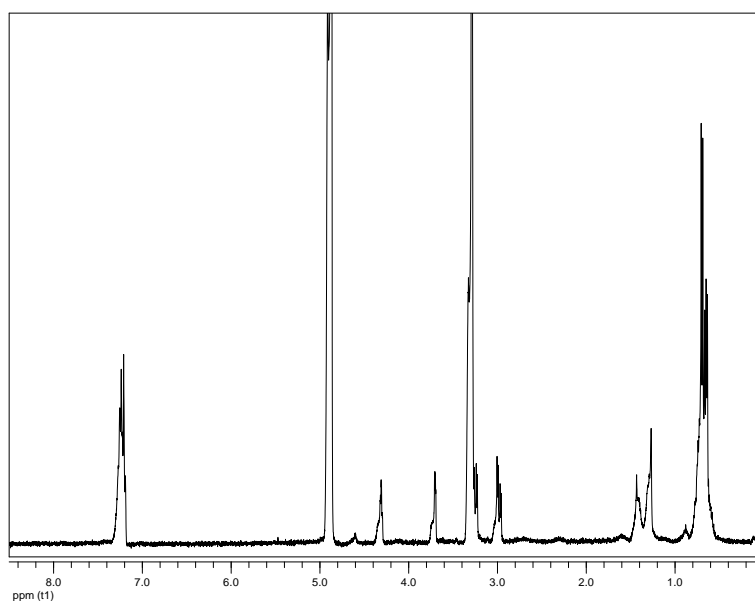
Εικόνα 57. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **11**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **11** (Εικ. 58) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **10**, με σημαντικότερη διαφορά την πολλαπλότητα μίας εκ των δύο κορυφών των μεθυλίων που εμφανίστηκε ως τριπλή σε δ 0.87 αντί για διπλή.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **11** (Εικ. 59) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτά των ευκίνητων πρωτονίων που είχαν ανταλλαχθεί με δευτέριο.



Εικόνα 58. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11** σε CDCl_3 .

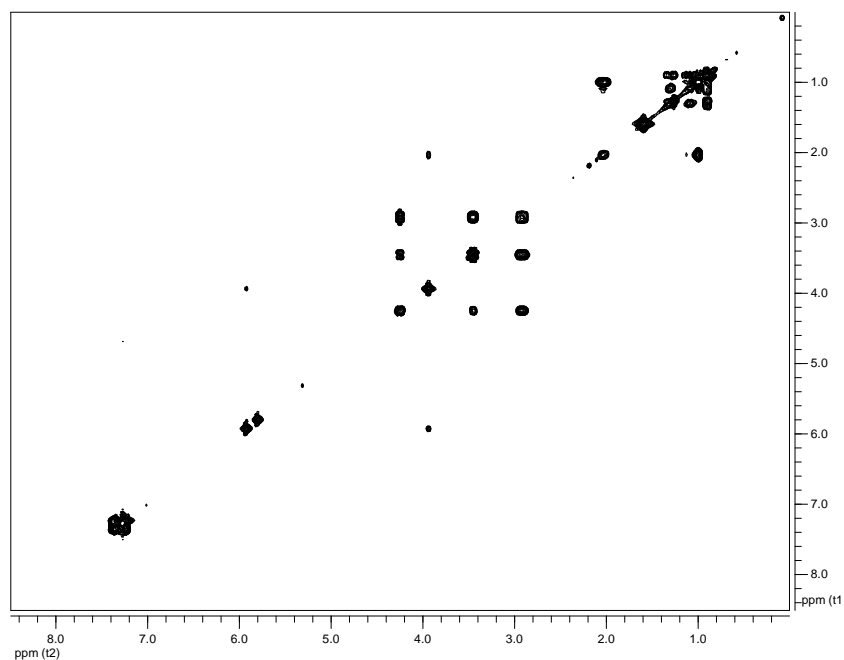


Εικόνα 59. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **11** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **11** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **10** ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **11** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 60). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα που υπέδειξαν την παρουσία μίας φαινυλαλανίνης και μίας ισολευκίνης,

επιβεβαιώνοντας την αντικατάσταση της λευκίνης από μία ισολευκίνη.



Εικόνα 60. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **11** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **11** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Ile)] (Laville et al., 2015), για το οποίο δεν υπάρχουν αναφορές ως προς την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** παρατίθενται στον Πίνακα 145.

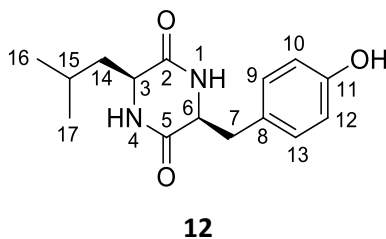
Πίνακας 145. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.78 (br s)		
3	59.8	3.91 (br s)	3.70 (m)	3.73 (dd, 4.0, 1.6)
4	-	5.90 (br s)		
6	55.9	4.22 (br d, 9.6)	4.31 (m)	4.33 (dt, 5.0, 1.7)
7	40.2	3.42 (dd, 13.8, 3.5), 2.89 (dd, 13.8, 9.6)	3.25 (dd, 13.9, 5.1), 2.98 (dd, 13.9, 4.7)	3.26 (dd, 14.0, 3.8), 3.01 (dd, 13.8, 4.7)
9	129.3	7.20 (br d, 7.1)	7.32-7.18 (m)	7.22 (d, 6.9)
10	128.9	7.33 (br t, 7.1)	7.32-7.18 (m)	7.28 (t, 6.8)
11	127.3	7.27 (br t, 7.1)	7.32-7.18 (m)	7.25 (d, 7.0)
12	128.9	7.33 (br t, 7.1)	7.32-7.18 (m)	7.28 (t, 6.8)
13	129.3	7.20 (br d, 7.1)	7.32-7.18 (m)	7.22 (d, 6.9)
14	37.9	2.00 (m)	1.41 (m)	1.43 (br m)
15	23.3	1.26 (m), 1.05 (m)	0.78 (m), 0.64 (m)	0.80 (m), 0.66 (m)
16	11.3	0.87 (t, 7.4)	0.65 (t, 6.7)	0.68 (t, 6.6)
17	15.1	0.96 (d, 7.1)	0.70 (d, 7.0)	0.73 (d, 7.0)

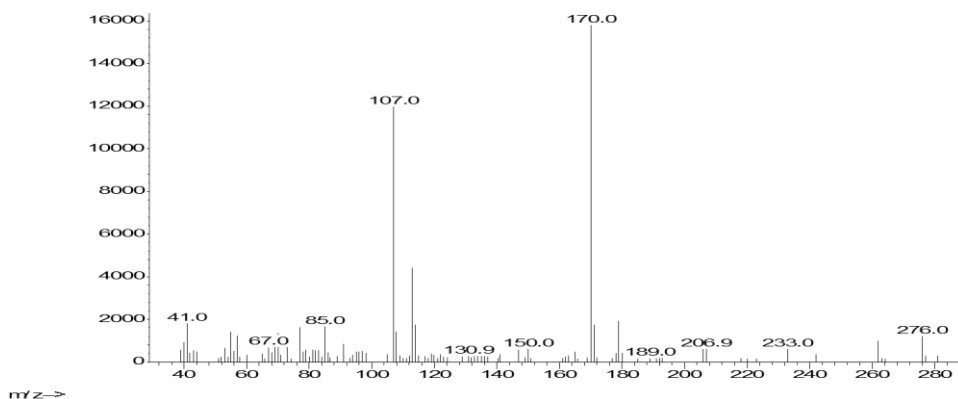
^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Laville et al. (2015).

3.12. Μεταβολίτης 12

Ο μεταβολίτης **12** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.7 mg.

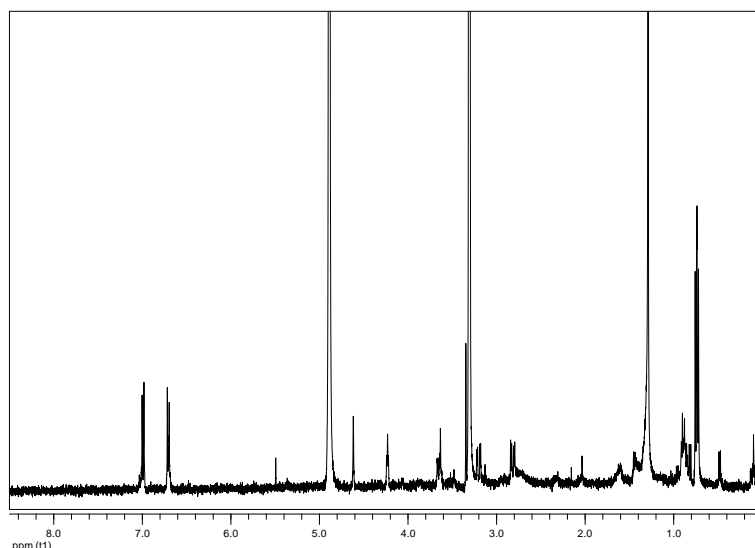


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **12** (Εικ. 61) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 276.



Εικόνα 61. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **12**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **12** (Εικ. 62) σε CD_3OD εμφανή ήταν τα σήματα του 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου. Η διαφορά του από τον μεταβολίτη **10** εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίζονταν δύο διπλές κορυφές (δ 6.71 και 6.99), οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

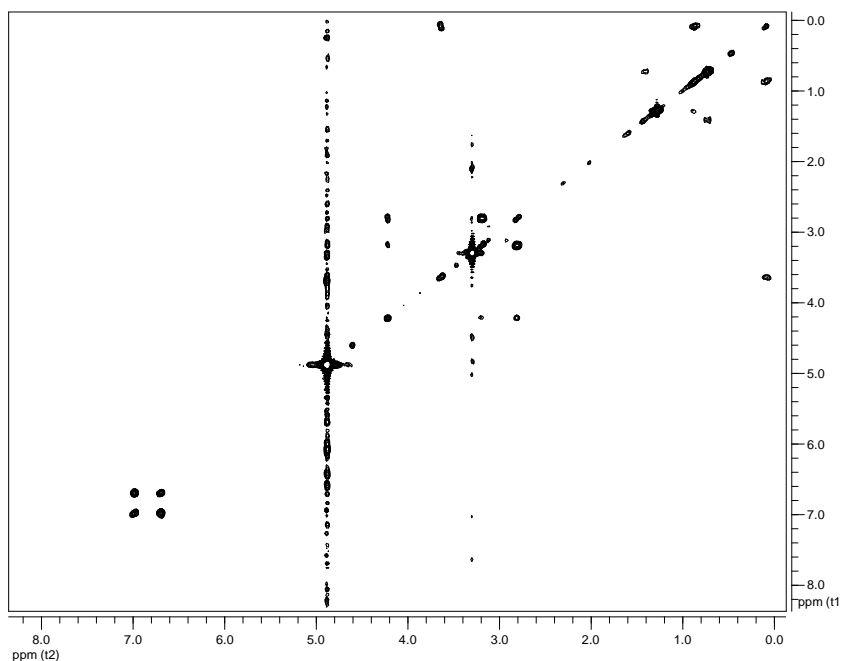


Εικόνα 62. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **12** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **12** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο και τα δύο καρβονύλια ως έξι από τους επτά βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να δικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **12** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συζεύξεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 63) και καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 και ii) έναν *para*-υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο που παρέπεμπαν σε μία τυροσίνη και iii) H-3 / H₂-14 / H-15 / (H₃-17) H₃-16 που παρέπεμπε σε μία λευκίνη.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **12** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(τυροσίνη-λευκίνη) [*cis*-cyclo(Tyr-Leu)] (Tullberg et al., 2006), το οποίο έχει δείξει *in vitro* ευεργετική δράση στη μεταίσχαιμική δυσλειτουργία του μυοκαρδίου (Kumiko et al., 2011). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **12** παρατίθενται στον Πίνακα 146.



Εικόνα 63. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **12** σε CD₃OD.

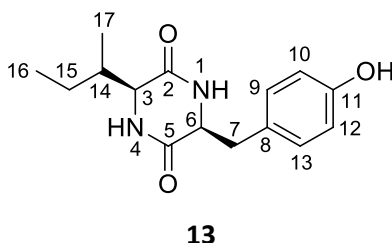
Πίνακας 146. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **12** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_H^a	$\delta_H^{a,b}$
3	3.65 (dd, 10.0, 4.3)	3.65 (dd, 10.0, 4.2)
6	4.23 (dd, 4.6, 3.6)	4.22 (t, 4.0)
7	3.20 (dd, 13.8, 3.6), 2.82 (dd, 13.8, 4.6)	3.19 (dd, 13.5, 3.7), 2.81 (dd, 13.5, 3.7)
8	-	-
9	6.99 (d, 8.5)	6.99 (d, 8.4)
10	6.71 (d, 8.5)	6.70 (d, 8.4)
11	-	-
12	6.71 (d, 8.5)	6.70 (d, 8.4)
13	6.99 (d, 8.5)	6.99 (d, 8.4)
14	0.89 (m), 0.10 (ddd, 14.7, 10.0, 4.9)	0.87 (ddd, 13.8, 9.6, 4.4), 0.10 (ddd, 13.8, 9.6, 4.4)
15	1.44 (m)	1.47-1.36 (m)
16	0.73 (d, 6.7)	0.73 (app t, 8.1)
17	0.75 (d, 6.7)	0.73 (app t, 8.1)

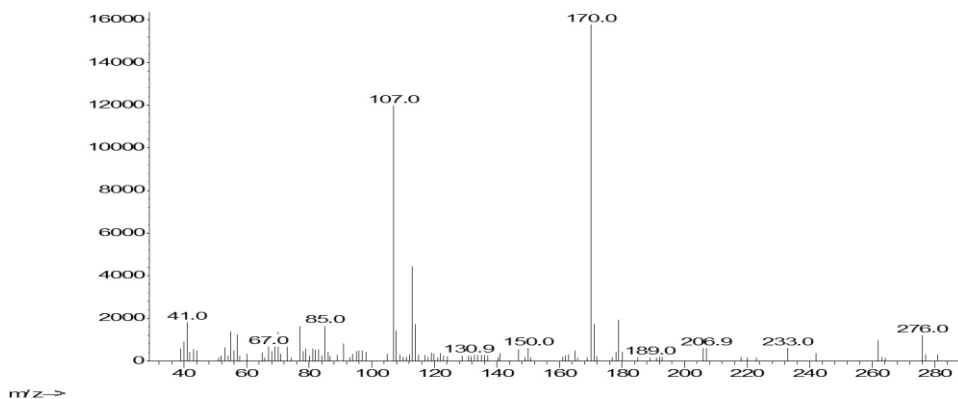
^a Σε CD₃OD. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Tullberg et al. (2006).

3.13. Μεταβολίτης 13

Ο μεταβολίτης **13** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.2 mg.

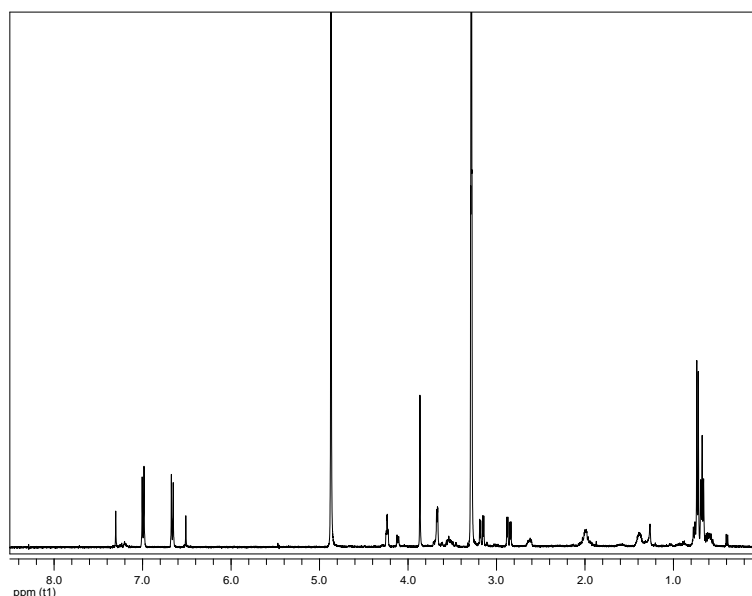


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **13** (Εικ. 64) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 276.



Εικόνα 64. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **13**.

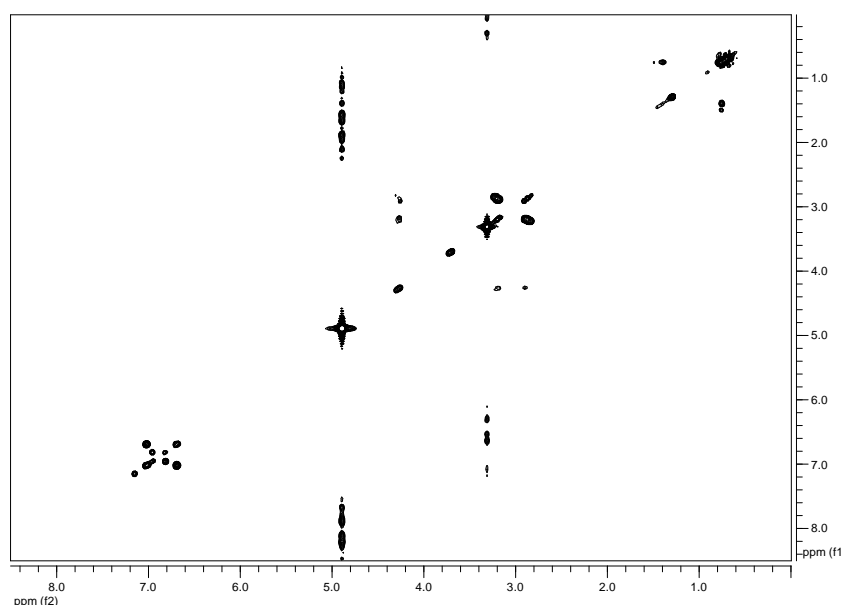
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **13** (Εικ. 65) σε CD_3OD εμφανή ήταν τα σήματα του 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου. Η διαφορά του από τον μεταβολίτη **11** εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίζονταν δύο διπλές κορυφές (δ 6.66 και 6.99) και, όπως στην περίπτωση του μεταβολίτη **12**, αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 65. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **13** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **13** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **12** ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **13** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συζεύξεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 66) και καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία τυροσίνη και σε μία ισολευκίνη, επιβεβαιώνοντας την αντικατάσταση της λευκίνης από μία ισολευκίνη.



Εικόνα 66. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **13** σε CD_3OD .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **13** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(τυροσίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Tyr-Ile)] (Laville et al., 2015), για το οποίο δεν υπάρχουν αναφορές ως προς την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **13** παρατίθενται στον Πίνακα 147.

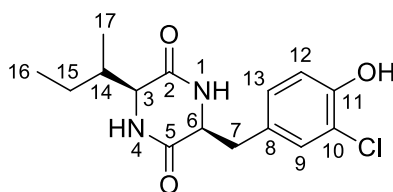
Πίνακας 147. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **13** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.65 (br s)		
2	166.1	-	-	-
3	59.9	3.90 (br s)	3.68 (dd, 4.2, 1.6)	3.70 (dd, 4.3, 1.7)
4	-	5.73 (br s)		
5	n.d. ^d	-	-	-
6	55.8	4.15 (br d, 9.4)	4.24 (td, 4.6, 1.5)	4.26 (td, 4.7, 1.8)
7	39.3	3.32 (dd, 14.0, 3.2), 2.83 (dd, 14.0, 9.4)	3.17 (dd, 14.0, 4.6), 2.86 (dd, 14.0, 4.6)	3.18 (dd, 14.0, 4.6), 2.90 (dd, 13.9, 4.6)
8	127.3	-	-	-
9	130.6	7.07 (d, 8.4)	6.99 (d, 8.3)	7.02 (d, 8.3)
10	115.7	6.79 (d, 8.4)	6.66 (d, 8.3)	6.69 (d, 8.5)
11	155.0	-	-	-
12	115.7	6.79 (d, 8.4)	6.66 (d, 8.3)	6.69 (d, 8.5)
13	130.6	7.07 (d, 8.4)	6.99 (d, 8.3)	7.02 (d, 8.3)
14	37.8	1.99 (m)	1.39 (m)	1.42 (m)
15	23.3	1.19 (m), 1.00 (m)	0.81 (m), 0.66 (m)	0.81 (m), 0.66 (m)
16	11.5	0.85 (t, 7.5)	0.68 (t, 6.5)	0.71 (t, 6.9)
17	15.1	0.94 (d, 7.2)	0.73 (d, 7.0)	0.76 (d, 7.0)

^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Laville et al. (2015). ^d Δεν ανιχνεύθηκε.

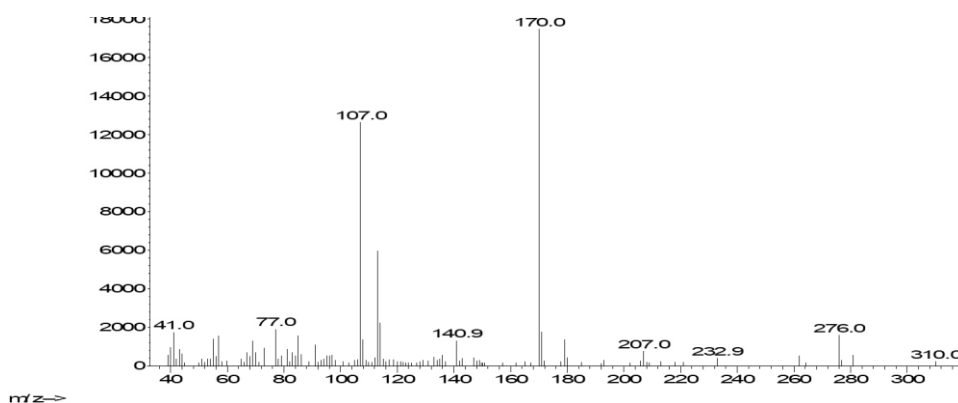
3.14. Μεταβολίτης 14

Η απομόνωση του μεταβολίτη **14** σε καθαρή μορφή δεν κατέστη εφικτή. Αντ' αυτού παραλήφθηκε ως αδιαχώριστο μίγμα με τον μεταβολίτη **13** (σε αναλογία 1:1, όπως προέκυψε από την ανάλυση του μίγματος με ^1H NMR), με τη μορφή λευκού στερεού υπολείμματος συνολικής μάζας 0.8 mg.



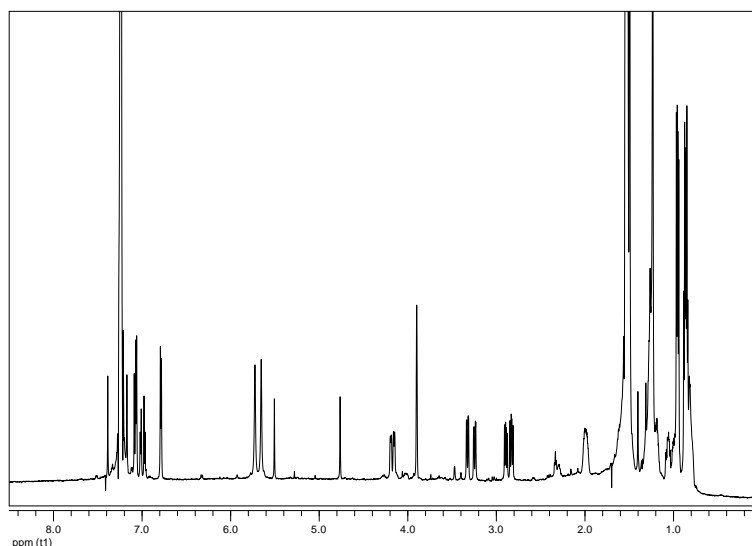
14

Το φάσμα μάζας (Εικ. 67) του μεταβολίτη **14** εμφάνισε μοριακό ιόν $[\text{M}]^+$ σε m/z 310, με ιστοπική κορυφή σε m/z 312, σε αναλογία 3:1 που υποδεικνύει την παρουσία ενός ατόμου χλωρίου στο μόριο.



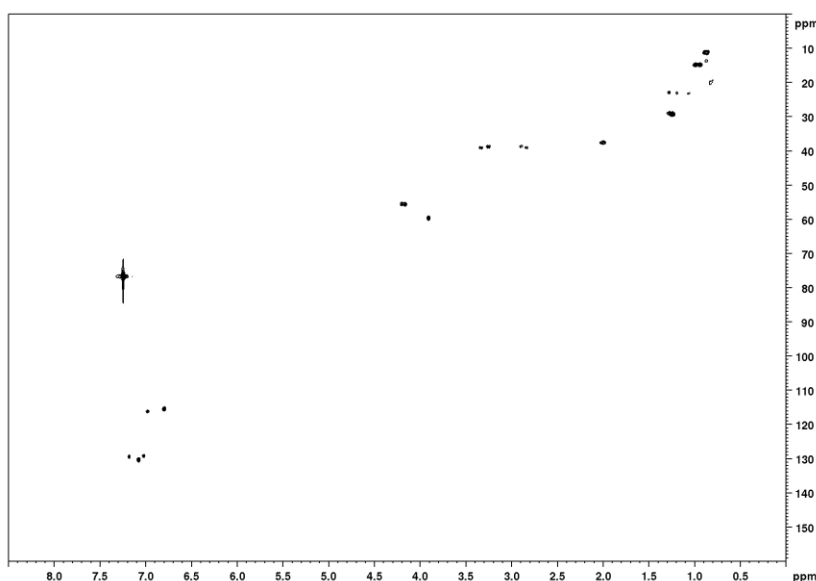
Εικόνα 67. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **14**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **14** (Εικ. 68) σε CDCl_3 , μη λαμβάνοντας υπόψη τις κορυφές που αφορούσαν στον μεταβολίτη **13**, η κυριότερη διαφορά εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίστηκαν τρεις κορυφές (δ 6.97, 7.02 και 7.17) που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και ήταν χαρακτηριστικές ενός 1,2,4-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

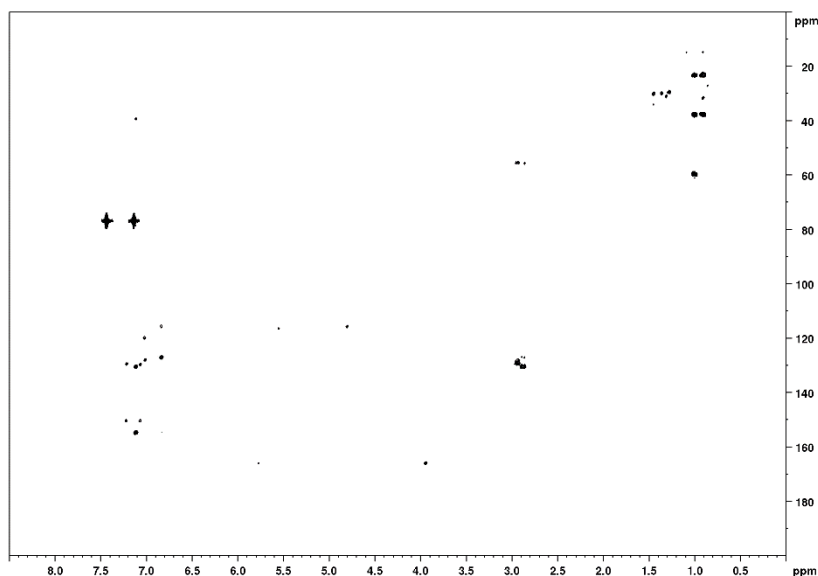


Εικόνα 68. Φάσμα ^1H NMR του μίγματος των μεταβολιτών **13** και **14** σε CDCl_3 .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 69) και HMBC (Εικ. 70), μη λαμβάνοντας υπόψη εκείνες που αφορούσαν στον μεταβολίτη **13**, έγινε εμφανής η παρουσία δεκαπέντε ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτοταγή, δύο δευτεροταγή, έξι τριτοταγή και πέντε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν δύο μεθίλια σε δ 3.90 / 59.9 και δ 4.19 / 55.8 που αποδόθηκαν σε δύο μεθίλια H_α δύο αμινοξέων, έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 166.1 και 166.4 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



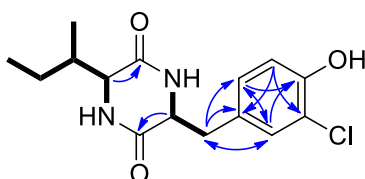
Εικόνα 69. Φάσμα HSQC του μίγματος των μεταβολιτών **13** και **14** σε CDCl_3 .



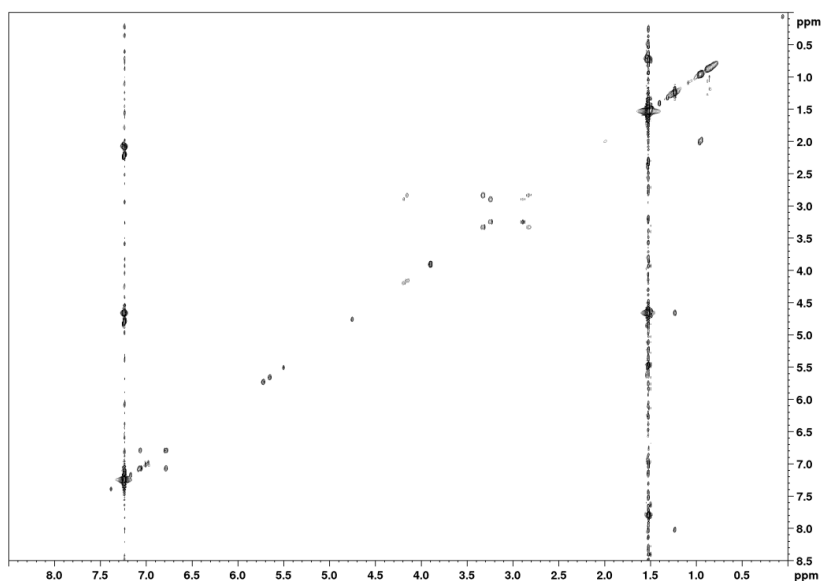
Εικόνα 70. Φάσμα HMBC του μίγματος των μεταβολιτών **13** και **14** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **14** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους επτά βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.

Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **14** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 71) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 72). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY επιβεβαίωσαν την παρουσία μίας ισολευκίνης και μίας υποκατεστημένης τυροσίνης. Οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **14**.



Εικόνα 71. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **14**.



Εικόνα 72. Φάσμα COSY του μίγματος των μεταβολιτών **13** και **14** σε CDCl_3 .

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **14** βασίστηκε στη σύγκριση των φασματοσκοπικών του δεδομένων με εκείνα του μεταβολίτη **13**. Επιπλέον, δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε η χαρακτηριστική θωράκιση του πρωτονίου του ενός εκ των δύο μεθινίων H_α των δύο αμινοξέων που παρατηρείται όταν αυτά έχουν αντίθετο προσανατολισμό στον χώρο, προτείνεται ότι τα H-3 και H-6 έχουν ομοεπίπεδο (*cis*) προσανατολισμό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **14** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το *cis*-κυκλο(3-χλωρο-τυροσίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(3-chloro-Tyr-Ile)]. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **14** παρατίθενται στον Πίνακα 148.

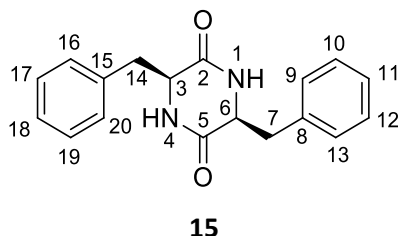
Πίνακας 148. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **14** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	-	5.65 (br s)
2	166.1	-
3	59.9	3.90 (br s)
4	-	5.73 (br s)
5	n.d. ^b	-
6	55.9	4.19 (br d, 8.9)
7	38.9	3.24 (dd, 14.0, 3.2), 2.89 (dd, 14.0, 8.9)
8	128.2	-
9	129.7	7.17 (br s)
10	120.1	-
11	150.4	-
12	116.6	6.97 (d, 8.3)
13	129.5	7.02 (br d, 8.3)
14	37.8	1.99 (m)
15	23.1	1.30 (m), 1.03 (m)
16	11.5	0.87 (t, 7.4)
17	15.1	0.96 (d, 7.2)

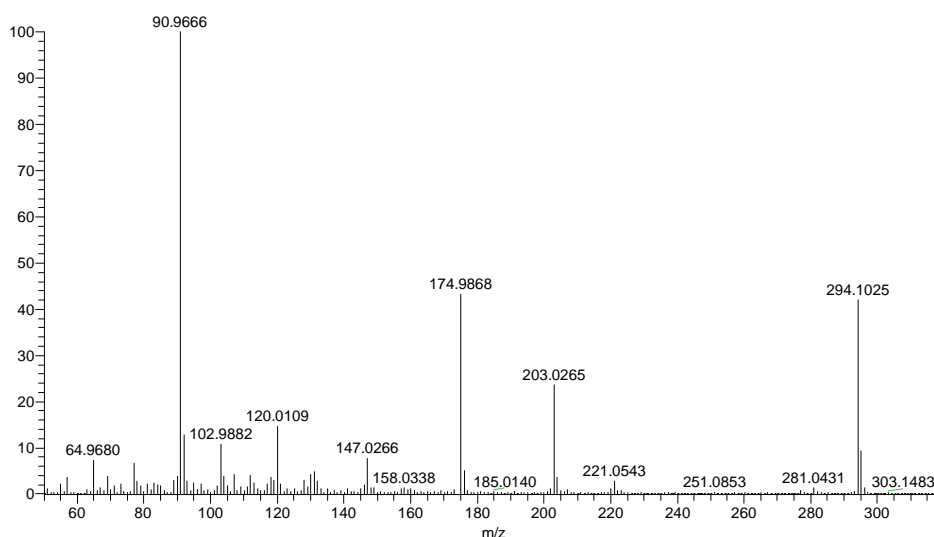
^a Σε CDCl₃. ^b Δεν ανιχνεύθηκε.

3.15. Μεταβολίτης 15

Ο μεταβολίτης **15** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.1 mg.



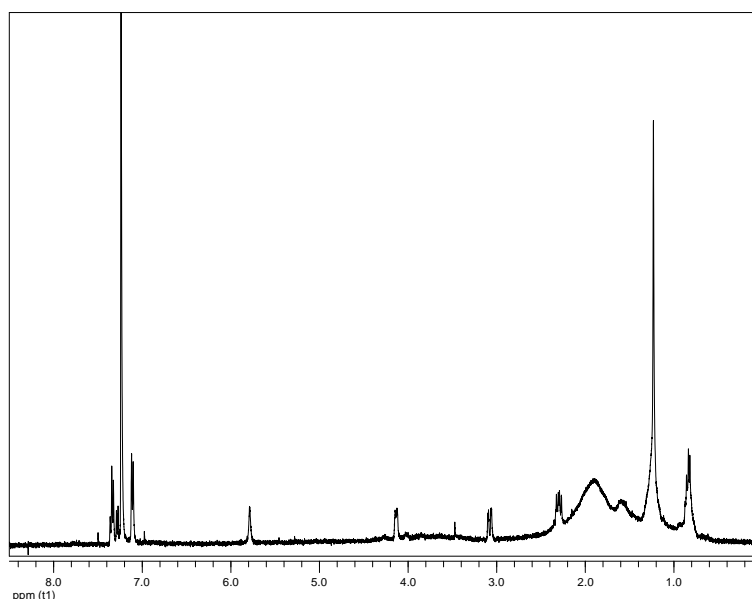
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **15** (Εικ. 73) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 294 και θραύσμα $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 91.



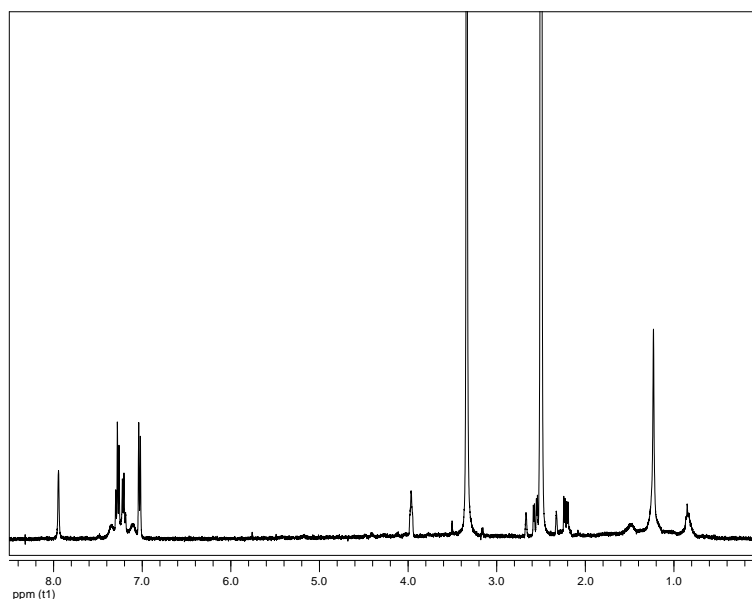
Εικόνα 73. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **15**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **15** (Εικ. 74) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν λιγότερα από τα αναμενόμενα σήματα με βάση το μοριακό βάρος που υποδεικνύεται από το φάσμα μάζας, παραπέμποντας σε συμμετρική δομή μίας 2,5-DKP που έχει προκύψει από τη συμπύκνωση δύο ίδιων αμινοξέων. Οι κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.08-7.38), οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά, αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **15** (Εικ. 75) σε $(CD_3)_2SO$ παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα.



Εικόνα 74. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **15** σε CDCl_3 .

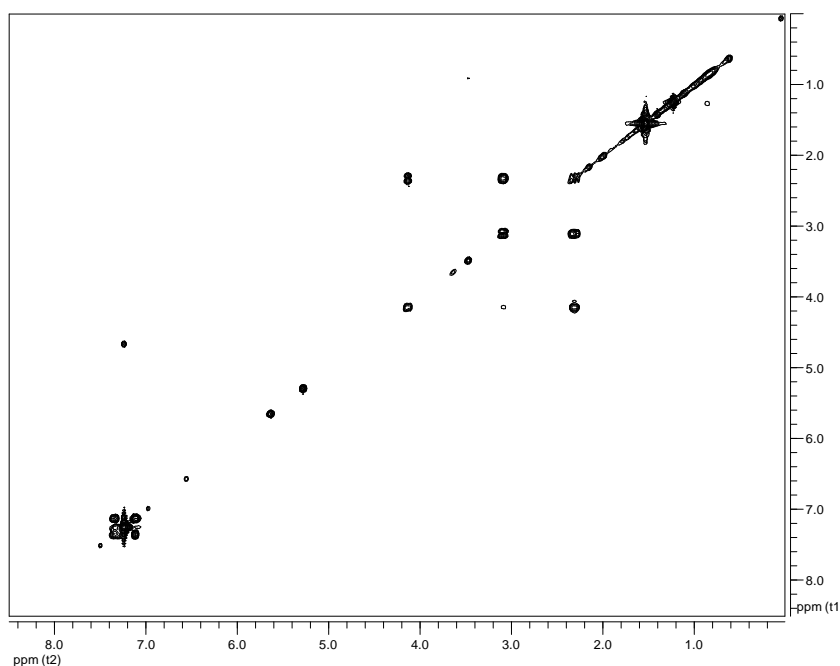


Εικόνα 75. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **15** σε $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **15** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους έντεκα βαθμούς ακορεστότητας, καθώς και τη παρουσία δύο αρωματικών δακτυλίων, το μόριο έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **15** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 76). Οι

ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY παρέπεμπαν σε μία φαινυλαλανίνη.



Εικόνα 76. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **15** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **15** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό συμμετρικό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-φαινυλαλανίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Phe)] (Li et al., 2016b; Guo et al., 2013), το οποίο έχει δείξει αντιπαρασιτική δράση έναντι του *P. berghei* (Pérez-Picaso et al., 2012) και δράση κατά της κατάθλιψης (Tsuruoka et al., 2012). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **15** παρατίθενται στον Πίνακα 149.

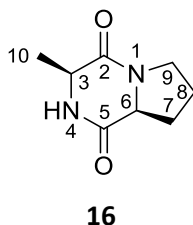
Πίνακας 149. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **15** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
1	-	5.79 (br s)	7.94 (br s)	7.93 (s)
3	56.1	4.13 (br d, 8.5)	3.97 (br s)	3.97 (br s)
4	-	5.79 (br s)	7.94 (br s)	7.93 (s)
6	56.1	4.13 (br d, 8.5)	3.97 (br s)	3.97 (br s)
7	40.1	3.08 (dd, 13.8, 3.0), 2.30 (dd, 13.8, 8.5)	2.56 (13.7, 4.8), 2.22 (dd, 13.7, 6.0)	2.57 (dd, 13.6, 4.8), 2.22 (dd, 13.6, 6.0)
9	129.5	7.11 (br d, 7.2)	7.03 (br d, 7.3)	7.03 (d, 6.8)
10	128.7	7.34 (br t, 7.2)	7.28 (br t, 7.3)	7.28 (t, 7.6)
11	127.4	7.27 (br t, 7.2)	7.21 (br t, 7.3)	7.21 (t, 7.6)
12	128.7	7.34 (br t, 7.2)	7.28 (br t, 7.3)	7.28 (t, 7.6)
13	129.5	7.11 (br d, 7.2)	7.03 (br d, 7.3)	7.03 (d, 6.8)
14	40.1	3.08 (dd, 13.8, 3.0), 2.30 (dd, 13.8, 8.5)	2.56 (13.7, 4.8), 2.22 (dd, 13.7, 6.0)	2.57 (dd, 13.6, 4.8), 2.22 (dd, 13.6, 6.0)
16	129.5	7.11 (br d, 7.2)	7.03 (br d, 7.3)	7.03 (d, 6.8)
17	128.7	7.34 (br t, 7.2)	7.28 (br t, 7.3)	7.28 (t, 7.6)
18	127.4	7.27 (br t, 7.2)	7.21 (br t, 7.3)	7.21 (t, 7.6)
19	128.7	7.34 (br t, 7.2)	7.28 (br t, 7.3)	7.28 (t, 7.6)
20	129.5	7.11 (br d, 7.2)	7.03 (br d, 7.3)	7.03 (d, 6.8)

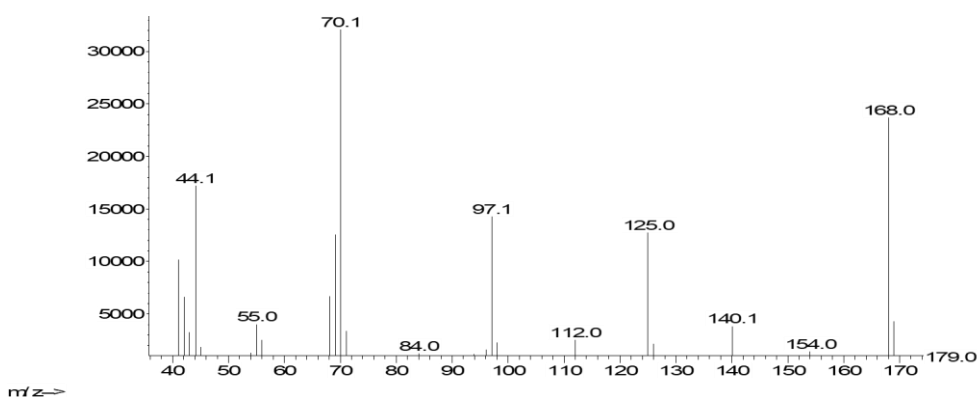
^a Σε CDCl₃. ^b Σε (CD₃)₂SO. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Guo et al. (2013).

3.16. Μεταβολίτης 16

Ο μεταβολίτης **16** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.5 mg.



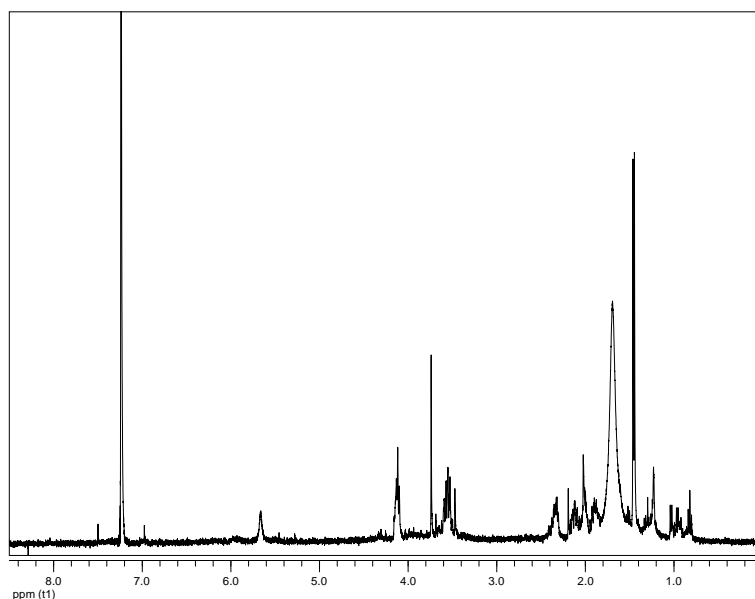
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **16** (Εικ. 77) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 168.



Εικόνα 77. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **16**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **16** (Εικ. 78) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν:

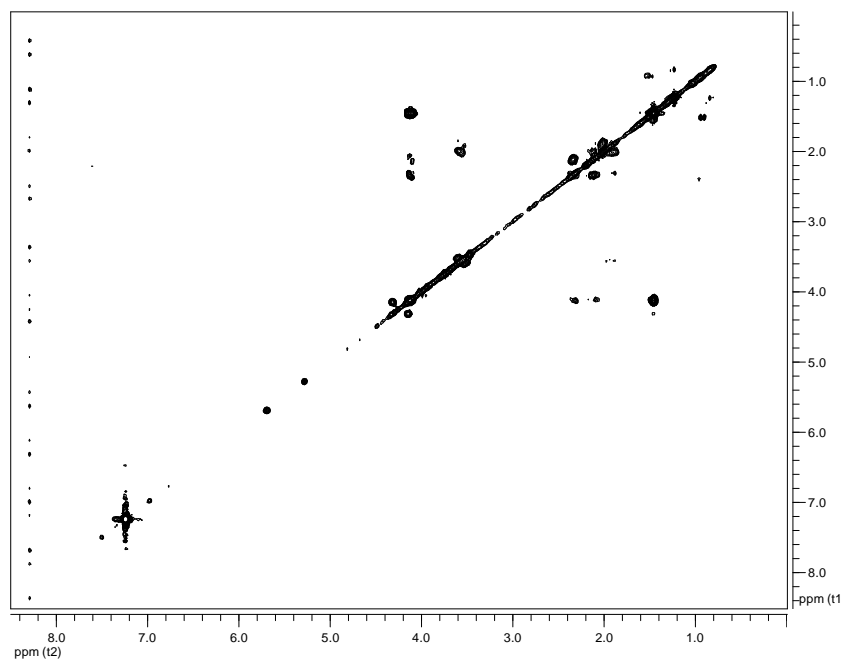
- Μια διπλή κορυφή σε δ 1.45, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός αλειφατικού μεθυλίου σε τριτοταγές άτομο άνθρακα.
- Δύο σήματα μεθινίων H_α δύο αμινοξέων (4.11 και 4.12 ppm) και μόνο ενός ευκίνητου πρωτονίου μίας αμινομάδας (5.66 ppm) που υποδείκνυαν την ύπαρξη 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου.
- Μια πολλαπλή κορυφή σε δ 3.56, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου πιθανώς λόγω γειτνίασης με άτομο αζώτου.



Εικόνα 78. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **16** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **16** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια του 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου ως δύο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **16** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 79). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 / H₂-8 / H₂-9 που παρέπεμπε σε μία προλίνη και ii) H-3 / H₃-11 που παρέπεμπε σε μία αλανίνη.



Εικόνα 79. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **16** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **16** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-αλανίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Ala)] (Huang et al., 2014), το οποίο έχει εμφανίσει *in vitro* αντιφλεγμονώδη δράση σε μακροφάγα κύτταρα ποντικών (Chen et al., 2012a), καθώς ανασταλτική δράση στην παραγωγή αφλατοξίνης από τον μύκητα *Aspergillus flavus* (Iimura et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **16** παρατίθενται στον Πίνακα 150.

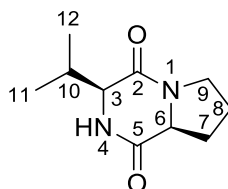
Πίνακας 150. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **16** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.12 (m)	4.09 (m)
4	5.66 (br s)	5.82 (br s)
6	4.11 (m)	4.13 (t, 7.2)
7	2.36 (m), 2.13 (m)	2.37 (m), 2.16 (m)
8	2.01 (m), 1.89 (m)	2.02 (m), 1.92 (m)
9	3.56 (m)	3.62 (m), 3.54 (m)
10	1.45 (d, 7.0)	1.46 (d, 6.8)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Huang et al. (2014).

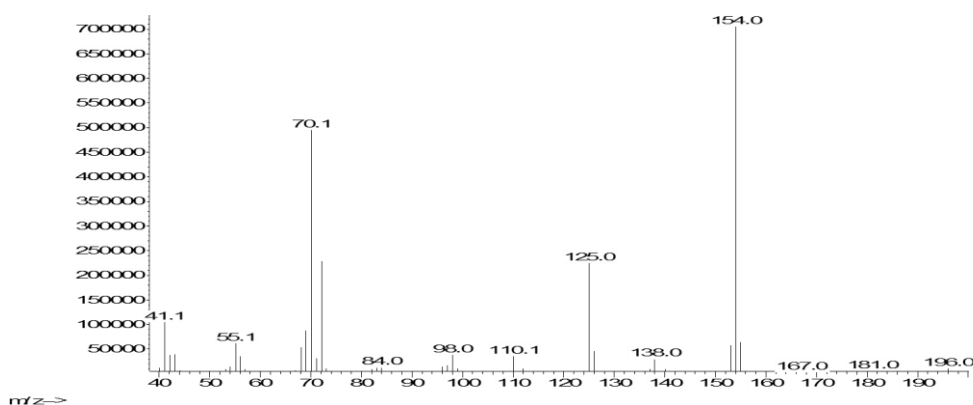
3.17. Μεταβολίτης 17

Ο μεταβολίτης **17** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 18.1 mg.



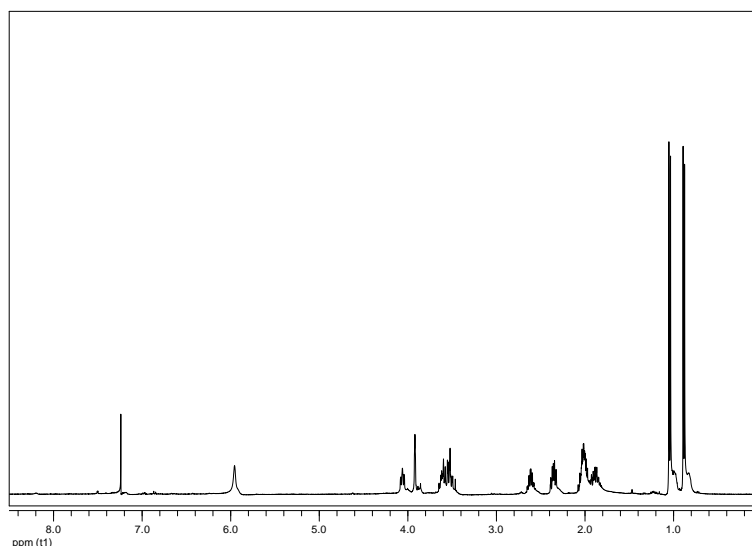
17

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **17** (Εικ. 80) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 196 και θραύσματα $[M-CH_3]^+$ και $[C_7H_{10}N_2O_2]^+$ σε m/z 181 και 154, αντίστοιχα.



Εικόνα 80. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **17**.

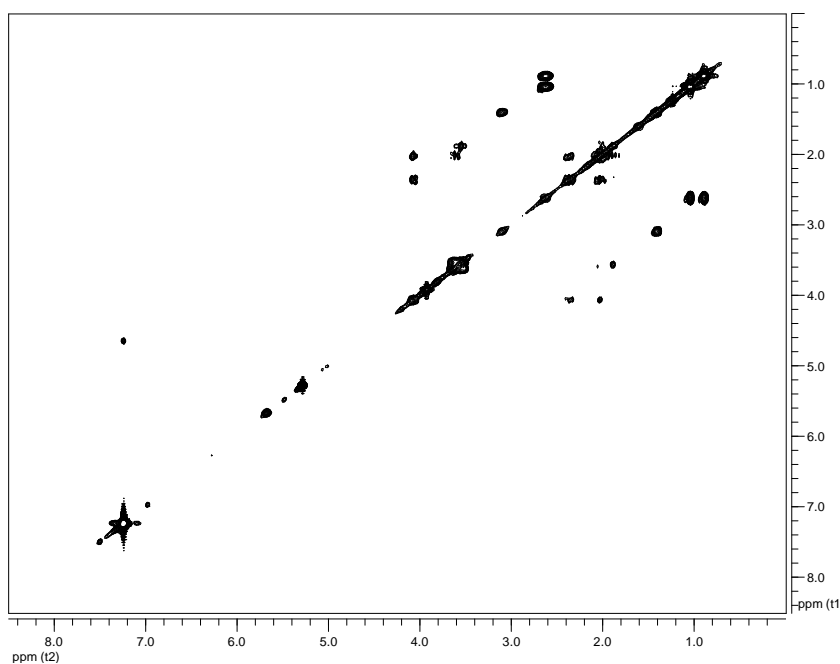
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **17** (Εικ. 81) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν τα σήματα που υποδείκνυαν την ύπαρξη 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου, δηλαδή αυτά των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων (3.92 και 4.07 ppm) και μόνο ενός ευκίνητου πρωτονίου μίας αμινομάδας (5.67 ppm), τα οποία σε συνδυασμό με τα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου (δ 3.53 και 3.62) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη μίας προλίνης στο μόριο. Ακόμη, παρατηρήθηκαν δύο διπλές κορυφές σε δ 0.89 και 1.04, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλιών σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.



Εικόνα 81. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **17** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **17** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **17** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 82) και καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία προλίνη και σε μία βαλίνη (H_3 / H_2 -10 / (H_3 -12) H_3 -11).



Εικόνα 82. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **17** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **17** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-βαλίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Val)] (Tezuka et al., 1994), το οποίο έχει δείξει ανασταλτική δράση στην ακετυλοχολινεστεράση (Oliveira et al., 2009), αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι της εγκατάστασης της προνύμφης του *Balanus amphitrite* (Li et al., 2006), καθώς και ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **17** παρατίθενται στον Πίνακα 151.

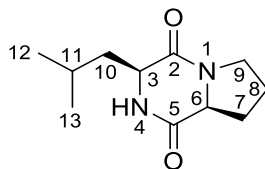
Πίνακας 151. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **17** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	3.92 (br s)	3.93 (br s)
4	5.67 (br s)	6.07 (br s)
6	4.07 (t, 8.1)	4.08 (td, 8, 2)
7	2.37 (m), 2.02 (m)	2.37 (m), 2.04 (m)
8	2.02 (m), 1.89 (m)	2.02 (m), 1.91 (m)
9	3.62 (m), 3.53 (m)	3.64 (dt, 12, 8), 3.54 (ddd, 12, 9, 2)
10	2.62 (qqd, 7.3, 6.9, 2.7)	2.63 (qqd, 7, 7, 3)
11	0.89 (d, 6.9)	0.91 (d, 7)
12	1.04 (d, 7.3)	1.07 (d, 7)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Tezuka et al. (1994).

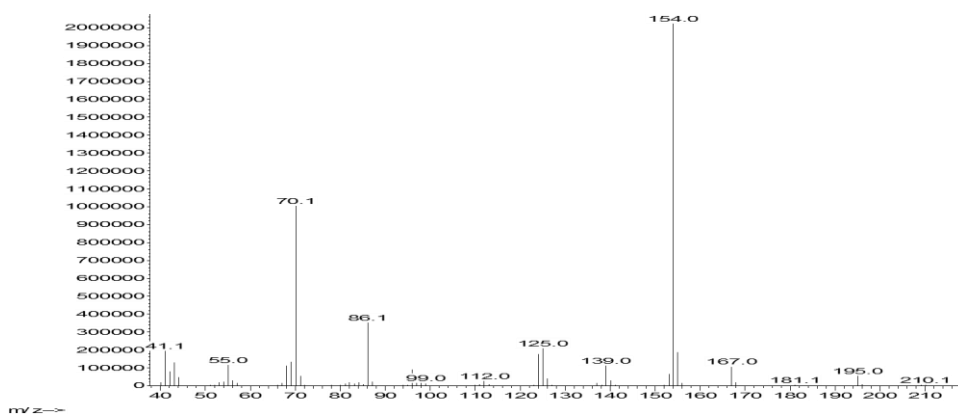
3.18. Μεταβολίτης 18

Ο μεταβολίτης **18** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 64.7 mg.



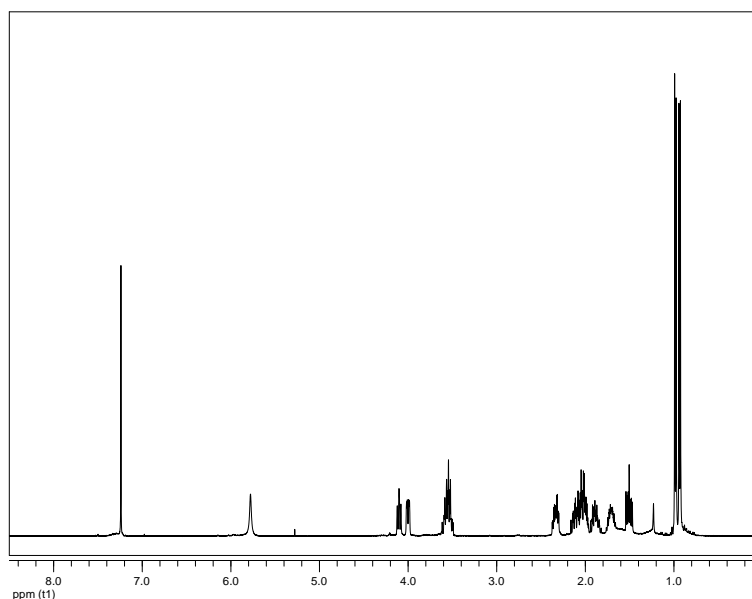
18

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **18** (Εικ. 83) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 210 και θραύσματα $[M-CH_3]^+$, $[M-CH(CH_3)_2]^+$ και $[C_8H_{14}N_2O_2]^+$ σε m/z 195, 167 και 170, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την παρουσία ενός επιπλέον μεθυλενίου σε σύγκριση με τη δομή του μεταβολίτη **17**.



Εικόνα 83. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **18**.

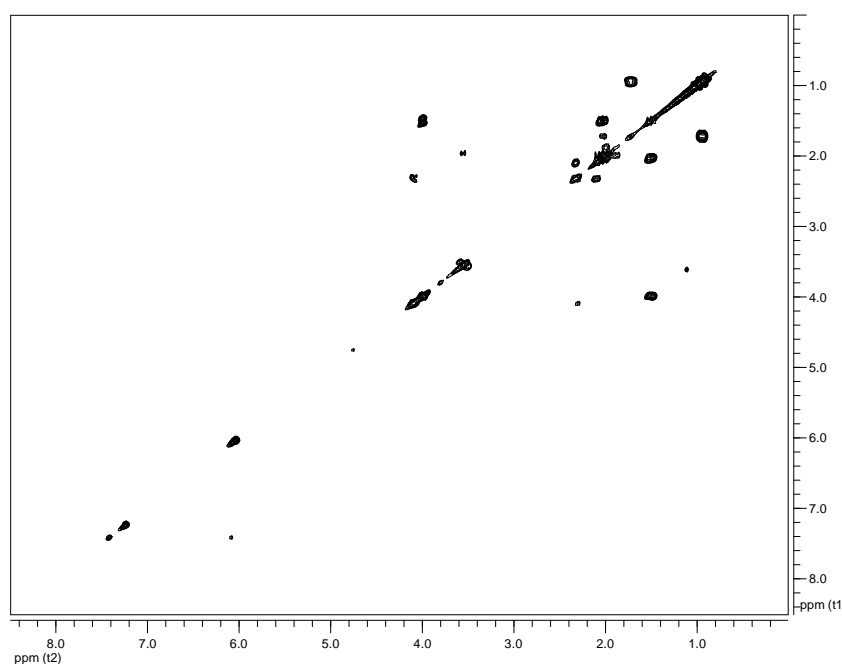
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **18** (Εικ. 84) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **17** σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις.



Εικόνα 84. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **18** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **18** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **18** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 85) και καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία προλίνη και σε μία λευκίνη.



Εικόνα 85. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **18** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **18** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-λευκίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Leu)] (Adamczeski et al., 1995), το οποίο έχει δείξει *in vitro* αντιφλεγμονώδη δράση σε μακροφάγα κύτταρα ποντικών (Rupesh et al., 2012) και αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003), αλλά ήπια δράση σε διάφορα άλλα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων που μελετήθηκαν (Kumar et al., 2012). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **18** παρατίθενται στον Πίνακα 152.

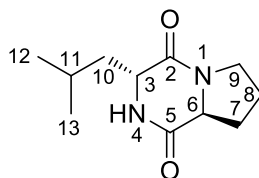
Πίνακας 152. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **18** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.00 (dd, 9.7, 3.6)	4.01 (dd, 9.4, 3.4)
4	5.78 (br s)	5.91 (br s)
6	4.10 (t, 8.2)	4.12 (t, 8.1)
7	2.33 (m), 2.12 (m)	2.33 (m), 2.13 (m)
8	2.01 (m), 1.89 (m)	2.02-1.99 (m), 1.94-1.86 (m)
9	3.55 (m)	3.6-3.5 (m)
10	2.05 (m), 1.51 (ddd, 14.5, 9.7, 5.0)	2.01 (m), 1.52 (ddd, 14.5, 9.6, 4.9)
11	1.71 (m)	1.76-1.69 (m)
12	0.94 (d, 6.5)	0.94 (d, 6.3)
13	0.98 (d, 6.5)	1.00 (d, 6.3)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Adamczeski et al. (1995).

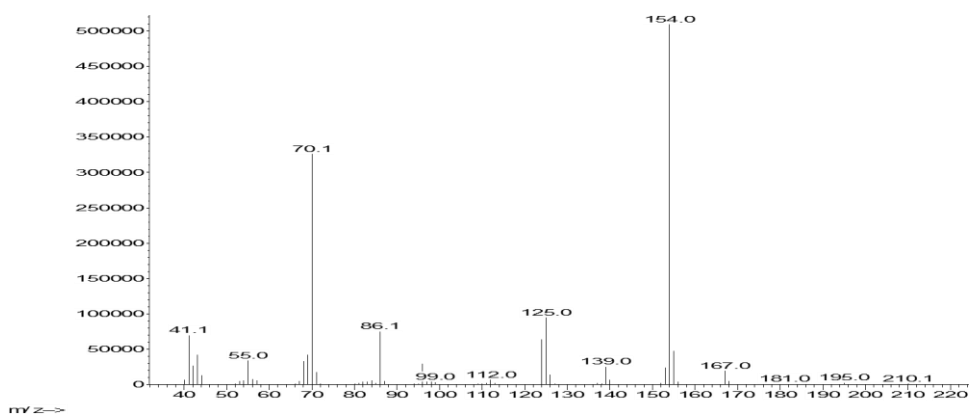
3.19. Μεταβολίτης 19

Ο μεταβολίτης **19** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 10.2 mg.



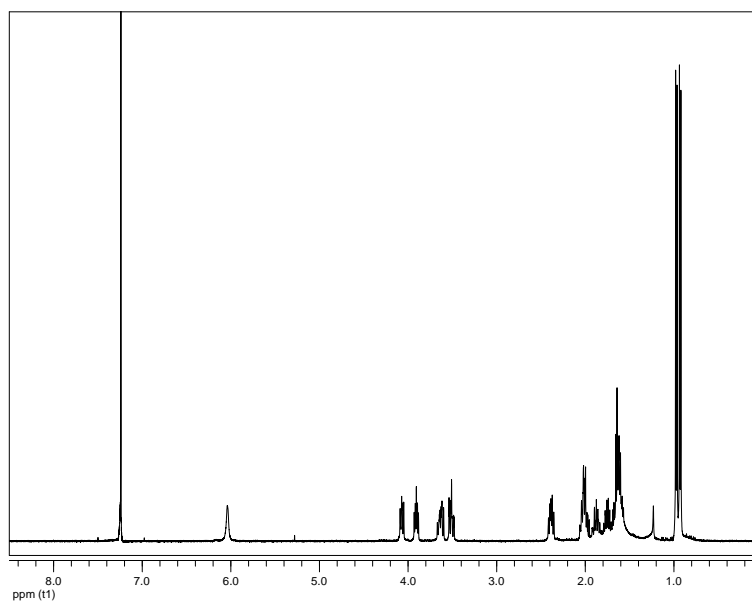
19

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **19** (Εικ. 86) ήταν αρκετά όμοιο με εκείνο του μεταβολίτη **18**, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερή μόρια.



Εικόνα 86. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **19**.

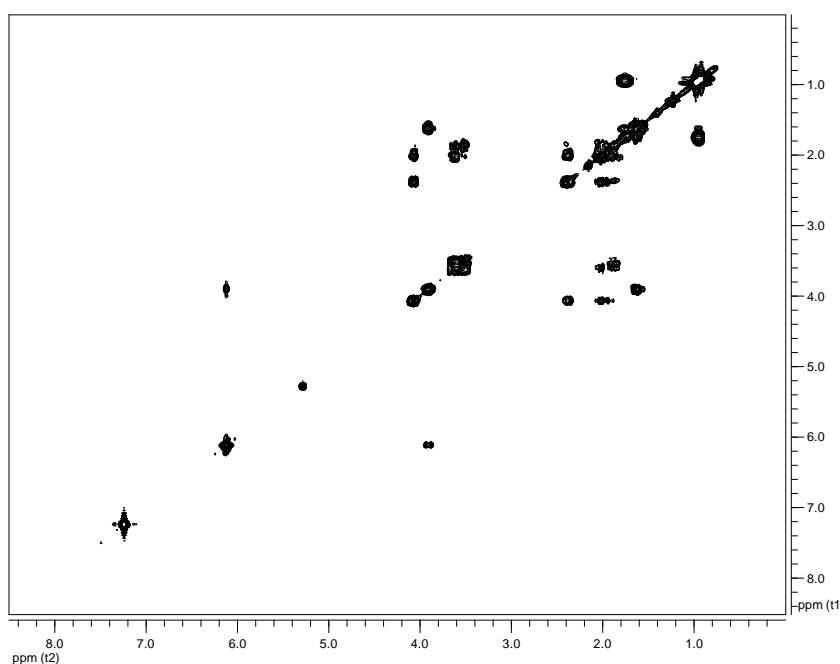
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **19** (Εικ. 87) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **18**, σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Χαρακτηριστική ήταν η θωράκιση του πρωτονίου H-3 στα 3.91 ppm που συνήθως παρατηρείται όταν τα μεθίλια H_α των δύο αμινοξέων έχουν αντίθετο προσανατολισμό στον χώρο.



Εικόνα 87. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **19** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **19** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **18** ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **19** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 88) και παρέπεμπαν, όπως και στον μεταβολίτη **18**, σε μία προλίνη και σε μία λευκίνη.



Εικόνα 88. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **19** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **19** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *trans*-κυκλο(προλίνη-λευκίνη) [*trans*-cyclo(Pro-Leu)] (Adamczeski et al., 1995), το οποίο έχει αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003), αλλά ήπια δράση σε διάφορα άλλα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων που μελετήθηκαν (Kumar et al., 2012). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **19** παρατίθενται στον Πίνακα 153.

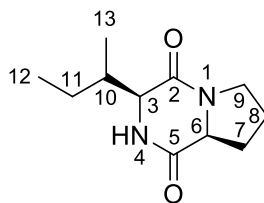
Πίνακας 153. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **19** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	3.91 (ddd, 9.7, 5.5, 4.4)	3.92 (dd, 9.9, 5.4, 4.5)
4	6.04 (br s)	6.68 (br s)
6	4.07 (dd, 9.4, 6.8)	4.07 (dd, 6.9, 1.5)
7	2.38 (m), 2.02 (m)	2.37 (ddd, 8.7, 6.4, 2.4), 2.02 (m)
8	2.02 (m), 1.88 (m)	1.96 (m), 1.88 (m)
9	3.63 (m), 3.51 (m)	3.62 (dt, 9.0, 4.5), 3.52 (dt, 9.8, 2.7)
10	1.62 (m)	1.75 (q, 6.3), 1.63 (ddd, 11.1, 6.5, 1.8)
11	1.75 (m)	1.66-1.60 (m)
12	0.93 (d, 6.5)	0.94 (d, 6.3)
13	0.97 (d, 6.5)	0.97 (d, 6.3)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Adamczeski et al. (1995).

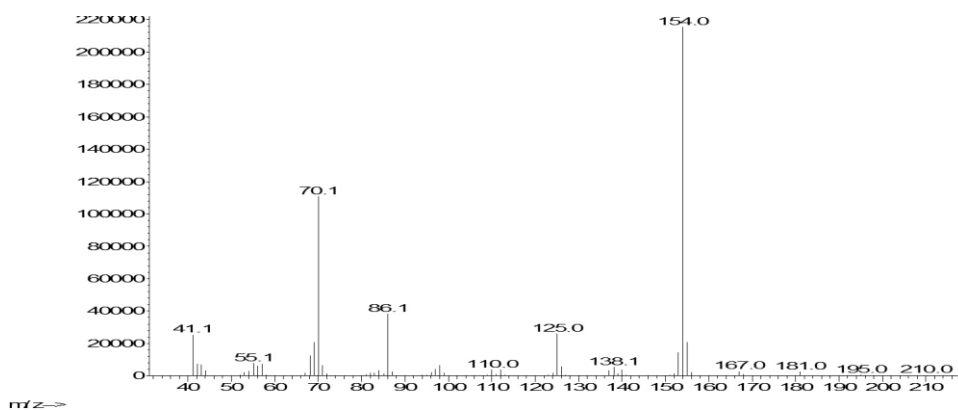
3.20. Μεταβολίτης 20

Ο μεταβολίτης **20** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 34.8 mg.



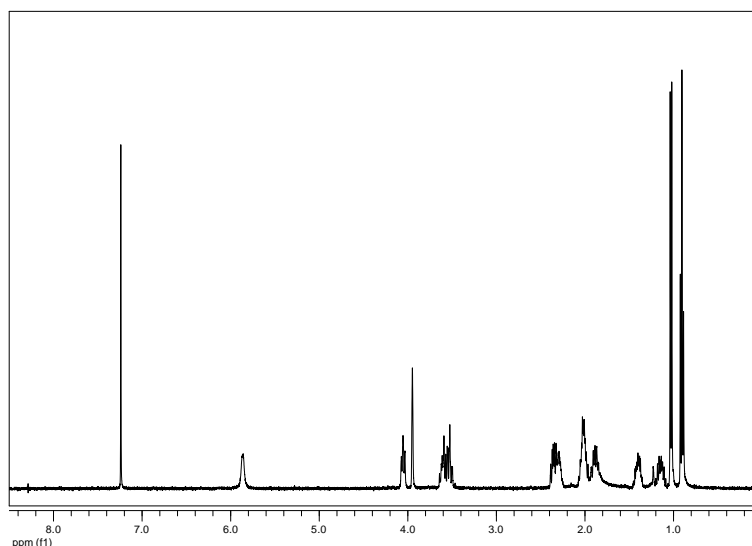
20

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **20** (Εικ. 89) ήταν αρκετά όμοιο με εκείνα των μεταβολιτών **18** και **19**, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερή μόρια.



Εικόνα 89. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **20**.

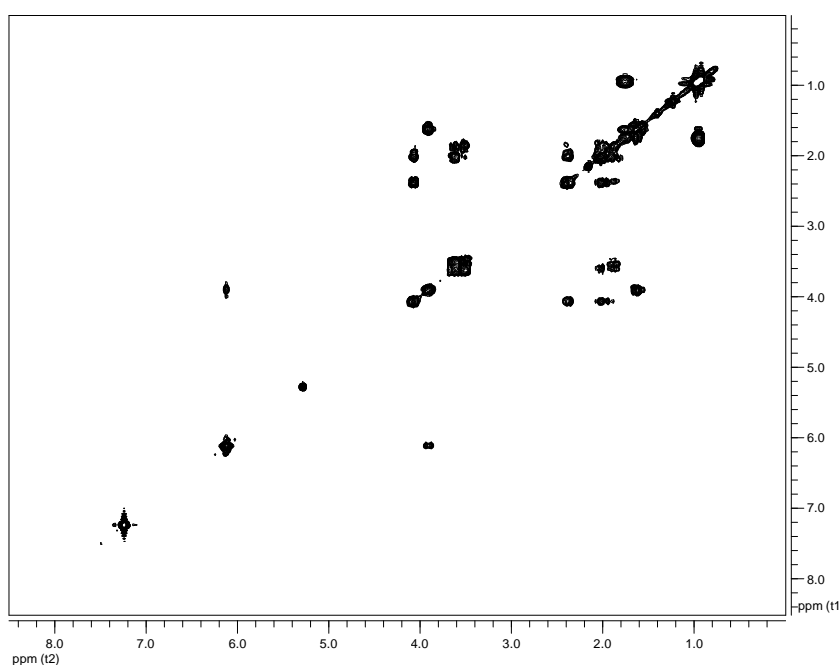
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **20** (Εικ. 90) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **18**, με κύρια διαφορά την πολλαπλότητα μίας εκ των δύο κορυφών των μεθυλίων που εμφανίστηκε ως τριπλή σε δ 0.91 αντί για διπλή.



Εικόνα 90. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **20** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **20** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν των μεταβολιτών **18** και **19** ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **20** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 91) και καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία προλίνη και σε μία ισολευκίνη, επιβεβαιώνοντας την αντικατάσταση της λευκίνης από μία ισολευκίνη.



Εικόνα 91. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **20** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **20** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Ile)] (Adamczeski et al., 1995), το οποίο έχει δείξει αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003), αλλά και νηματοκτόνο δράση (Guo et al., 2016). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **20** παρατίθενται στον Πίνακα 154.

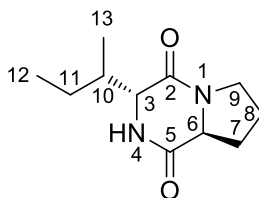
Πίνακας 154. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **20** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	3.95 (br s)	3.96 (br s)
4	5.86 (br s)	5.99 (br s)
6	4.05 (br t, 8.0)	4.07 (t, 7.5)
7	2.36 (m), 2.02 (m)	2.3-2.2 (m), 2.1-2.0 (m)
8	2.02 (m), 1.89 (m)	2.0-1.9 (m), 1.9-1.8 (m)
9	3.61 (m), 3.53 (m)	3.6-3.5 (m)
10	2.30 (m)	2.4-2.3 (m)
11	1.41 (m), 1.14 (m)	1.5-1.4 (m), 1.3-1.1 (m)
12	0.91 (t, 7.4)	0.92 (t, 7.4)
13	1.03 (d, 7.2)	1.05 (d, 7.2)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Adamczeski et al. (1995).

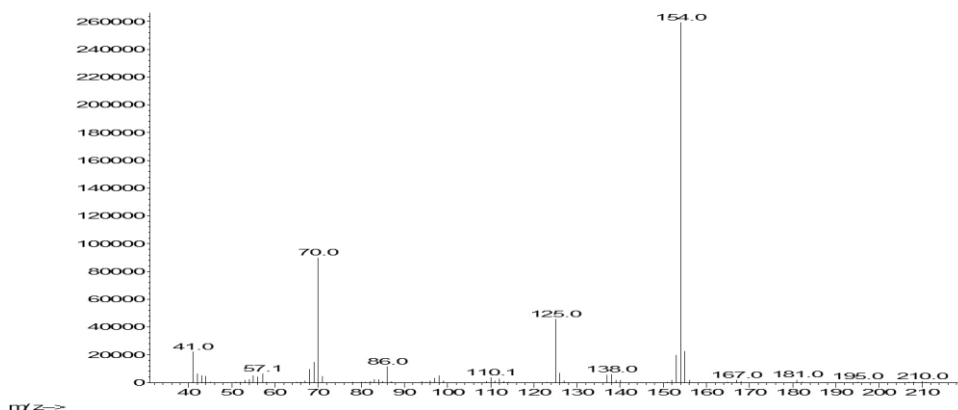
3.21. Μεταβολίτης 21

Ο μεταβολίτης **21** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.0 mg.



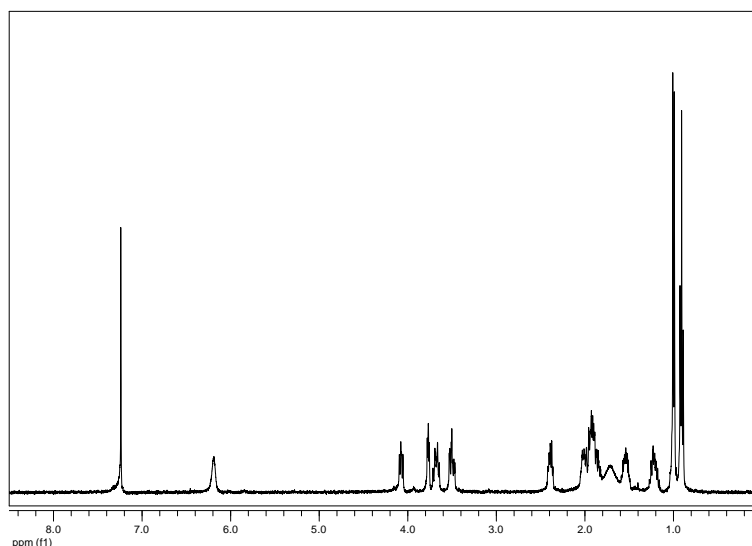
21

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **21** (Εικ. 92) ήταν αρκετά όμοιο με εκείνο των μεταβολιτών **18-20**, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερή μόρια.



Εικόνα 92. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **21**.

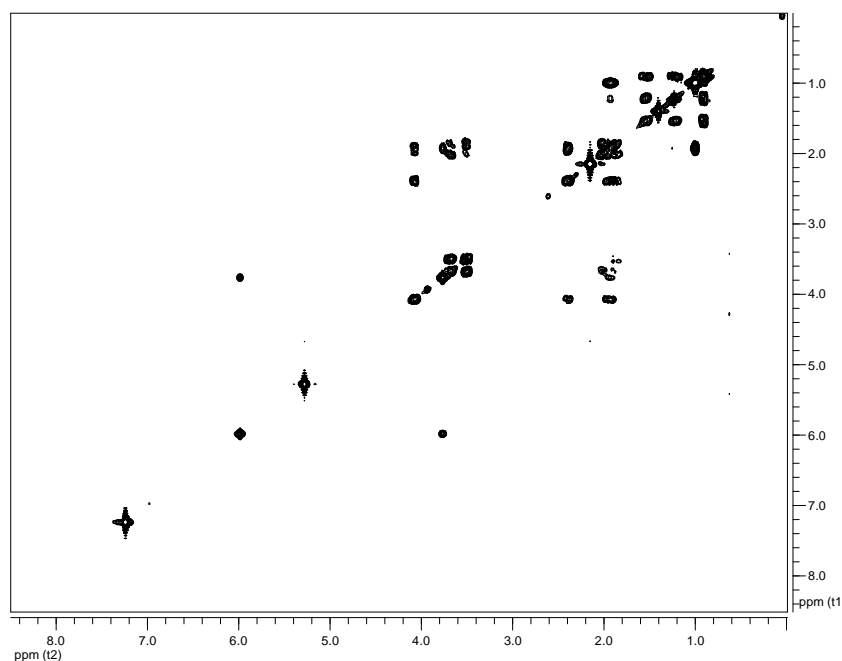
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **21** (Εικ. 93) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **20**, σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Χαρακτηριστική ήταν η θωράκιση του πρωτονίου H-3 στα 3.77 ppm που συνήθως παρατηρείται όταν τα μεθίλια H_α των δύο αμινοξέων έχουν αντίθετο προσανατολισμό στον χώρο.



Εικόνα 93. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **21** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **21** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν των μεταβολιτών **18-20** ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **21** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 94) και παρέπεμπαν, όπως και στον μεταβολίτη **20**, σε μία προλίνη και σε μία ισολευκίνη.



Εικόνα 94. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **21** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **21** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *trans*-κυκλο(προλίνη-ισολευκίνη) [*trans*-cyclo(Pro-Ile)] (He et al., 2013), το οποίο έχει παρουσιάσει αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003), καθώς και *in vitro* αντιφλεγμονώδη δράση (Nalli et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **21** παρατίθενται στον Πίνακα 155.

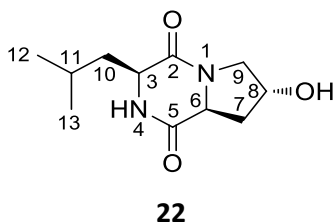
Πίνακας 155. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **21** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	3.77 (dd, 5.4, 3.9)	3.78 (br s)
4	6.19 (br s)	6.27 (br s)
6	4.08 (dd, 9.6, 6.5)	4.08 (m)
7	2.39 (m), 1.93 (m)	2.42 (m), 1.97 (m)
8	2.01 (m), 1.87 (m)	2.02 (m), 1.93 (m)
9	3.68 (m), 3.50 (m)	3.71 (m), 3.52 (m)
10	1.93 (m)	1.97 (m)
11	1.54 (m), 1.22 (m)	1.55 (m), 1.24 (m)
12	0.91 (t, 7.4)	0.92 (t)
13	1.00 (d, 6.9)	1.01 (d)

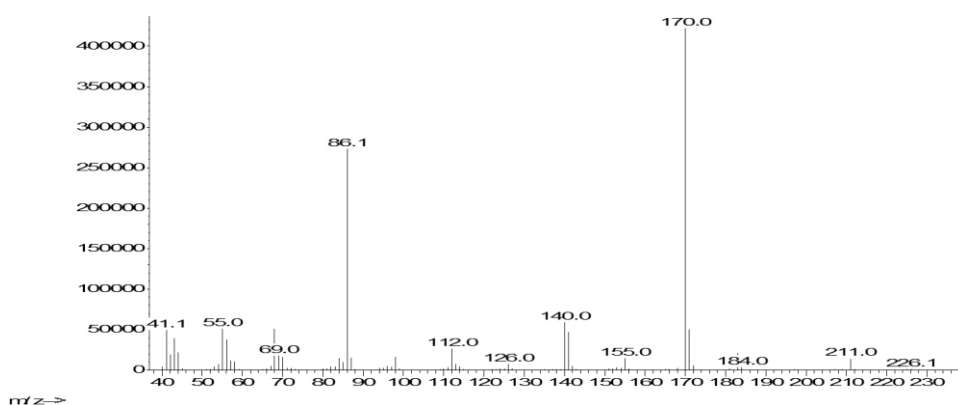
^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από He et al. (2013).

3.2.2. Μεταβολίτης 22

Ο μεταβολίτης **22** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 8.3 mg.



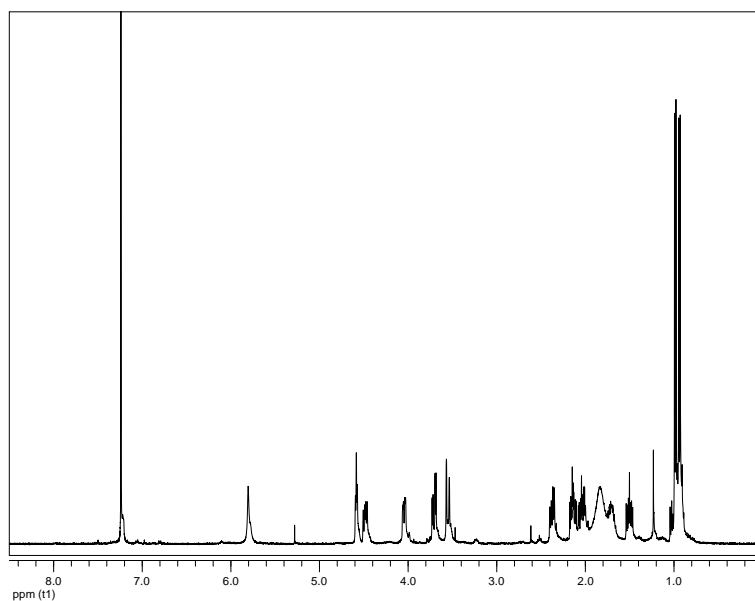
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **22** (Εικ. 95) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 226 και θραύσματα $[M-CH_3]^+$ και $[C_7H_{10}N_2O_3]^+$ σε m/z 211 και 170, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την παρουσία ενός επιπλέον ατόμου οξυγόνου σε σύγκριση με τη δομή των μεταβολιτών **18-21**.



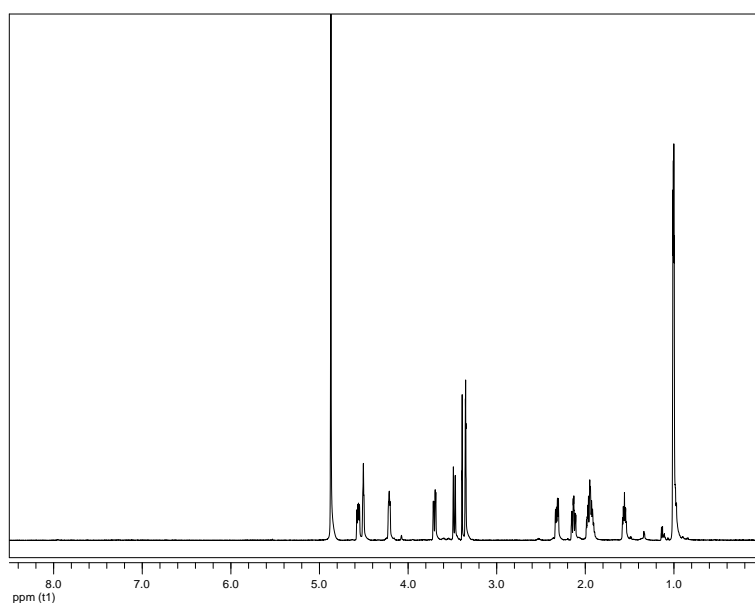
Εικόνα 95. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **22**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **22** (Εικ. 96) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **18**, με κυριότερη διαφορά την εμφάνιση μίας τριπλής κορυφής σε δ 4.58, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθινίου.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **22** (Εικ. 97) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτό του ευκίνητου πρωτονίου που είχε ανταλλαχθεί με δευτέριο.



Εικόνα 96. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **22** σε CDCl_3 .

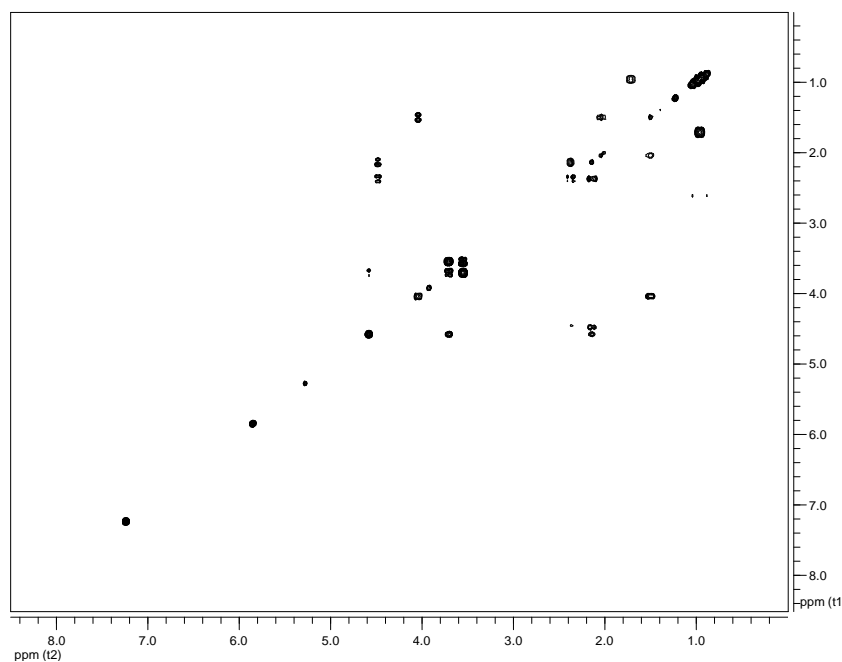


Εικόνα 97. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **22** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **22** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως δύο από τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **22** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT και COSY (Εικ. 98). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) μίας 4-υποκατεστημένης προλίνης ($\text{H}-6 / \text{H}_2-7 / \text{H}-8 / \text{H}_2-9$) και ii) μίας

λευκίνης.



Εικόνα 98. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **22** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **22** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(*trans*-4-υδροξυπρολίνη-λευκίνη) [*cis*-cyclo(*trans*-4-Hyp-Leu)] (Cronan et al., 1998), το οποίο έχει εμφανίσει αντιφλεγμονώδη *in vitro* (Khan et al., 2015), αντικρκή (Lin et al., 2017) και κυτταροτοξική (Ye et al., 2017) δράση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **22** παρατίθενται στον Πίνακα 156.

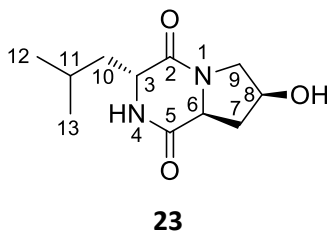
Πίνακας 156. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **22** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_H^b	$\delta_H^{b,c}$
3	53.4	4.04 (dd, 9.6, 3.8)	4.21 (br s)	4.15 (m)
4		5.83 (br s)		
6	57.3	4.48 (dd, 11.1, 6.3)	4.56 (dd, 11.0, 6.5)	4.51 (dd, 11.1, 6.5)
7	37.8	2.37 (br dd, 13.5, 6.3), 2.14 (ddd, 13.5, 11.1, 4.3)	2.32 (dd, 13.3, 6.5), 2.13 (ddd, 13.3, 11.0, 4.2)	2.27 (dd, 13.3, 6.5), 2.08 (ddd, 13.3, 11.1, 4.3)
8	68.6	4.58 (t, 4.3)	4.50 (t, 4.2)	4.45 (t, 4.3)
9	54.5	3.71 (dd, 13.2, 4.3), 3.55 (d, 13.2)	3.70 (dd, 12.8, 4.2), 3.48 (d, 12.8)	3.65 (dd, 12.5, 4.3), 3.42 (d, 12.5)
10	38.5	2.05 (ddd, 14.5, 9.9, 3.8), 1.50 (ddd, 14.5, 9.6, 4.9)	1.95 (m), 1.56 (m)	1.90 (m), 1.50 (m)
11	24.9	1.73 (m)	1.95 (m)	1.88 (m)
12	21.7	0.94 (d, 6.6)	1.00 (d, 6.1)	0.95 (d, 6.4)
13	23.6	0.99 (d, 6.6)	1.01 (d, 6.3)	0.96 (d, 6.4)

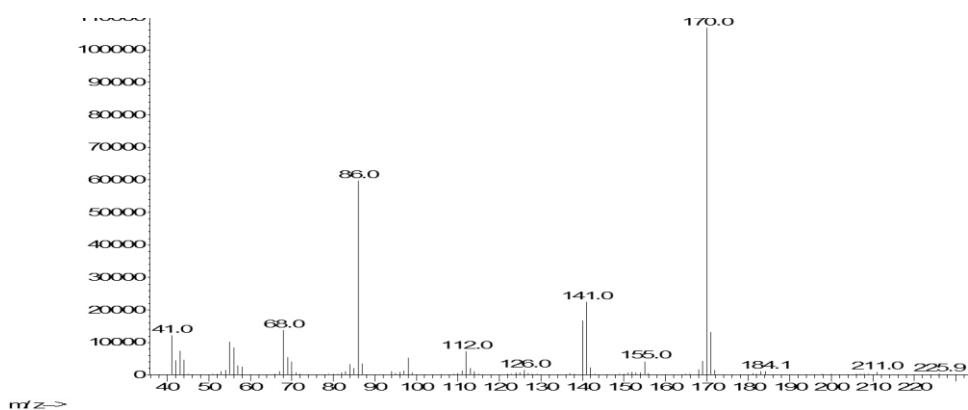
^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Cronan et al. (1998).

3.23. Μεταβολίτης 23

Ο μεταβολίτης **23** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.7 mg.

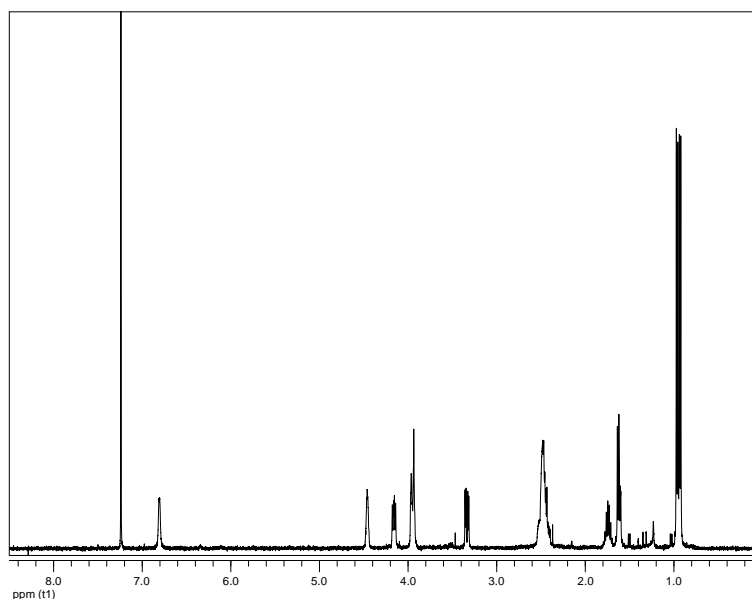


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **23** (Εικ. 99) ήταν αρκετά όμοιο με εκείνο του μεταβολίτη **22**, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερή μόρια.



Εικόνα 99. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **23**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **23** (Εικ. 100) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **22**, σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Χαρακτηριστική ήταν η θωράκιση του πρωτονίου H-3 στα 3.95 ppm που συνήθως παρατηρείται όταν τα μεθίλια H_α των δύο αμινοξέων έχουν αντίθετο προσανατολισμό στον χώρο.

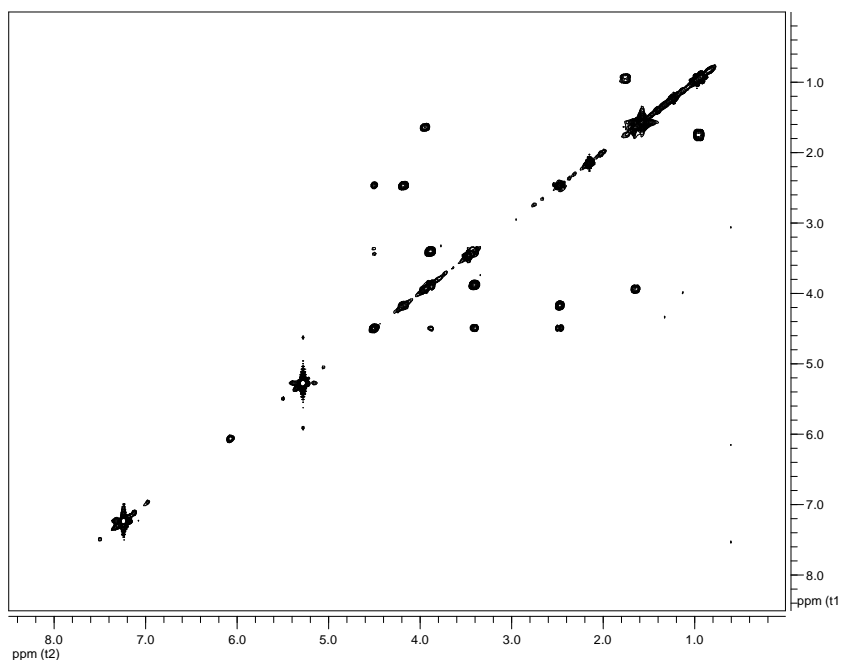


Εικόνα 100. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **23** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **23** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **22** ($\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **23** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 101) και παρέπεμπαν, όπως και στον μεταβολίτη **22**, σε μία 4-υποκατεστημένη προλίνη και σε μία λευκίνη.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **23** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *trans*-κυκλο(*cis*-4-υδροξυπρολίνη-λευκίνη) [*trans*-cyclo(*cis*-4-Hyr-Leu)] (Shigemori et al., 1998), το οποίο δεν εμφάνισε δράση έναντι διαφόρων στελεχών βακτηρίων και μυκήτων που μελετήθηκαν (Shaaban et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **23** παρατίθενται στον Πίνακα 157.



Εικόνα 101. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **23** σε CDCl_3 .

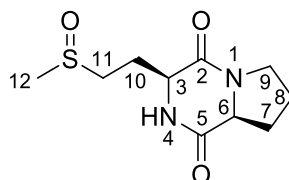
Πίνακας 157. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **23** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	3.95 (m)	3.95 (m)
4	6.07 (br s)	7.56 (d, 4.2)
6	4.16 (dd, 9.2, 5.6)	4.16 (dd, 9.1, 5.8)
7	2.48 (m)	2.45 (m)
8	4.46 (m)	4.45 (m)
9	3.95 (m), 3.34 (dd, 12.5, 4.8)	3.95 (m), 3.34 (dd, 12.5, 4.6)
10	1.62 (m)	1.63 (t, 6.9)
11	1.74 (m)	1.75 (m)
12	0.93 (d, 6.5)	0.95 (d, 6.5)
13	0.96 (d, 6.5)	0.98 (d, 6.5)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Shigemori et al. (1998).

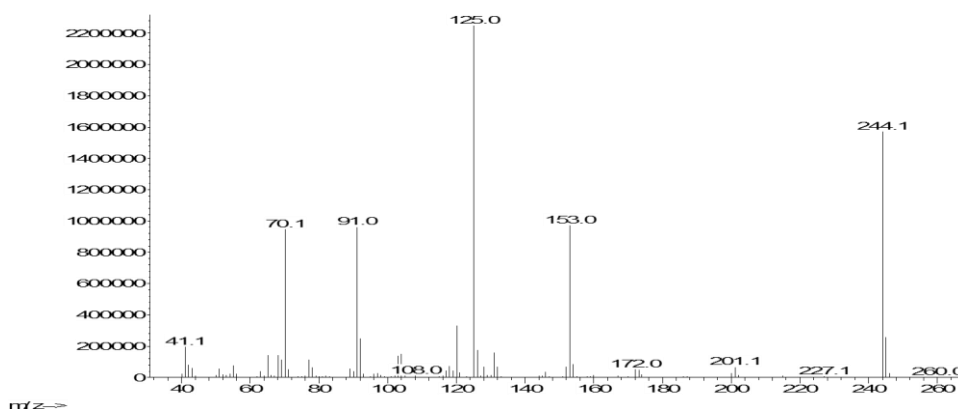
3.24. Μεταβολίτης 24

Ο μεταβολίτης **24** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.5 mg.



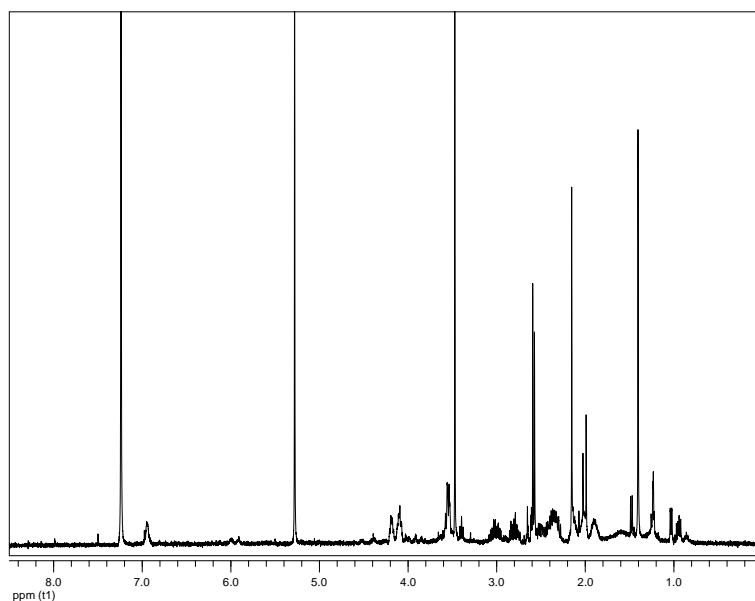
24

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **24** (Εικ. 102) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 244 και θραύσματα $[C_7H_9N_2O_2]^+$ και $[C_3H_7OS]^+$ σε m/z 153 και 91, αντίστοιχα.



Εικόνα 102. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **24**.

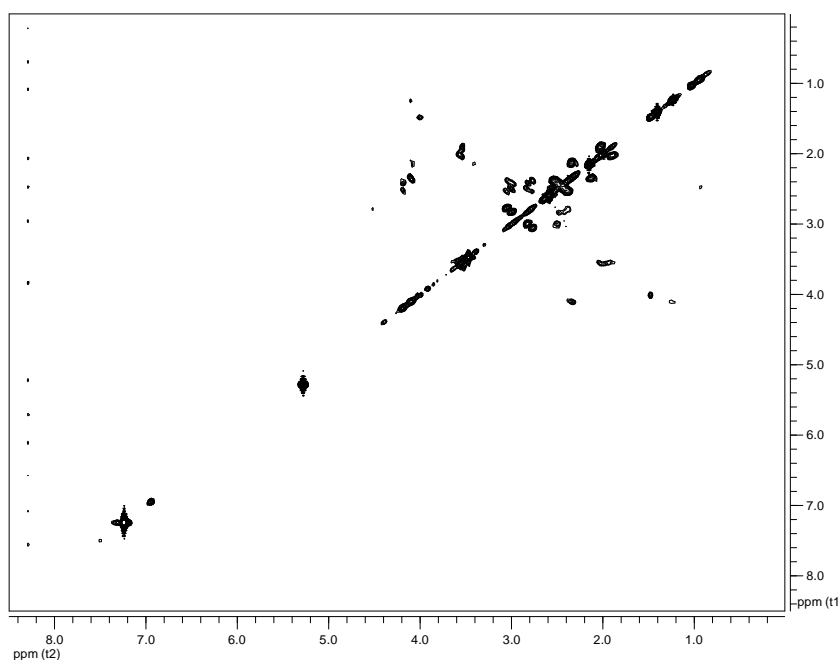
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **24** (Εικ. 103) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν τα σήματα που υποδείκνυαν την ύπαρξη 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου, δηλαδή αυτά των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων (4.10 και 4.19 ppm) και μόνο ενός ευκίνητου πρωτονίου μίας αμινομάδας (7.43 ppm), τα οποία σε συνδυασμό με τα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου (δ 3.55) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη μίας προλίνης στο μόριο. Ακόμη, παρατηρήθηκε μία απλή κορυφή, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια, σε χαρακτηριστική μετατόπιση (δ 2.59) για μεθύλια συνδεδεμένα σε άτομο θείου.



Εικόνα 103. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **24** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **24** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **24** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 104). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-6 / H₂-7 / H₂-8 / H₂-9 που παρέπεμπε σε μία προλίνη και ii) H-3 / H₂-10 / H₂-11 που παρέπεμπε σε μία μεθειονίνη.



Εικόνα 104. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **24** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **24** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-οξομεθειονίνη) [*cis*-cyclo(Pro-OMet)] (Yang et al., 2013), το οποίο δεν επέδειξε κυτταροτοξικότητα έναντι των κυτταρικών σειρών HaCaT (αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα) και B16 (μελάνωμα) (Noël et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **24** παρατίθενται στον Πίνακα 158.

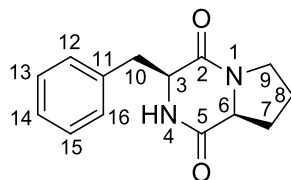
Πίνακας 158. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **24** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.19 (m)	4.24 (br s)
4	7.43 (s)	7.43 (s)
6	4.10 (m)	4.13 (t, 8.1)
7	2.36 (m), 2.14 (m)	2.35 (m), 2.17 (m)
8	2.02 (m), 1.89 (m)	2.03 (m), 1.90 (m)
9	3.55 (m)	3.59 (m)
10	2.50 (m), 2.36 (m)	2.50 (m), 2.41 (m)
11	3.02 (m), 2.79 (m)	2.99 (m), 2.86 (m)
12	2.59 (s)	2.62 (s)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Yang et al. (2013).

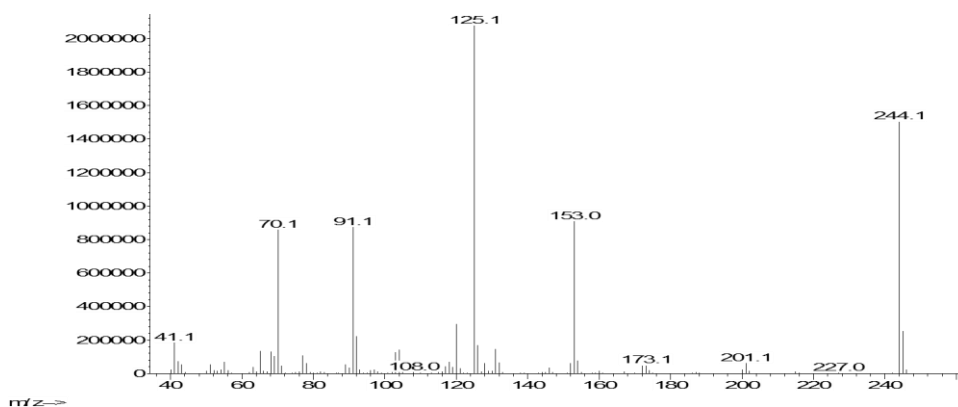
3.25. Μεταβολίτης 25

Ο μεταβολίτης **25** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υποκίτρινο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 27.7 mg.



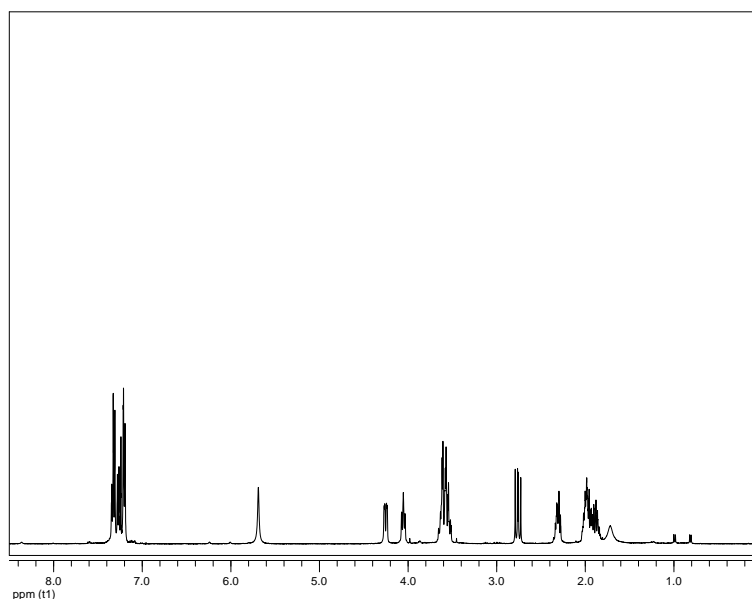
25

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **25** (Εικ. 105) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 244 και θραύσματα $[C_7H_9N_2O_2]^+$ και $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 153 και 91, αντίστοιχα.



Εικόνα 105. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **25**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **25** (Εικ. 106) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν τα σήματα που υποδείκνυαν την ύπαρξη 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου, δηλαδή αυτά των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων (4.05 και 4.25 ppm) και μόνο ενός ευκίνητου πρωτονίου μίας αμινομάδας (5.69 ppm), τα οποία σε συνδυασμό με τα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου (δ 3.59 και 3.62) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη μίας προλίνης στο μόριο. Ακόμη, παρατηρήθηκαν τρεις κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.18-7.36), οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

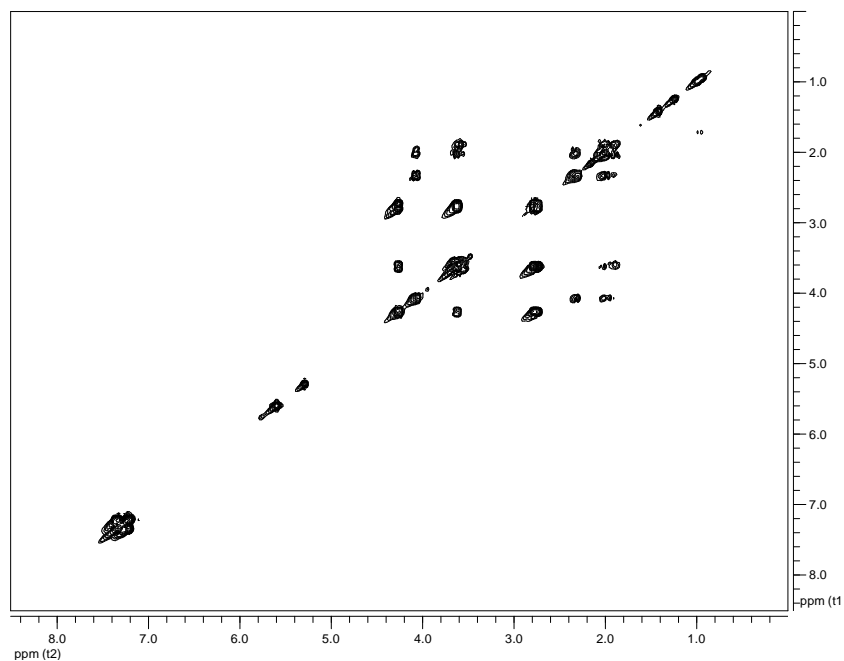


Εικόνα 106. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **25** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **25** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **25** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 107). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα που υπέδειξαν την παρουσία μίας φαινυλαλανίνης και μίας προλίνης.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **25** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-φαινυλαλανίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Phe)] (Adamczeski et al., 1995), το οποίο έχει δείξει αντιβιοεπιστρωτική έναντι της εγκατάστασης της προνύμφης του *B. amphitrite* (Li et al., 2006; Yang et al., 2007) και αντιφλεγμονώδη *in vitro* (Khan et al., 2015) δράση. Επίσης, ενώ εμφάνισε αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003), δεν παρουσίασε δράση σε διάφορα άλλα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων που μελετήθηκαν (Kumar et al., 2013). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **25** παρατίθενται στον Πίνακα 159.



Εικόνα 107. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **25** σε CDCl_3 .

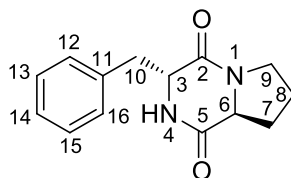
Πίνακας 159. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **25** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.25 (dd, 10.5, 3.5)	4.27 (dd, 10.6, 2.6)
4	5.69 (br s)	5.60 (br s)
6	4.05 (t, 8.0)	4.08 (t, 7.1)
7	2.31 (m), 2.02 (m)	2.4-2.3 (m), 2.1-2.0 (m)
8	2.02 (m), 1.88 (m)	1.9-1.8 (m)
9	3.62 (m), 3.59 (m)	3.7-3.6 (m), 3.6-3.5 (m)
10	3.62 (m), 2.76 (dd, 14.5, 10.5)	3.6-3.5 (m), 2.77 (dd, 14.4, 10.8)
12	7.20 (br d, 7.2)	7.4-7.2 (m)
13	7.33 (br t, 7.2)	7.4-7.2 (m)
14	7.26 (br t, 7.2)	7.4-7.2 (m)
15	7.33 (br t, 7.2)	7.4-7.2 (m)
16	7.20 (br d, 7.2)	7.4-7.2 (m)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Adamczeski et al. (1995).

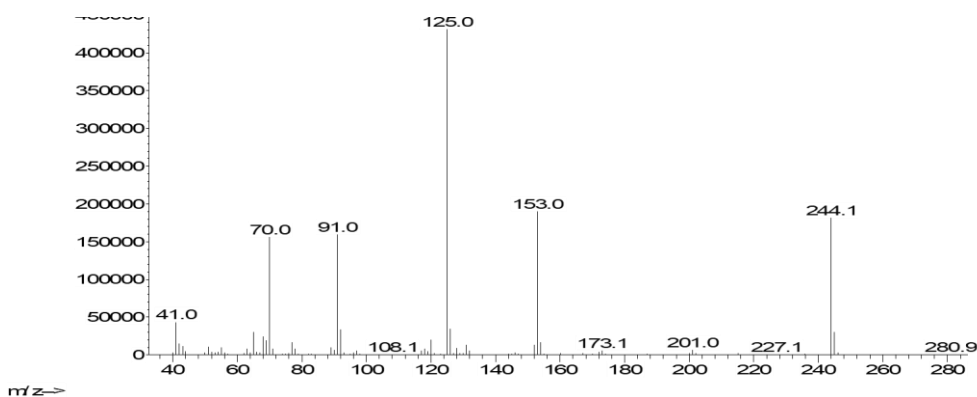
3.26. Μεταβολίτης 26

Ο μεταβολίτης **26** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 5.8 mg.



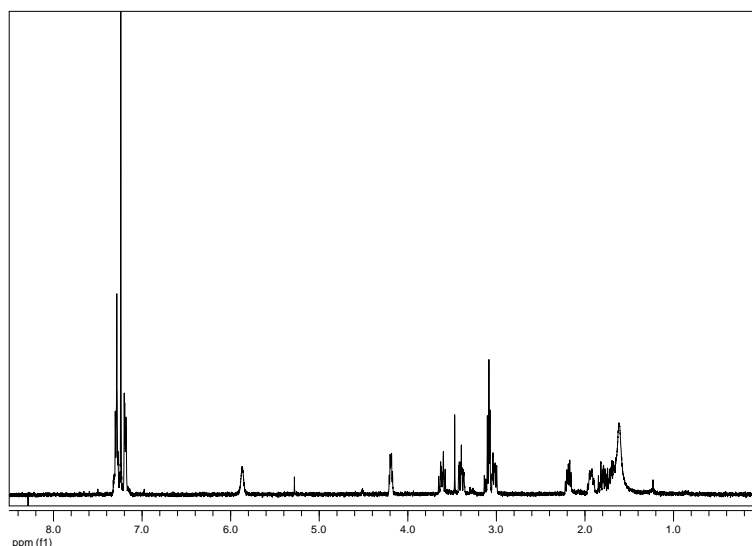
26

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **26** (Εικ. 108) ήταν αρκετά όμοιο με εκείνο του μεταβολίτη **25**, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερή μόρια.



Εικόνα 108. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **26**.

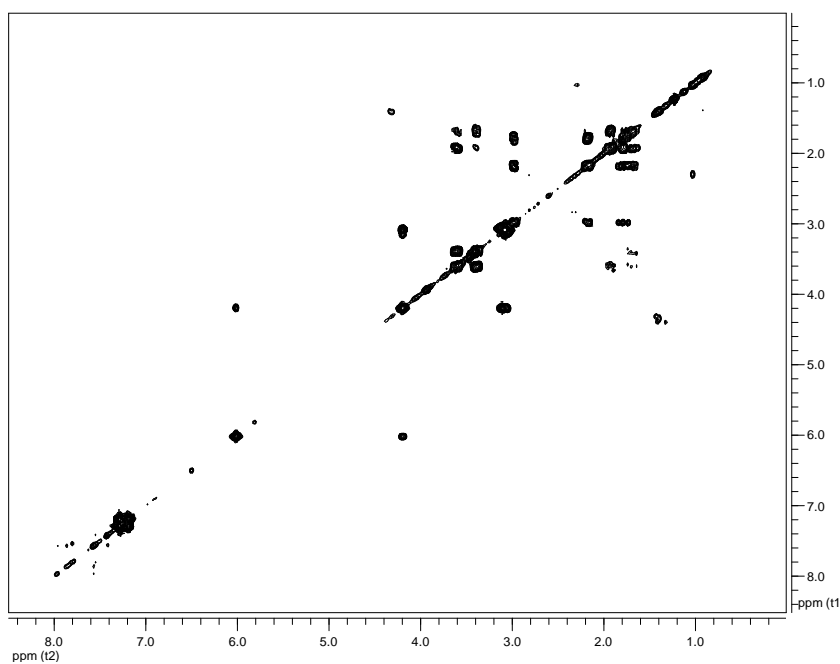
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **26** (Εικ. 109) σε CDCl_3 παρόμοια σήματα με αυτά του μεταβολίτη **25**, σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Χαρακτηριστική ήταν η θωράκιση του πρωτονίου H-6 στα 3.04 ppm που συνήθως παρατηρείται όταν τα μεθίλια H_α των δύο αμινοξέων έχουν αντίθετο προσανατολισμό στον χώρο.



Εικόνα 109. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **26** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **26** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **25** ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **26** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 110) και παρέπεμπαν, όπως και στον μεταβολίτη **25**, σε μία φαινυλαλανίνη και σε μία προλίνη.



Εικόνα 110. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **26** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **26** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *trans*-κυκλο(προλίνη-φαινυλαλανίνη) [*trans*-cyclo(Pro-Phe)] (Wang et al., 2010), το οποίο έχει δείξει *in vitro* αντιφλεγμονώδη (Nalli et al., 2017) και αντιβακτηριακή δράση έναντι του *V. anguillarum* (Fdhila et al., 2003), αλλά ήταν αδρανές σε διάφορα άλλα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων που μελετήθηκαν (Kumar et al., 2013). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **26** παρατίθενται στον Πίνακα 160.

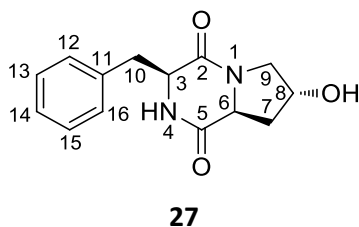
Πίνακας 160. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **26** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.19 (dt, 6.7, 4.3)	4.22 (m)
4	5.76 (br s)	6.49 (br s)
6	3.04 (dd, 10.4, 6.6)	2.91-2.94 (dd, 10.5, 6.5)
7	2.19 (m), 1.79 (m)	2.15-2.20 (m), 1.64-1.85 (m)
8	1.94 (m), 1.69 (m)	1.90-1.96 (m), 1.64-1.85 (m)
9	3.62 (ddd, 12.0, 9.4, 8.4), 3.40 (ddd, 12.0, 8.4, 3.0)	3.59-3.65 (m), 3.36-3.41 (m)
10	3.08 (m)	3.15 (dd, 13.5, 6.5), 3.06 (dd, 13.5, 4)
12	7.19 (br d, 7.2)	7.20-7.33 (m)
13	7.29 (br t, 7.2)	7.20-7.33 (m)
14	7.28 (br t, 7.2)	7.20-7.33 (m)
15	7.29 (br t, 7.2)	7.20-7.33 (m)
16	7.19 (br d, 7.2)	7.20-7.33 (m)

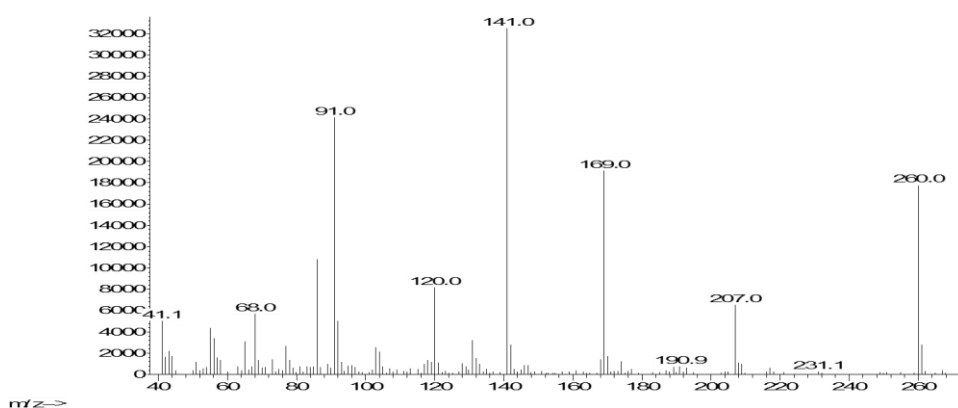
^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Wang et al. (2010).

3.27. Μεταβολίτης 27

Ο μεταβολίτης **27** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 14.4 mg.

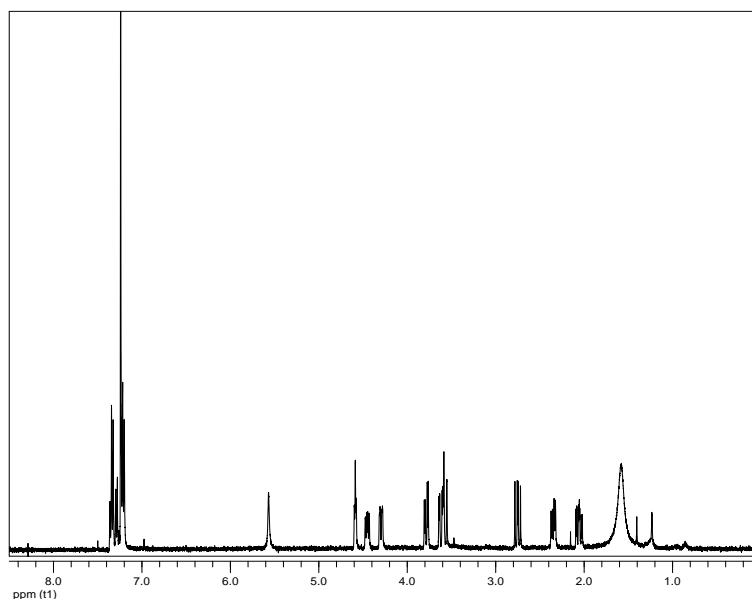


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **27** (Εικ. 111) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 260 και θραύσματα $[C_7H_9N_2O_2]^+$ και $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 169 και 91, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας την παρουσία ενός επιπλέον ατόμου οξυγόνου σε σύγκριση με τη δομή των μεταβολιτών **25** και **26**.



Εικόνα 111. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **27**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **27** (Εικ. 112) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με αυτά του μεταβολίτη **25**, με κυριότερη διαφορά την εμφάνιση μίας τριπλής κορυφής σε δ 4.59, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθινίου.

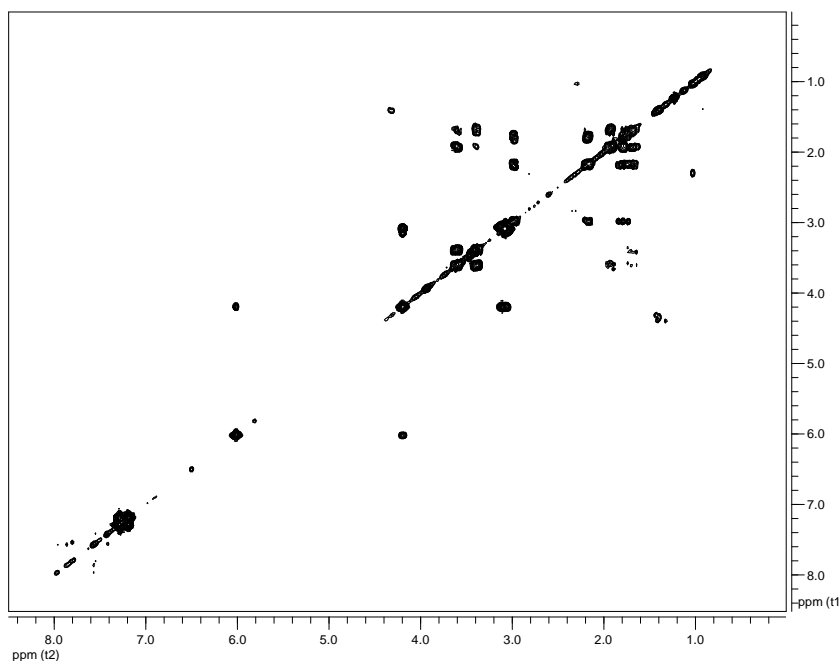


Εικόνα 112. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **27** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **27** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **27** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 113). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα μίας φαινυλαλανίνης και μίας 4-υποκατεστημένης προλίνης (H-6 / H₂-7 / H-8 / H₂-9).

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **27** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(*trans*-4-υδροξυπρολίνη-φαινυλαλανίνη) [*cis*-cyclo(*trans*-4-Hyp-Phe)] (Adamczeski et al., 1989), το οποίο έχει παρουσιάσει *in vitro* αντιφλεγμονώδη (Khan et al., 2015, Nalli et al., 2017) και αντιακή (Lin et al., 2017) δράση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **27** παρατίθενται στον Πίνακα 161.



Εικόνα 113. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **27** σε CDCl_3 .

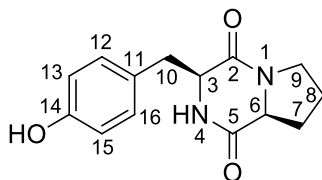
Πίνακας 161. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **27** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.30 (dd, 10.8, 3.6)	4.31 (dd, 10.7, 2.6)
4	5.57 (br s)	5.89 (br s)
6	4.45 (dd, 11.2, 6.4)	4.47 (dd, 11.1, 6.3)
7	2.35 (dd, 13.5, 6.4), 2.06 (ddd, 13.5, 11.2, 4.3)	2.36 (dd, 13.2, 6.2), 2.06 (ddd, 13.5, 11.4, 4.2)
8	4.59 (t, 4.3)	4.60 (t, 4.1)
9	3.78 (dd, 13.4, 4.3), 3.57 (d, 13.4)	3.80 (dd, 13.2, 4.5), 3.58 (d, 13.8)
10	3.62 (dd, 14.5, 3.6), 2.75 (dd, 14.5, 10.8)	3.63 (dd, 15.9, 3.9), 2.77 (dd, 14.6, 10.9)
12	7.21 (br d, 7.4)	7.29 (br m)
13	7.34 (br t, 7.4)	7.29 (br m)
14	7.28 (br t, 7.4)	7.29 (br m)
15	7.34 (br t, 7.4)	7.29 (br m)
16	7.21 (br d, 7.4)	7.29 (br m)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Adamczeski et al. (1989).

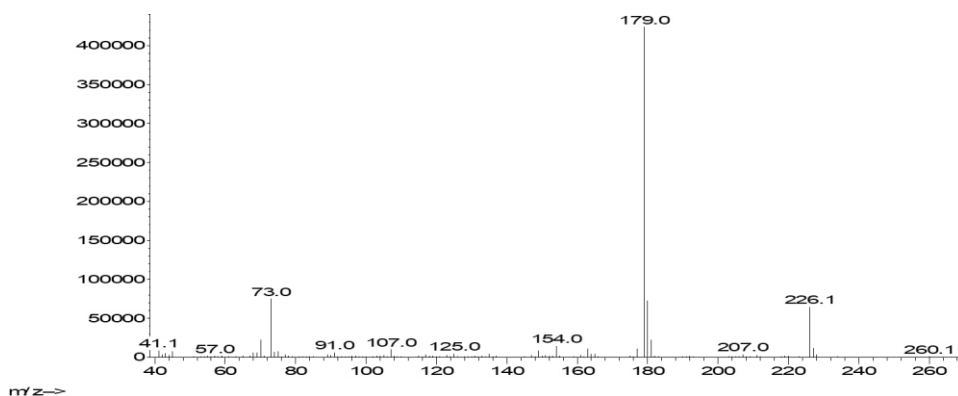
3.28. Μεταβολίτης 28

Ο μεταβολίτης **28** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 13.2 mg.



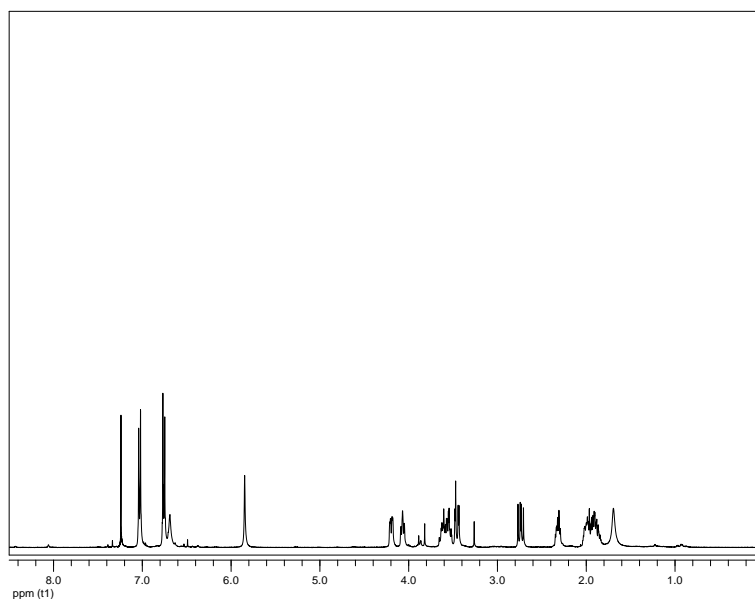
28

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **28** (Εικ. 114) εμφάνισε το ίδιο μοριακό ιόν με τον μεταβολίτη **27** ($[M]^+$ σε m/z 260), αλλά διαφορετικά θραύσματα $[C_7H_{10}N_2O_2]^+$ και $[C_7H_7O]^+$ σε m/z 154 και 107, αντίστοιχα.



Εικόνα 114. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **28**.

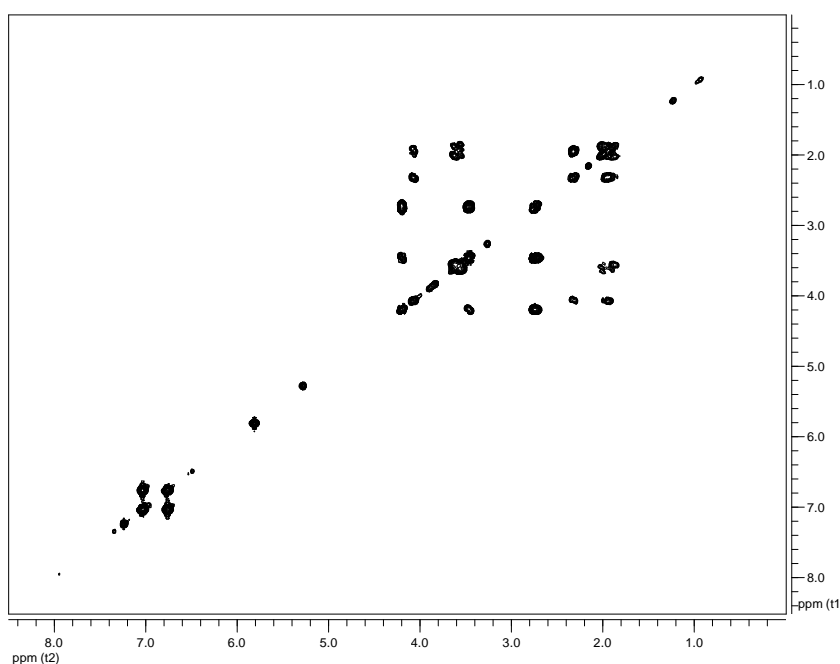
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **28** (Εικ. 115) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **25**. Η κύρια διαφορά του εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίζονταν δύο διπλές κορυφές (δ 6.76 και 7.03), οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 115. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **28** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **28** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **27** ($\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερείς ενώσεις.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **28** έγινε με τη βοήθεια των ομοπυρηνικών συζεύξεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 116) και καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία τυροσίνη και σε μία προλίνη.



Εικόνα 116. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **28** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **28** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-τυροσίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Tyr)] (Kumar et al., 2014b), το οποίο έχει εμφανίσει αντιφλεγμονώδη δράση *in vitro* και *in vivo* σε επίμυες (Kang et al., 2016), αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση σε διάφορα στελέχη που μελετήθηκαν και κυτταροτοξική δράση σε διάφορες καρκινικές σειρές (Mangamuri et al., 2016a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **28** παρατίθενται στον Πίνακα 162.

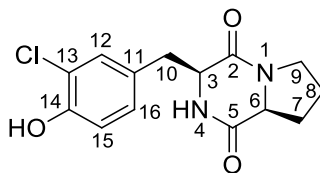
Πίνακας 162. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **28** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.20 (dd, 10.1, 3.5)	4.24 (dd, 10.0, 3.0)
4	5.85 (br s)	5.92 (s)
6	4.07 (t, 7.9)	4.1 (t, 7.5)
7	2.32 (m), 1.94 (m)	2.34 (m), 2.03 (m)
8	2.07 (m), 1.87 (m)	1.93 (m)
9	3.63 (m), 3.55 (m)	3.65 (m), 3.58 (m)
10	3.46 (dd, 14.6, 3.5), 2.74 (dd, 14.6, 10.1)	3.49 (dd, 14.5, 4.0), 2.77 (dd, 14.5, 10.0)
12	7.03 (d, 8.6)	7.06 (d, 8.0)
13	6.76 (d, 8.6)	6.79 (d, 8.0)
15	6.76 (d, 8.6)	6.79 (d, 8.0)
16	7.03 (d, 8.6)	7.06 (d, 8.0)
OH	6.69 (br s)	6.88 (s)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Kumar et al. (2014b).

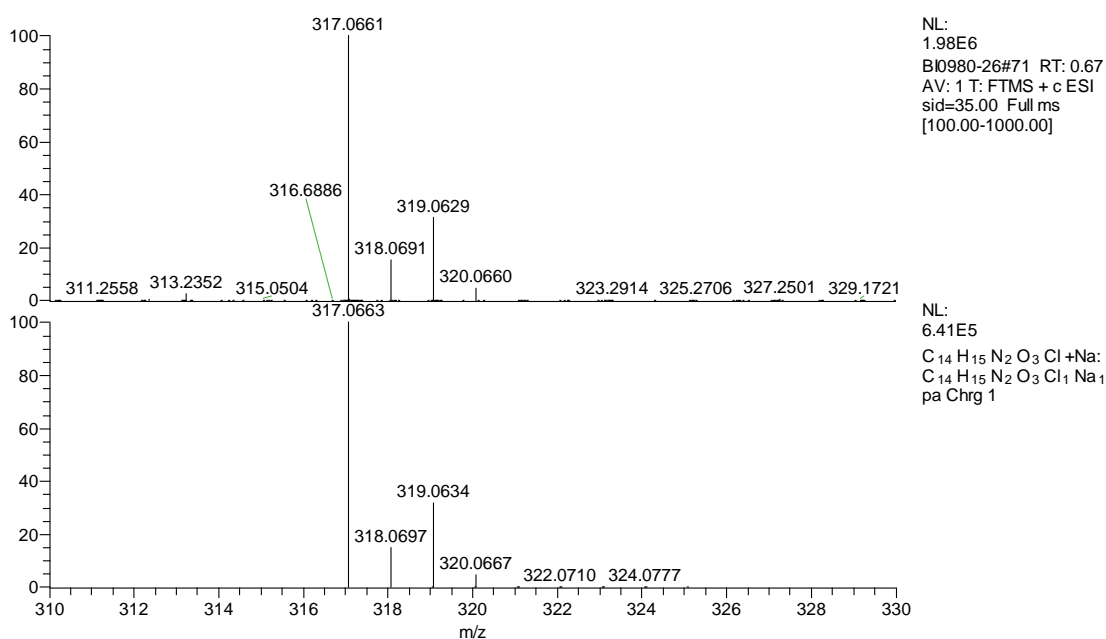
3.29. Μεταβολίτης 29

Ο μεταβολίτης **29** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.6 mg.



29

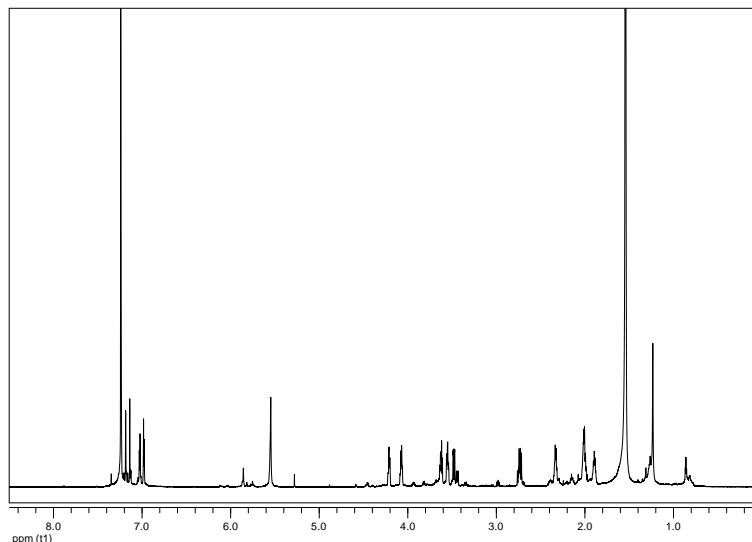
Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **29** (Εικ. 117) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 317.0660, με ισοτοπική κορυφή σε m/z 319.0629, σε αναλογία 3:1 που υποδείκνυε την ύπαρξη ενός ατόμου χλωρίου στο μόριο.



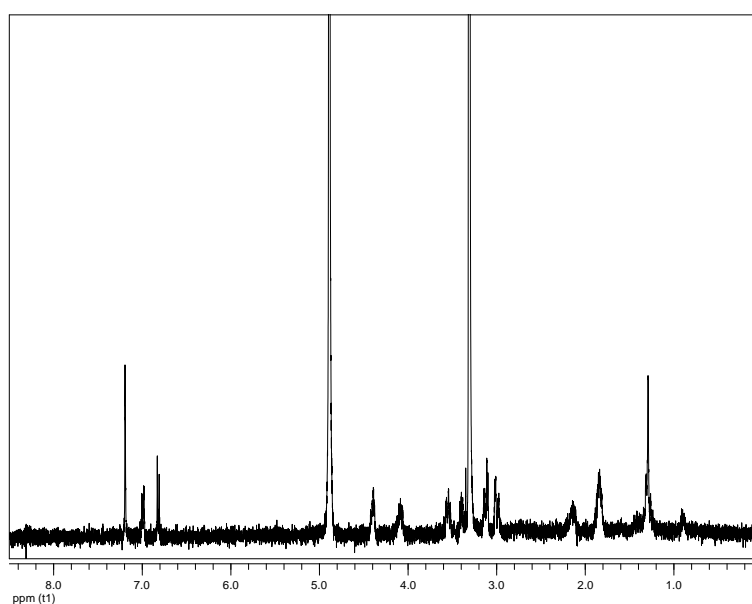
Εικόνα 117. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **29**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **29** (Εικ. 118) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με αυτά του μεταβολίτη **28**. Η κυριότερη διαφορά εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίστηκαν τρεις κορυφές (δ 6.98, 7.03 και 7.18) που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και ήταν χαρακτηριστικές ενός 1,2,4-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **29** (Εικ. 119) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτό του ευκίνητου πρωτονίου που είχε ανταλλαχθεί με δευτέριο.



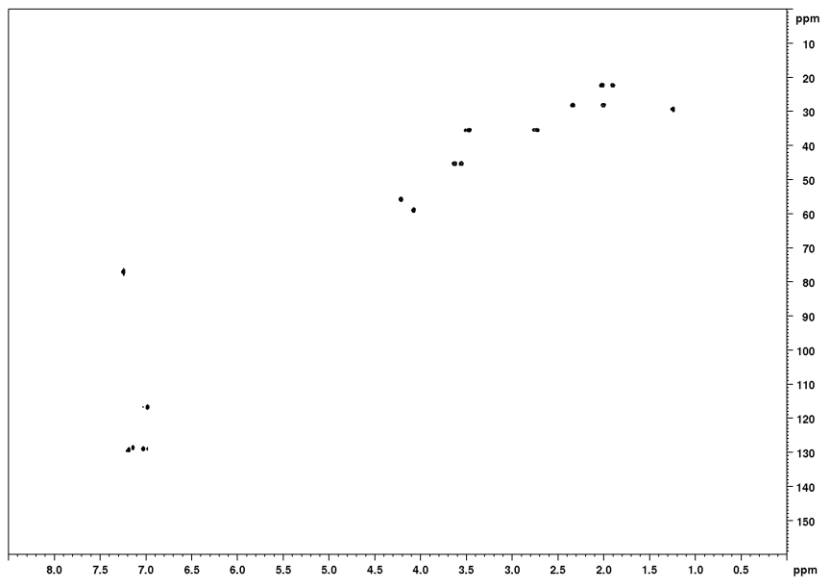
Εικόνα 118. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **29** σε CDCl_3 .



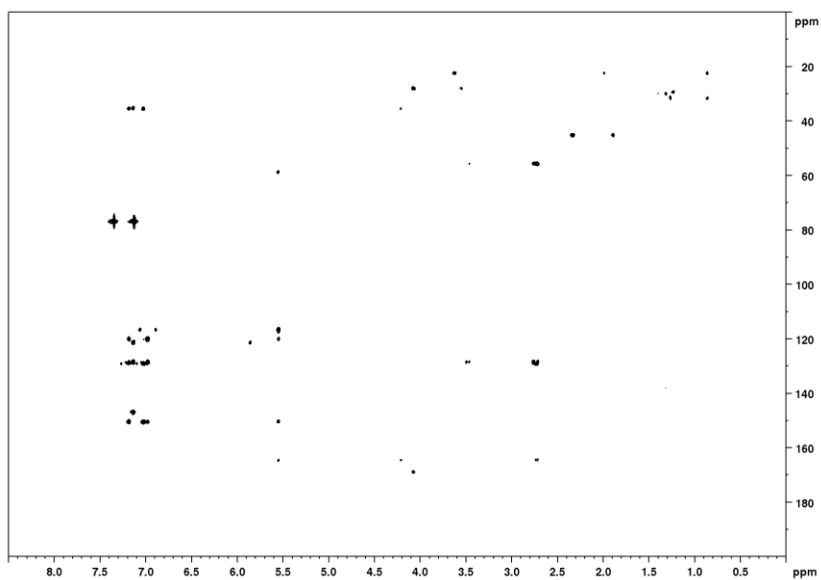
Εικόνα 119. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **29** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 120) και HMBC (Εικ. 121) έγινε εμφανής η παρουσία δεκατεσσάρων ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε τέσσερα δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και πέντε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν δύο μεθίλια σε δ 4.21 / 55.8 και δ 4.07 / 59.0 που

αποδόθηκαν σε δύο μεθίλια H_α δύο αμινοξέων, έξι sp² άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 164.7 και 169.1 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



Εικόνα 120. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **29** σε CDCl₃.

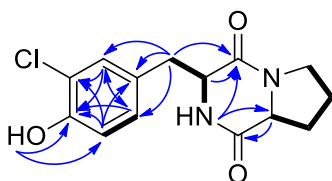


Εικόνα 121. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **29** σε CDCl₃.

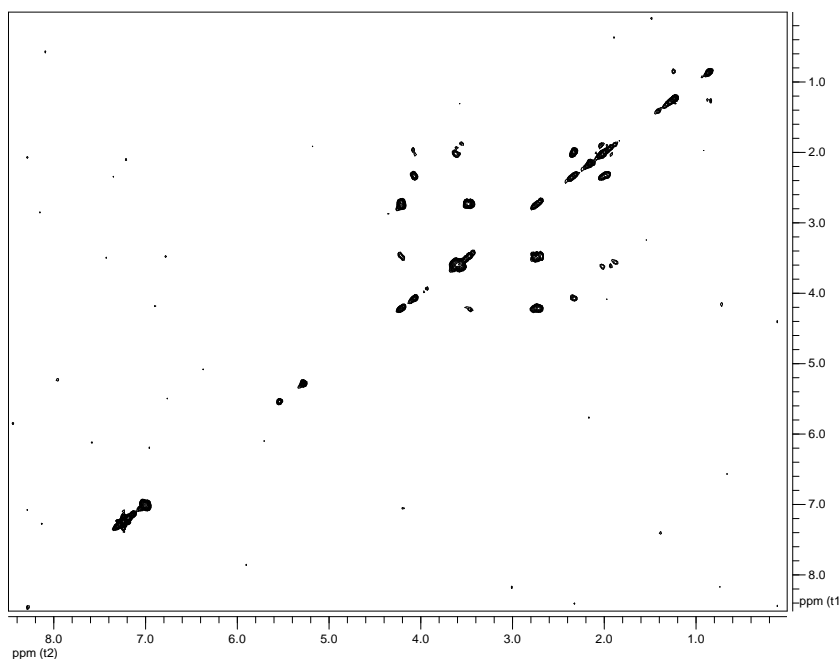
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **29** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₄H₁₅N₂O₃Cl. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι

τρικυκλικό.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **29** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 122) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 123). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY επιβεβαίωσαν την παρουσία μίας υποκατεστημένης τυροσίνης και μίας προλίνης. Οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **29**.

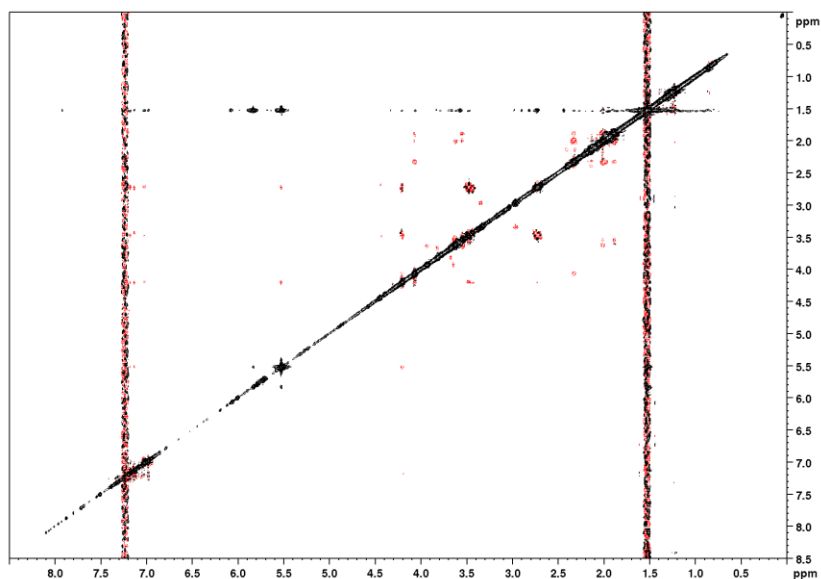


Εικόνα 122. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **29**.



Εικόνα 123. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **29** σε CDCl₃.

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **29** πραγματοποιήθηκε με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 124). Η συσχέτιση NOE των πρωτονίων H-3 και H-6 καθόρισε τον ομοεπίπεδο (*cis*) προσανατολισμό τους.



Εικόνα 124. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **29** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **29** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το συνθετικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-3-χλωρο-τυροσίνη) [*cis*-cyclo(Pro-3-chloro-Tyr)], το οποίο απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή (Bobylen et al., 1996). Το βρωμιωμένο ανάλογο του **29** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από στέλεχος του ακτινοβακτηρίου *Nocardia ignorata* (Noël et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **29** παρατίθενται στον Πίνακα 163.

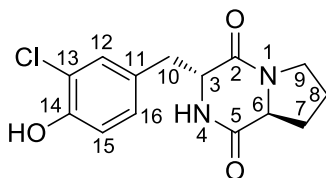
Πίνακας 163. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **29** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	$\delta_H^{a,b}$	δ_H^c
2	164.7	-	-	-
3	55.8	4.21 (td, 10.0, 3.3)	4.23 (dd, 9.5, 3.3)	4.39 (m)
4	-	5.55 (br s)	5.61 (s)	
5	169.1	-	-	-
6	59.0	4.07 (m)	4.09 (t, 7.3)	4.08 (m)
7	28.2	2.33 (m), 2.00 (m)	2.33 (m), 1.99 (m)	2.14 (m), 1.29 (m)
8	22.4	2.00 (m), 1.89 (m)	1.99 (m)	1.84 (m)
9	45.3	3.55 (ddd, 11.5, 9.0, 2.4)	3.58 (m)	3.54 (m), 3.40 (m)
10	35.5	3.48 (dd, 14.8, 3.3), 2.73 (dd, 14.8, 10.0)	3.50 (dd, 14.7, 4.0), 2.76 (dd, 14.7, 10.0)	3.12 (dd, 14.4, 4.5), 3.00 (dd, 14.6, 4.3)
11	128.8	-	-	-
12	129.3	7.18 (d, 2.0)	7.21 (d, 1.9)	7.19 (br s)
13	120.2	-	-	-
14	150.6	-	-	-
15	116.7	6.98 (d, 8.2)	6.98 (d, 8.3)	6.82 (d, 8.4)
16	129.0	7.03 (dd, 8.2, 2.0)	7.04 (dd, 8.3, 1.9)	6.99 (dd, 8.5, 1.9)
OH	-	5.55 (br s)		

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Bobylev et al. (1996). ^c Σε CD₃OD.

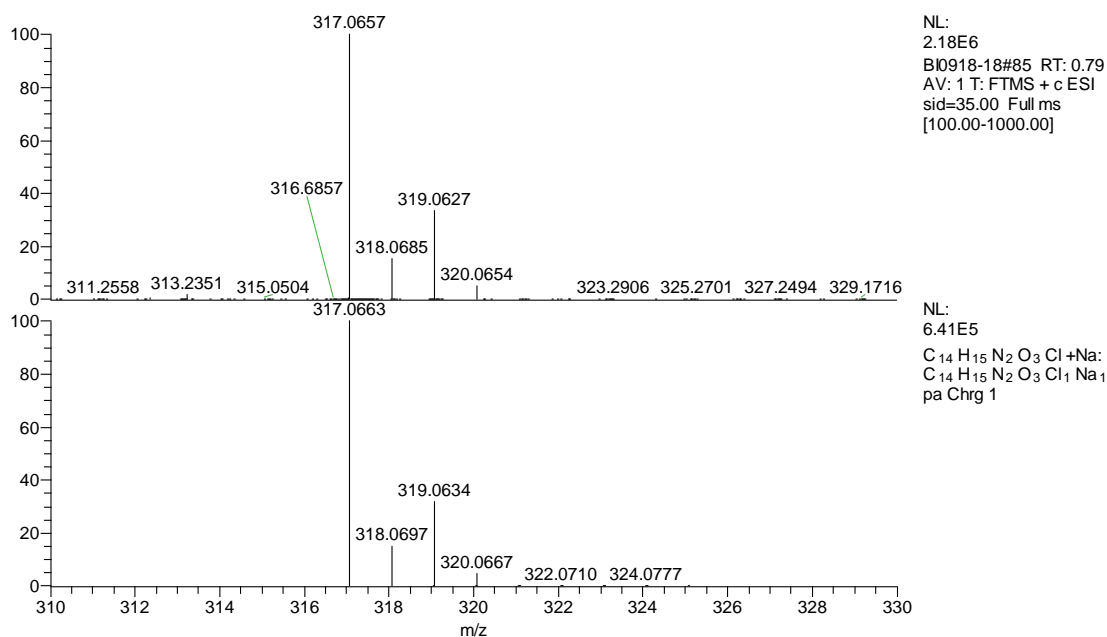
3.30. Μεταβολίτης 30

Ο μεταβολίτης **30** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.3 mg.



30

Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **30** (Εικ. 125) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 317.0657 με ισοτοπική κορυφή σε m/z 319.0627 σε αναλογία 3:1 που υποδεικνυε την ύπαρξη ενός ατόμου χλωρίου στο μόριο, όπως και στη περίπτωση του **29**.

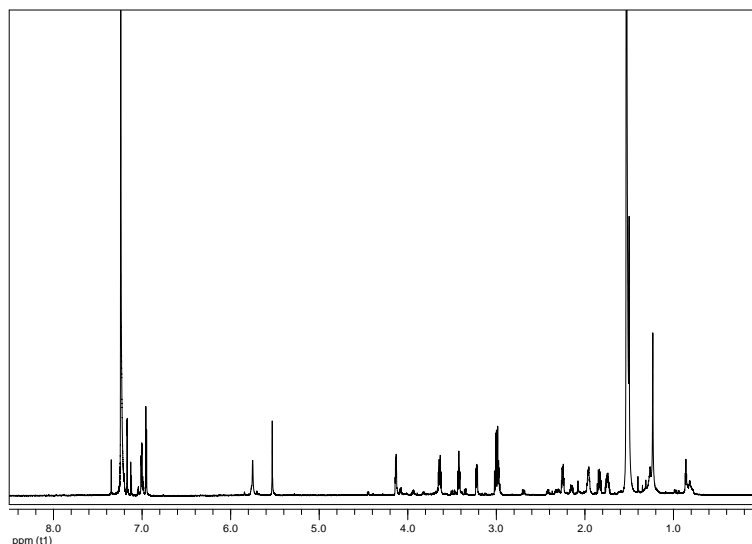


Εικόνα 125. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **30**.

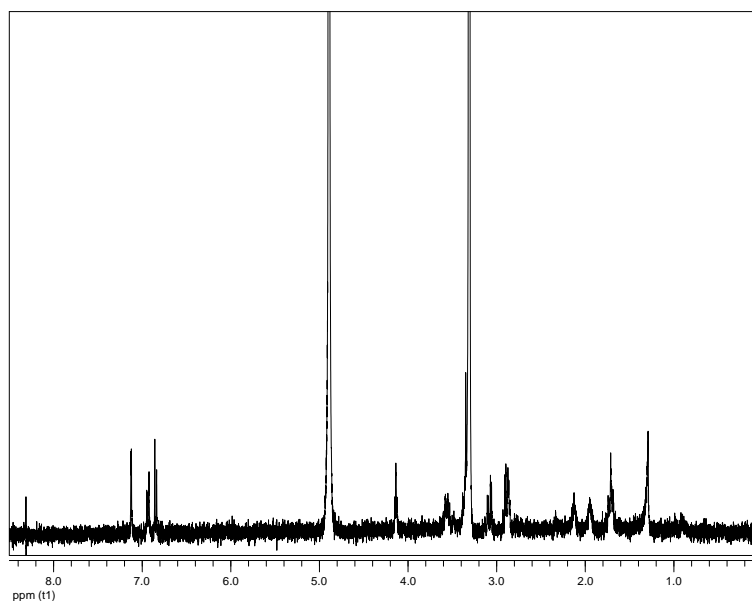
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **30** (Εικ. 126) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **29**, σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Χαρακτηριστική ήταν η θωράκιση του πρωτονίου H-6 στα 3.22 ppm που συνήθως παρατηρείται όταν τα μεθίλια H_α των δύο αμινοξέων έχουν αντίθετο προσανατολισμό στον

χώρο.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **30** (Εικ. 127) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτό του ευκίνητου πρωτονίου που είχε ανταλλαχθεί με δευτέριο.



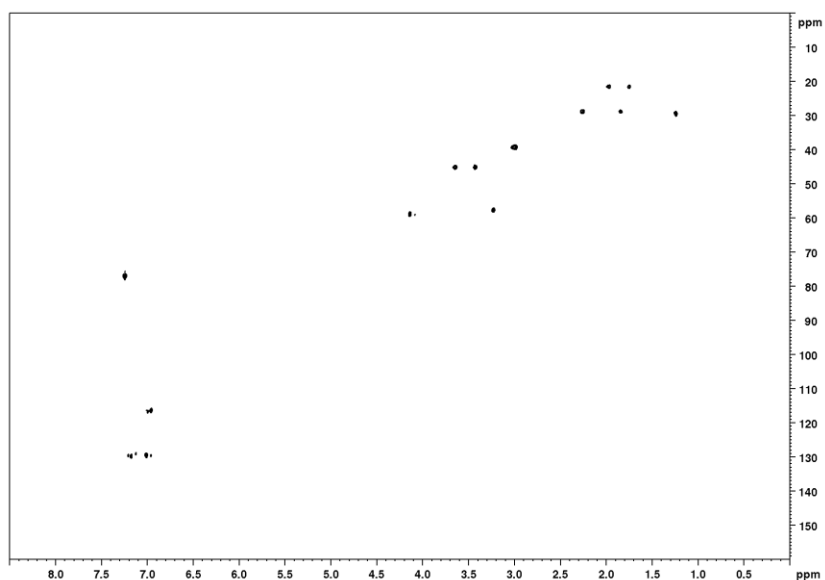
Εικόνα 126. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **30** σε CDCl_3 .



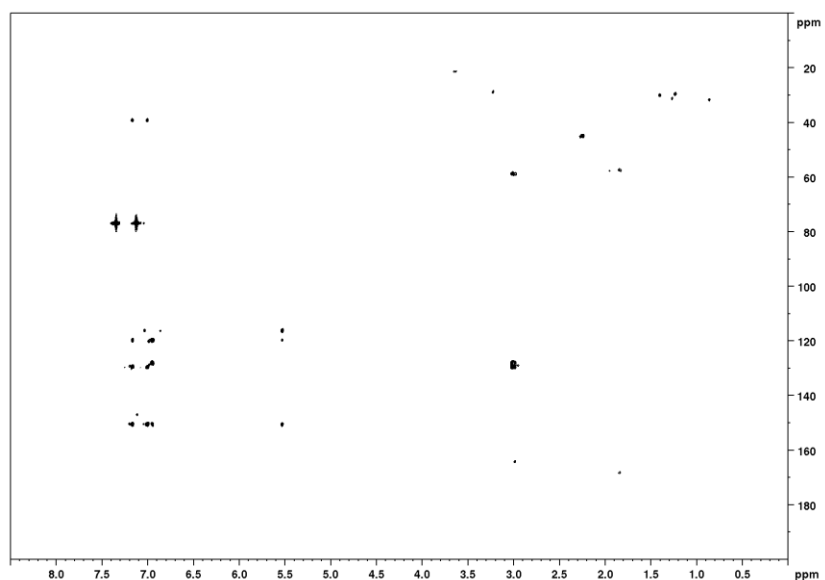
Εικόνα 127. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **30** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 128) και HMBC (Εικ. 129) έγινε εμφανής η παρουσία δεκατεσσάρων ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε τέσσερα δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και πέντε τεταρτοταγή άτομα

άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν δύο μεθίνα σε δ 4.13 / 58.9 και δ 3.22 / 57.6 που αποδόθηκαν σε δύο μεθίνα H_α δύο αμινοξέων, έξι sp² άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 164.4 και 168.4 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



Εικόνα 128. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **30** σε CDCl₃.

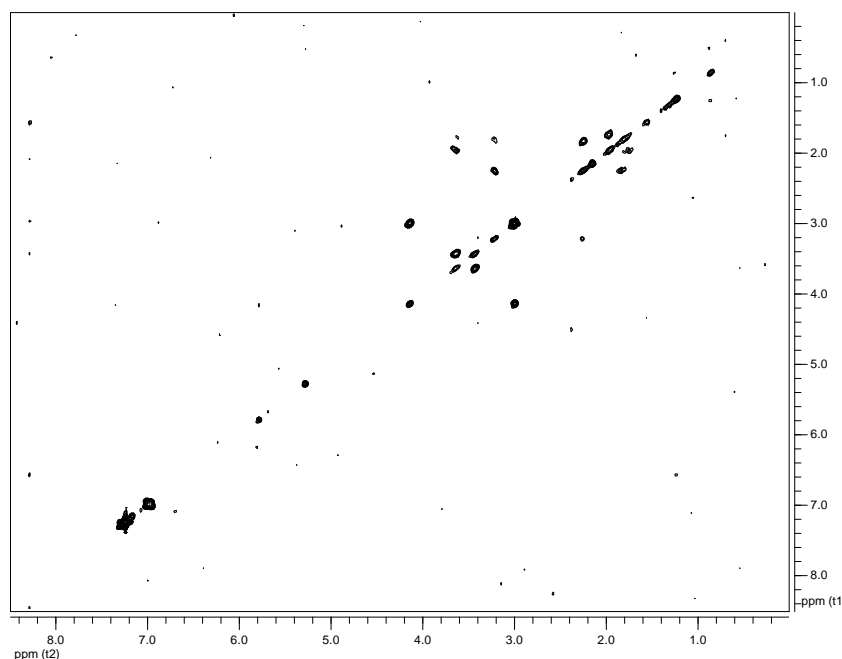


Εικόνα 129. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **30** σε CDCl₃.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **30** οδήγησε στον ίδιο μοριακό τύπο με αυτόν του μεταβολίτη **29** (C₁₄H₁₅N₂O₃Cl), υποδεικνύοντας ότι πρόκειται

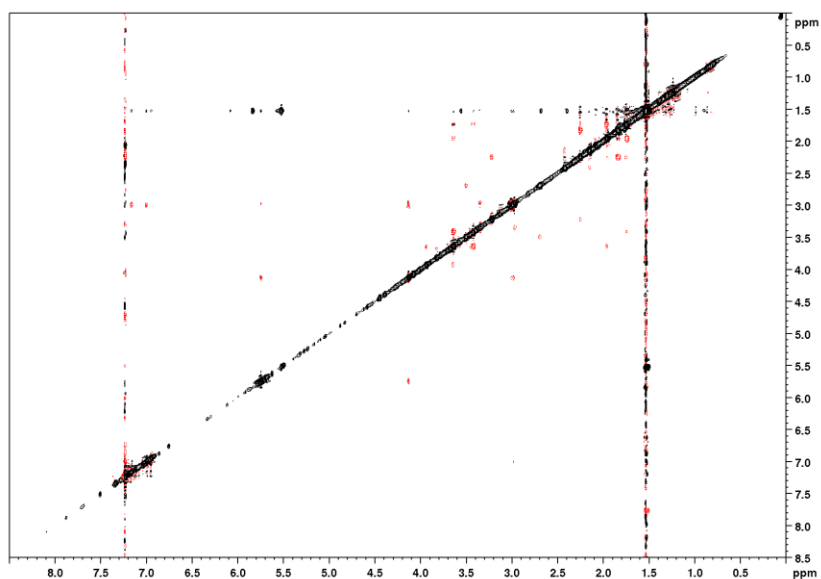
για ισομερείς ενώσεις.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **30** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 130). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY και οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC επιβεβαίωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **30**, σε πλήρη αντιστοιχία με τον **29**.



Εικόνα 130. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **30** σε CDCl_3 .

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των δύο ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **30**, ο οποίος αποτελεί στερεοϊσομερές του **29**, πραγματοποιήθηκε με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 131). Σε αντίθεση με τον μεταβολίτη **29**, η απουσία συσχέτισης μεταξύ των πρωτονίων H-3 και H-6, σε συνδυασμό με την θωράκιση του H-6 (δ 3.22 αντί για 4.07 στον **29**), υπέδειξε τον αντιπαράλληλο (*trans*) προσανατολισμό τους.



Εικόνα 131. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **30** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **30** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, τη *trans*-κυκλο(προλίνη-3-χλωρο-τυροσίνη) [*trans*-cyclo(Pro-3-chloro-Tyr)], το οποίο αποτελεί στερεοϊσομερές του μεταβολίτη **29**. Το βρωμιωμένο ανάλογο του **30** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από στέλεχος του ακτινοβακτηρίου *N. ignorata* (Noël et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **30** παρατίθενται στον Πίνακα 164.

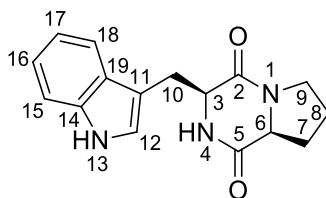
Πίνακας 164. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **30** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_C^a	δ_H^a	δ_H^b
2	164.4	-	-
3	58.9	4.13 (ddd, 7.0, 4.2, 3.5)	4.14 (t, 4.6)
4	-	5.75 (br s)	
5	168.4	-	-
6	57.6	3.22 (dd, 10.8, 6.6)	2.86 (m)
7	28.7	2.25 (dt, 12.0, 6.6), 1.84 (ddd, 12.0, 10.8, 7.5)	2.13 (m), 1.71 (m)
8	21.5	1.96 (m), 1.74 (m)	1.95 (m), 1.71 (m)
9	45.1	3.64 (dt, 11.9, 8.4), 3.42 (ddd, 11.9, 9.3, 2.8)	3.56 (m), 3.36 (m)
10	39.2	3.01 (dd, 14.0, 7.0), 2.98 (dd, 14.0, 4.2)	3.08 (dd, 13.9, 4.6), 2.88 (dd, 13.9, 4.6)
11	128.4	-	-
12	129.7	7.17 (d, 2.0)	7.13 (d, 2.3)
13	120.0	-	-
14	150.8	-	-
15	116.3	6.95 (d, 8.3)	6.85 (d, 8.1)
16	129.5	7.00 (dd, 8.3, 2.0)	6.94 (dd, 8.1, 2.3)
OH	-	5.53 (br s)	

^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD.

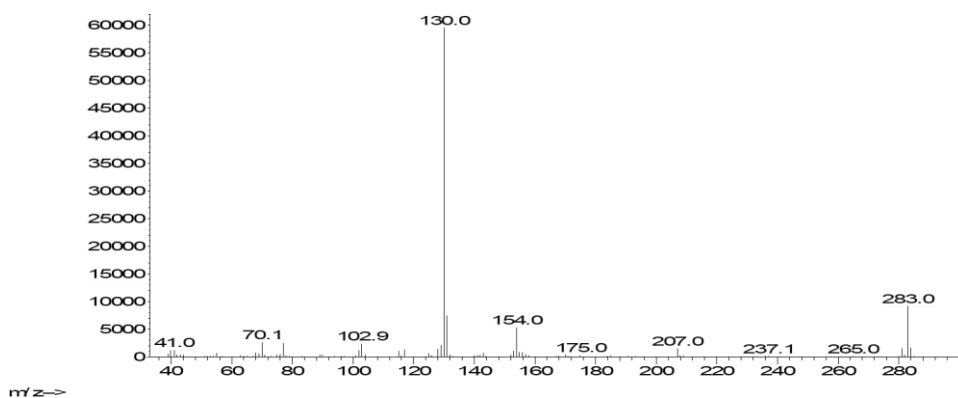
3.31. Μεταβολίτης 31

Ο μεταβολίτης **31** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.9 mg.



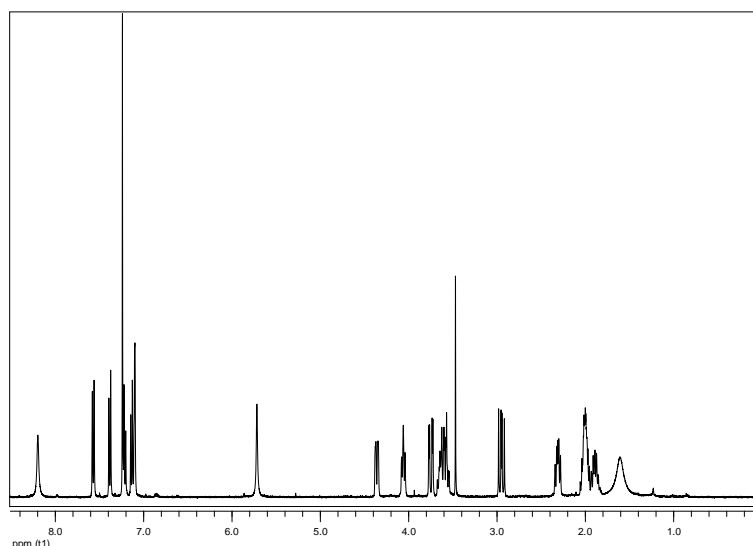
31

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **31** (Εικ. 132) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 283 και θραύσματα $[C_7H_{10}N_2O_2]^+$ και $[C_9H_8N]^+$ σε m/z 154 και 130, αντίστοιχα.



Εικόνα 132. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **31**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **31** (Εικ. 133) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα που υποδείκνυαν την ύπαρξη 2,5-δικετοπιπεραζινικού δακτυλίου, δηλαδή αυτά των μεθινίων H_α δύο αμινοξέων (4.06 και 4.36 ppm) και μόνο ενός ευκίνητου πρωτονίου μίας αμινομάδας (5.72 ppm), τα οποία σε συνδυασμό με τα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου (δ 3.60) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη μίας προλίνης στο μόριο. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν έξι σχετικά αποθωρακισμένες κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.10, 7.13, 7.22, 7.38, 7.57 και 8.20), οι οποίες αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός ινδολικού συστήματος.

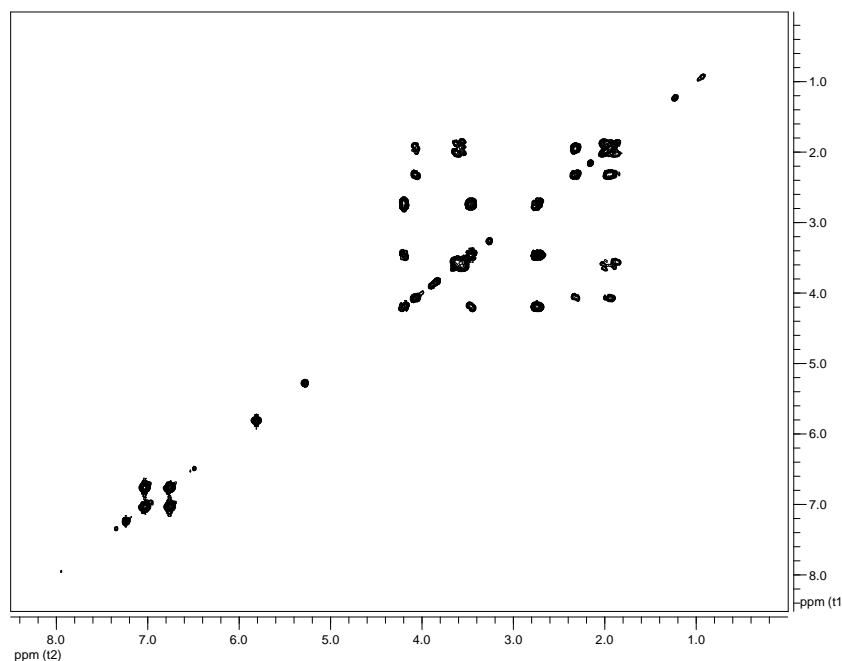


Εικόνα 133. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **31** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **31** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και το ινδολικό σύστημα ως οκτώ από τους δέκα βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τετρακυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **31** έγινε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 134). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν τέσσερα απομονωμένα spin συστήματα που παρέπεμπαν σε μία προλίνη και μία τρυπτοφάνη.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **31** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-τρυπτοφάνη) [*cis*-cyclo(Pro-Trp)] (Caballero et al., 2003), το οποίο έχει δείξει αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι της εγκατάστασης της προνύμφης του *B. amphitrite* (Li et al., 2006), αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση σε διάφορα στελέχη βακτηρίων και μυκήτων που μελετήθηκαν, καθώς και ήπια κυτταροτοξικότητα έναντι κάποιων καρκινικών σειρών, χωρίς να είναι τοξικό σε φυσιολογικά κύτταρα (Mangamuri et al., 2016b; Kumar et al., 2014a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **31** παρατίθενται στον Πίνακα 165.



Εικόνα 134. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **31** σε CDCl_3 .

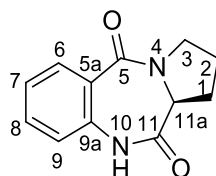
Πίνακας 165. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **31** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.36 (dd, 10.9, 3.3)	4.37 (dd, 10.6, 2.3)
4	5.72 (br s)	5.83 (s)
6	4.06 (t, 8.0)	4.07 (m)
7	2.31 (m), 2.00 (m)	2.32 (m), 1.97 (m)
8	2.00 (m), 1.89 (m)	1.97 (m)
9	3.60 (m)	3.59 (m)
10	3.75 (dd, 15.1, 3.3), 2.95 (dd, 15.1, 10.9)	3.75 (dd, 15.1, 3.2), 2.97 (dd, 15.0, 10.7)
12	7.10 (br s)	7.08 (d, 1.9)
13	8.20 (br s)	8.55 (br s)
15	7.38 (br d, 8.0)	7.39 (d, 8.0)
16	7.22 (br t, 8.0)	7.22 (td, 8.0, 1.7)
17	7.13 (br t, 8.0)	7.13 (td, 7.9, 0.9)
18	7.57 (br d, 8.0)	7.59 (d, 7.8)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Caballero et al. (2003).

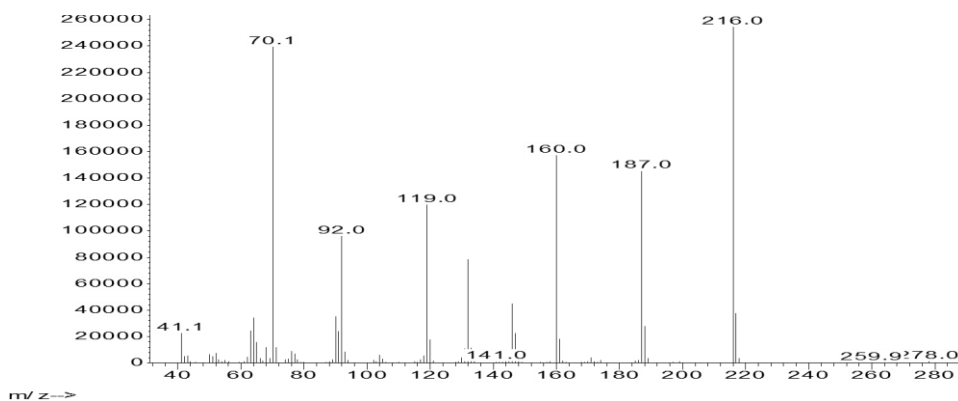
3.32. Μεταβολίτης 32

Ο μεταβολίτης **32** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 52.6 mg.



32

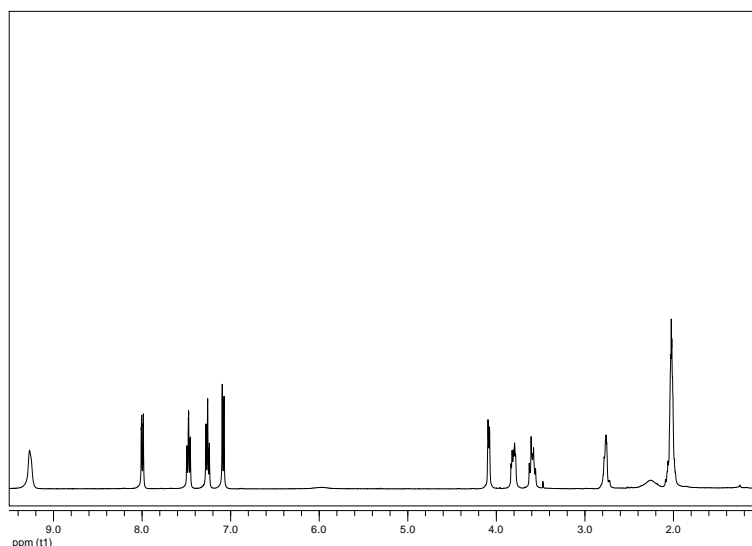
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **32** (Εικ. 135) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 216.



Εικόνα 135. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **32**.

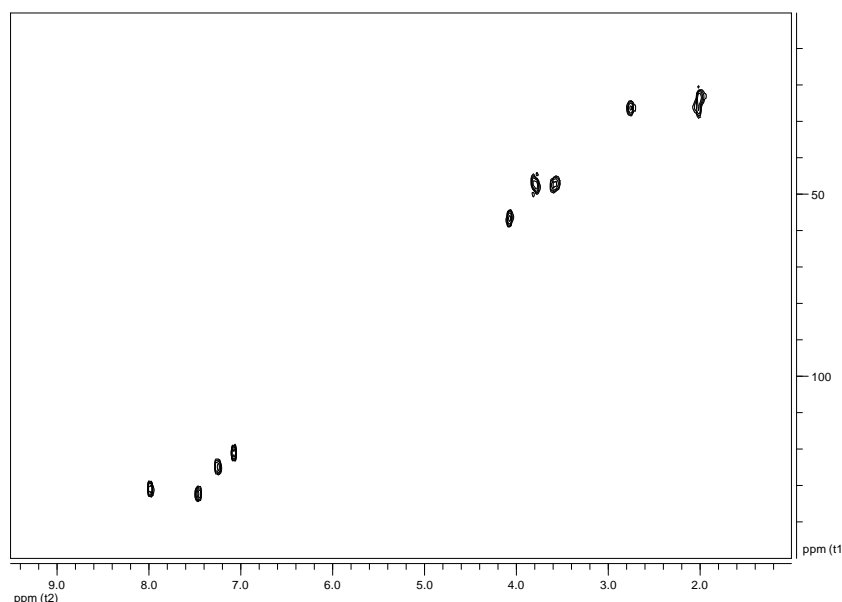
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **32** (Εικ. 136) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν:

- Δύο πολλαπλές κορυφές σε δ 3.60 και 3.81, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου.
- Μία διπλή κορυφή σε δ 4.06, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο μεθίλιο H_α ενός αμινοξέος.
- Τέσσερις κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.08, 7.26, 7.46 και 7.99), οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και με βάση τις πολλαπλότητες τους αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός 1,2-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.
- Μια ευρεία απλή κορυφή σε δ 9.27, οι οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα ευκίνητο πρωτόνιο.

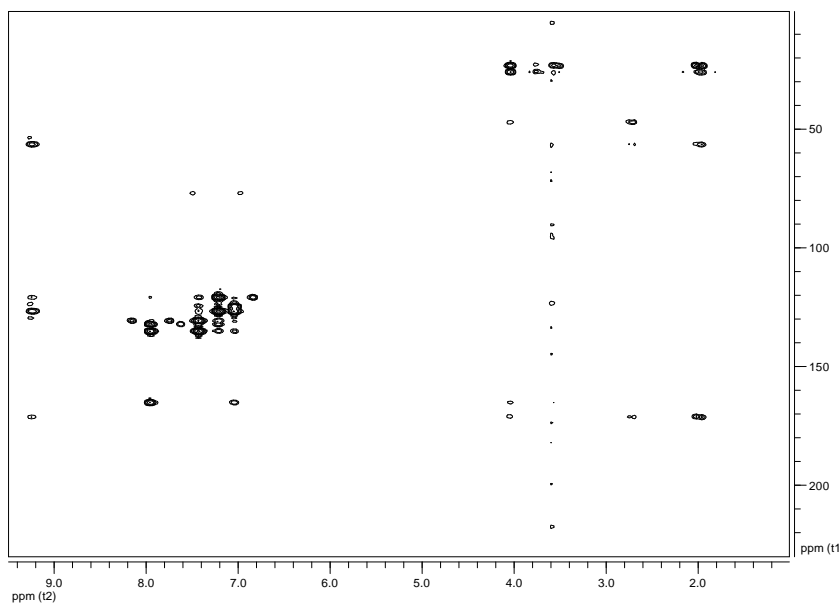


Εικόνα 136. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **32** σε CDCl_3 .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 137) και HMBC (Εικ. 138) έγινε εμφανής η παρουσία 12 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε τρία δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και τέσσερα τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου, καθώς και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 165.0 και 171.1 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



Εικόνα 137. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **32** σε CDCl_3 .

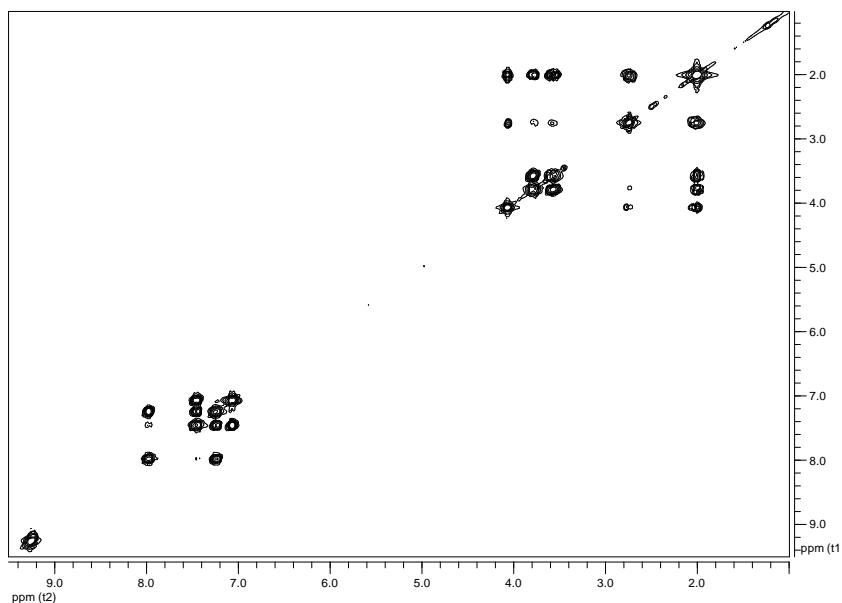


Εικόνα 138. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **32** σε $CDCl_3$.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **32** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{12}H_{12}N_2O_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων του μεταβολίτη **32** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 139). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) H-11a / H₂-1 / H₂-2 / H₂-3 που παρέπεμπε σε μία προλίνη και ii) H-6 / H-7 / H-8 / H-9 που παρέπεμπε σε έναν 1,2-υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **32** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν κυκλοανθρανιλυλο-*L*-προλίνη (cycloanthranilyl-*L*-proline) (Natakani et al., 2004), το οποίο ανήκει στην κατηγορία των 1,4-βενζοδιαζεπινών και έχει απομονωθεί από διάφορα στελέχη του γένους *Streptomyces*. Η απόλυτη στεreoχημεία του μεταβολίτη **32** καθορίστηκε ως 11a*S* μετά τη μέτρηση της ειδικής στροφικής ικανότητας του ($[\alpha]_D +425^\circ$, c 0.4, MeOH) και τη σύγκριση της με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Έχει επιδείξει *in vitro* κυτταροτοξική δράση στη καρκινική σειρά P388 (λευχαιμία) και αντιλεϊσμανιακή δράση έναντι του *Leishmania donovani* (Natakani et al., 2004, Clark et al., 2007), ενώ δεν παρουσίασε αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση σε διάφορα στελέχη που μελετήθηκαν (Zin et al., 2016). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **32** παρατίθενται στον Πίνακα 166.



Εικόνα 139. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **32** σε CDCl_3 .

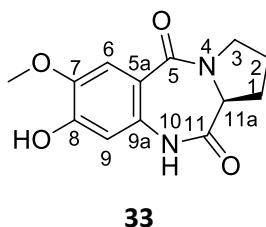
Πίνακας 166. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **32** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	$\delta_c^{a,b}$	$\delta_H^{a,b}$
1	26.5	2.76 (m), 2.02 (m)	26.2	2.00-2.03 (m), 2.75-2.78 (m)
2	23.5	2.02 (m)	23.5	2.00-2.03 (m)
3	47.5	3.81 (m), 3.60 (m)	47.3	3.57-3.62 (m), 3.78-3.82 (m)
5	165.0	-	165.4	-
5a	126.5	-	127.1	-
6	131.0	7.99 (dd, 7.9, 1.4)	131.1	7.99 (dd, 7.7, 1.4)
7	125.1	7.26 (br t, 7.9)	125.1	7.26 (td, 7.7, 1.0)
8	132.6	7.46 (br t, 7.9)	132.4	7.46 (td, 7.7, 1.4)
9	121.2	7.08 (dd, 7.9, 0.8)	121.0	7.02 (d, 7.7)
9a	135.5	-	135.2	-
10	-	9.27 (br s)	-	8.68 (br s)
11	171.1	-	171.2	-
11a	56.7	4.08 (d, 6.6)	56.7	4.07 (d, 6.1)

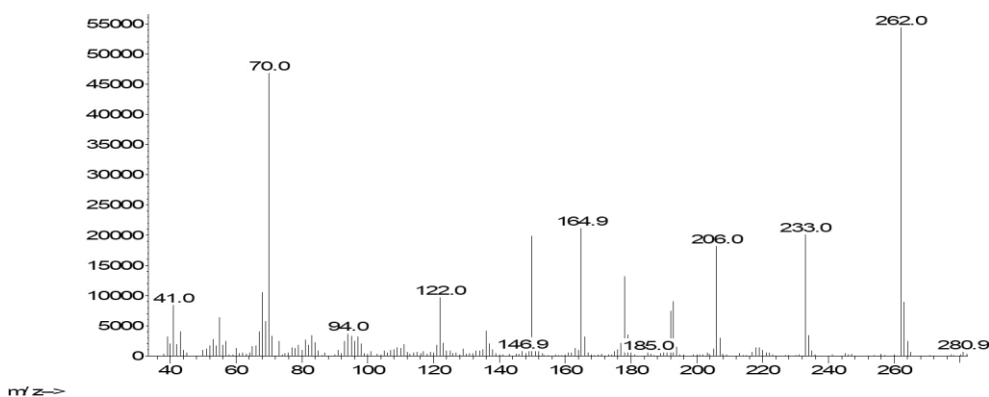
^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Natakani et al. (2004).

3.33. Μεταβολίτης 33

Ο μεταβολίτης **33** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 15.3 mg.



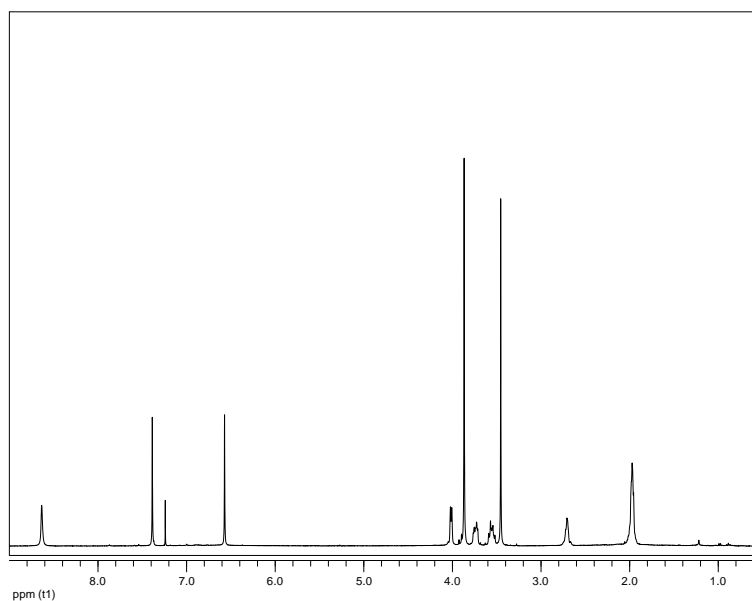
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **33** (Εικ. 140) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 262.



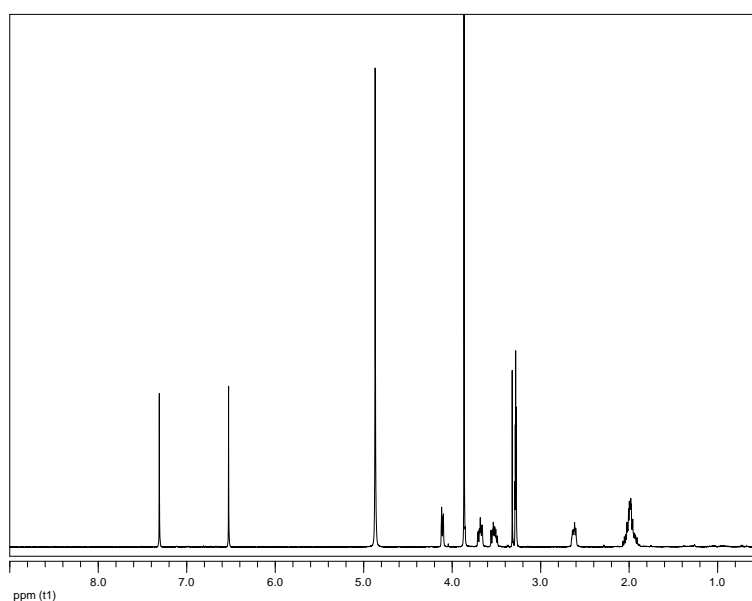
Εικόνα 140. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **33**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **33** (Εικ. 141) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **32**. Η κυριότερη διαφορά εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίστηκαν δύο απλές κορυφές σε δ 6.57 και 7.39, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία, υποδεικνύοντας 1,2,4,5-υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου. Επιπλέον, εμφανής ήταν και μία απλή κορυφή σε δ 3.87, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια μίας μεθοξυ-ομάδας.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **33** (Εικ. 142) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτό του ευκίνητου πρωτονίου που είχε ανταλλαχθεί με δευτέριο.

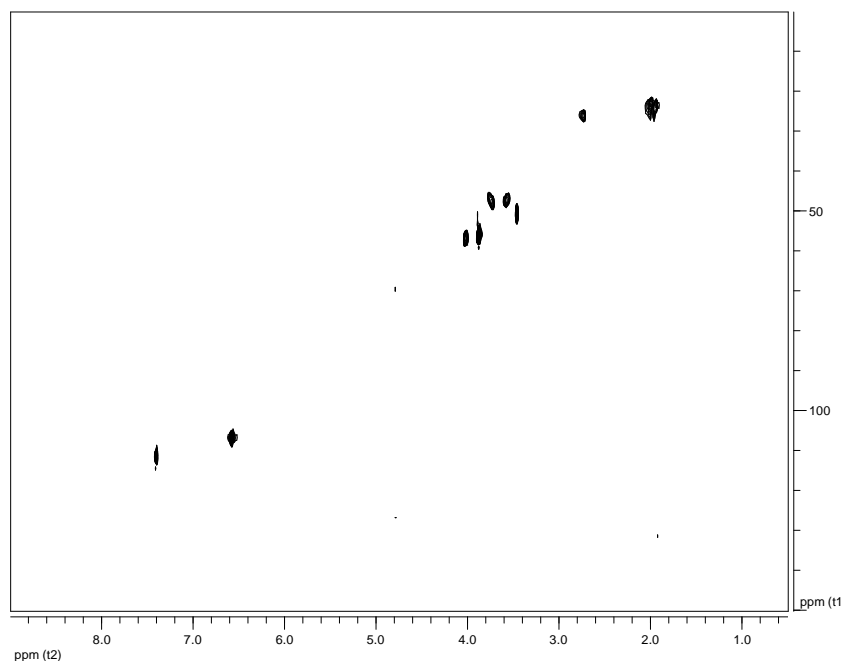


Εικόνα 141. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **33** σε CDCl_3 .

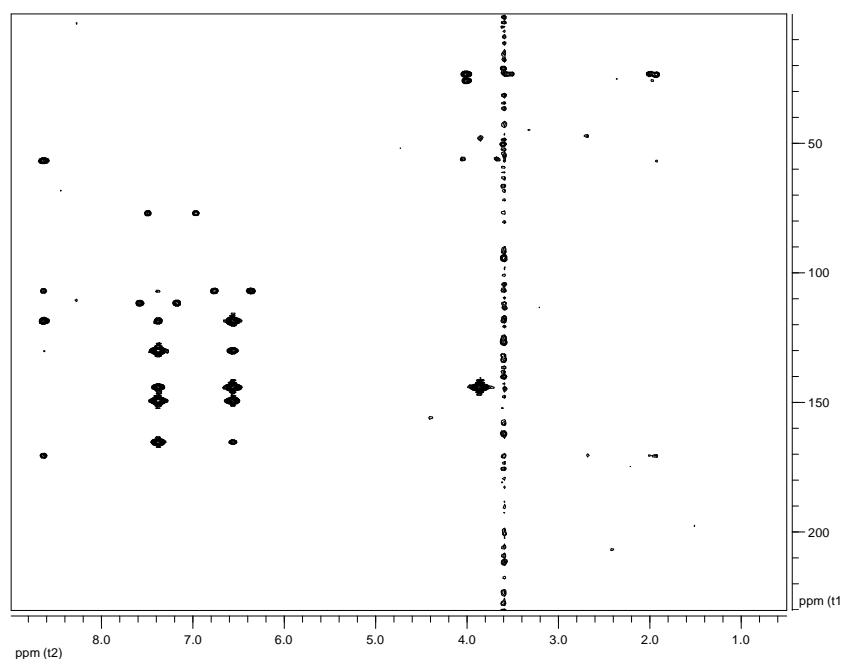


Εικόνα 142. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **33** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 143) και HMBC (Εικ. 144) έγινε εμφανής η παρουσία 13 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε ένα πρωτοταγές, τρία δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και τέσσερα τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου, καθώς και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 166.3 και 171.0 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



Εικόνα 143. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **33** σε CDCl_3 .

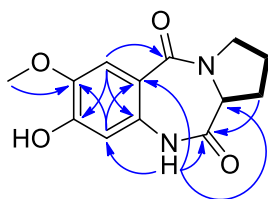


Εικόνα 144. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **33** σε CDCl_3 .

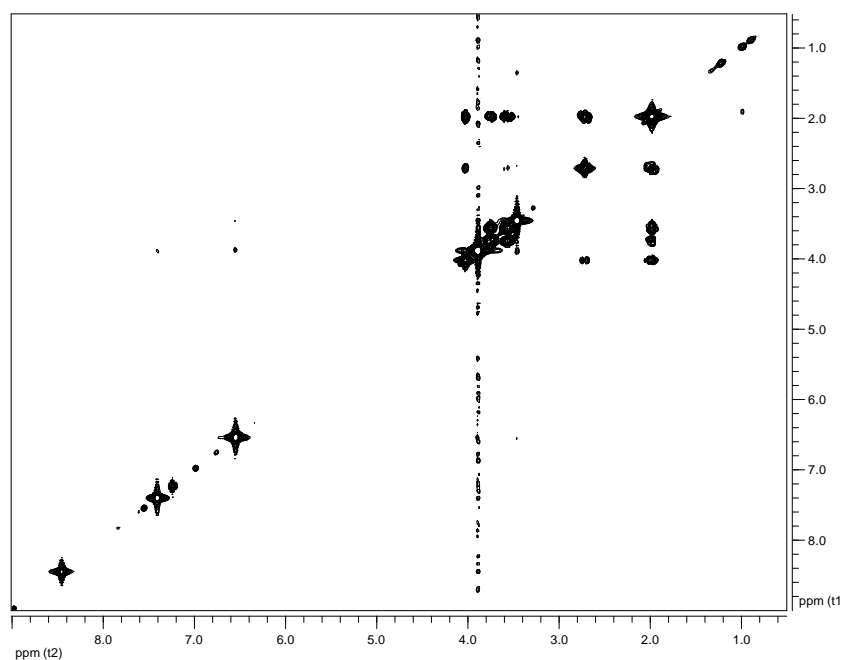
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **33** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **33** αποδόθηκε με τη βοήθεια των

συσχετίσεων (Εικ. 145) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT, HMBC και COSY (Εικ. 146). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν ένα απομονωμένο spin σύστημα που παρέπεμπε σε μία προλίνη (H-11a / H₂-1 / H₂-2 / H₂-3). Οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC μεταξύ του C-5 με το H-6 και του C-11 με τα H₂-1 και το H-10 καθόρισαν τη θέση των δύο καρβονυλίων στο μόριο, ενώ η θέση της αμινομάδας προσδιορίστηκε περαιτέρω από τη συσχέτιση του H-10 με τους C-5a, C-9 και C-11a. Η συσχέτιση του C-7 με τα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας και το αρωματικό H-9 ολοκλήρωσε την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **33**.



Εικόνα 145. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **33**.



Εικόνα 146. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **33** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **33** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το συνθετικό προϊόν 7-μεθοξυ-8-υδροξυ-κυκλοανθρανιλυλο-*L*-προλίνη (7-methoxy-8-hydroxy-cyclo-

anthranilyl-L-proline) (Kamal et al., 2009), το οποίο για πρώτη φορά απομονώνεται από φυσική πηγή. Η απόλυτη στερεοχημεία του μεταβολίτη **33** καθορίστηκε ως 11aS μετά τη μέτρηση της ειδικής στροφικής ικανότητας του ($[\alpha]_D^{+909^\circ}$, c 0.2, MeOH). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **33** παρατίθενται στον Πίνακα 167.

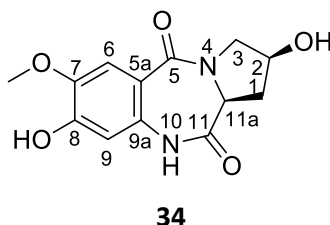
Πίνακας 167. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **33** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	δ_c^b	δ_H^b	$\delta_c^{b,c}$	$\delta_H^{b,c}$
1	25.6	2.62 (m), 1.99 (m)	26.1	2.71 (m), 1.97 (m)	28.2	2.70-2.80 (m), 1.90-2.10 (m)
2	23.8	1.99 (m)	23.5	1.97 (m)	30.7	1.90-2.10 (m)
3	47.1	3.68 (m), 3.53 (m)	47.4	3.74 (m), 3.56 (ddd, 11.4, 8.5, 8.5)	51.7	3.70-3.80 (m), 3.55-3.65 (m)
5	166.3	-	165.6	-	170.1	-
5a	117.6	-	118.7	-	122.5	-
6	111.5	7.31 (s)	111.8	7.39 (s)	117.0	7.40 (s)
7	145.2	-	144.0	-	149.5	-
8	151.3	-	149.7	-	155.1	-
9	107.6	6.53 (s)	106.9	6.57 (s)	112.8	6.50 (s)
9a	131.2	-	130.4	-	135.8	-
10	-	-	-	8.64 (br s)	-	7.80 (br s)
11	171.0	-	170.8	-	175.1	-
11a	57.4	4.11 (m)	56.8	4.02 (d, 6.0)	61.5	4.00-4.10 (m)
7-OMe	55.5	3.87 (s)	56.1	3.87 (s)	60.7	3.95 (s)
8-OH	-	-	-	-	-	6.00-6.10 (br s)

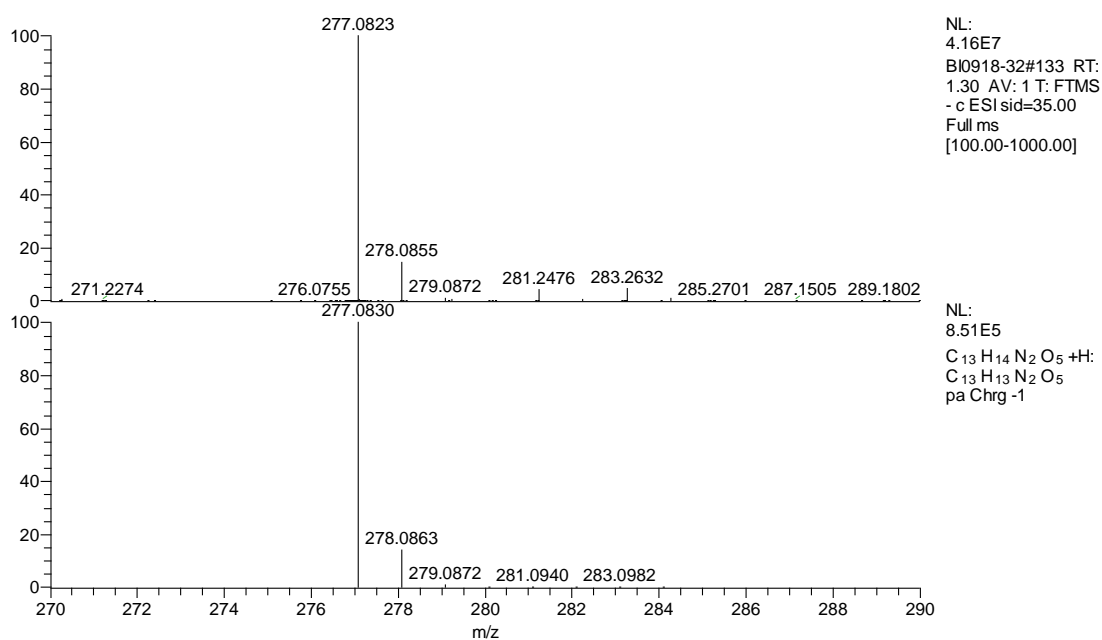
^a Σε CD₃OD. ^b Σε CDCl₃. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Kamal et al. (2009).

3.34. Μεταβολίτης 34

Ο μεταβολίτης **34** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.3 mg.

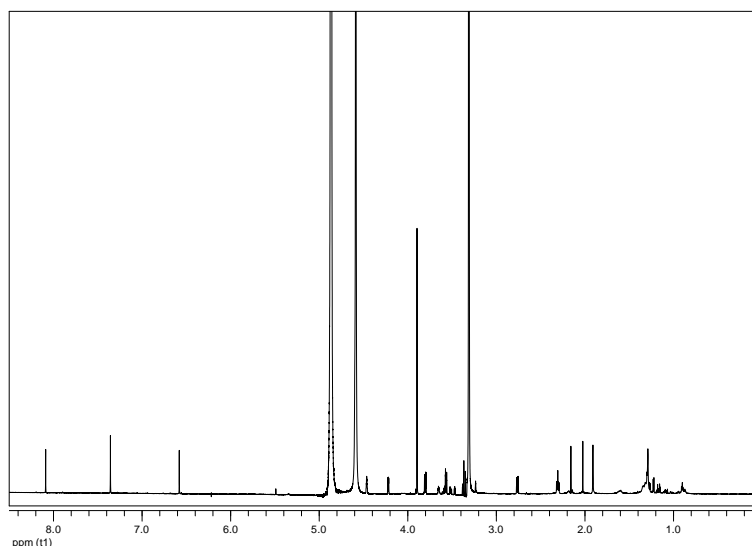


Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **34** (Εικ. 147) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 277.0823.



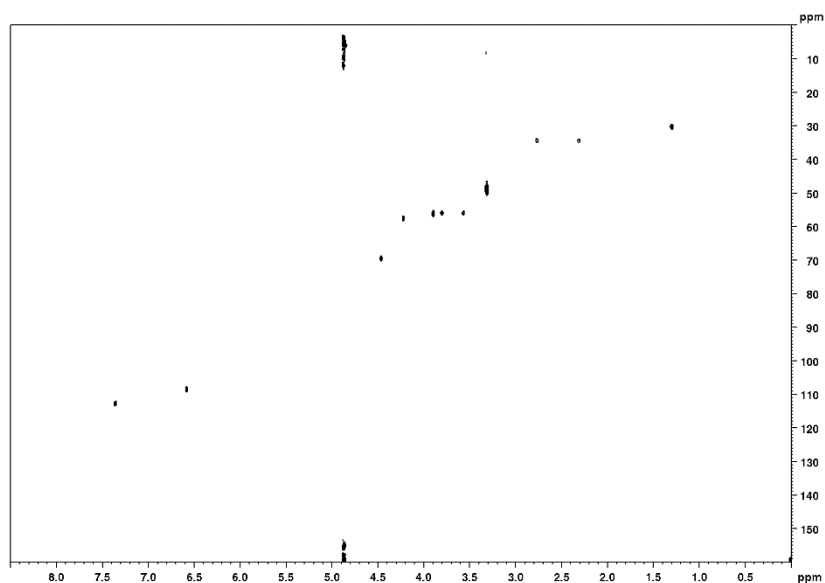
Εικόνα 147. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **34**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **34** (Εικ. 148) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με αυτά του μεταβολίτη **33**, με την κυριότερη διαφορά την εμφάνιση μίας πολλαπλής κορυφής σε δ 4.46, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθινίου.

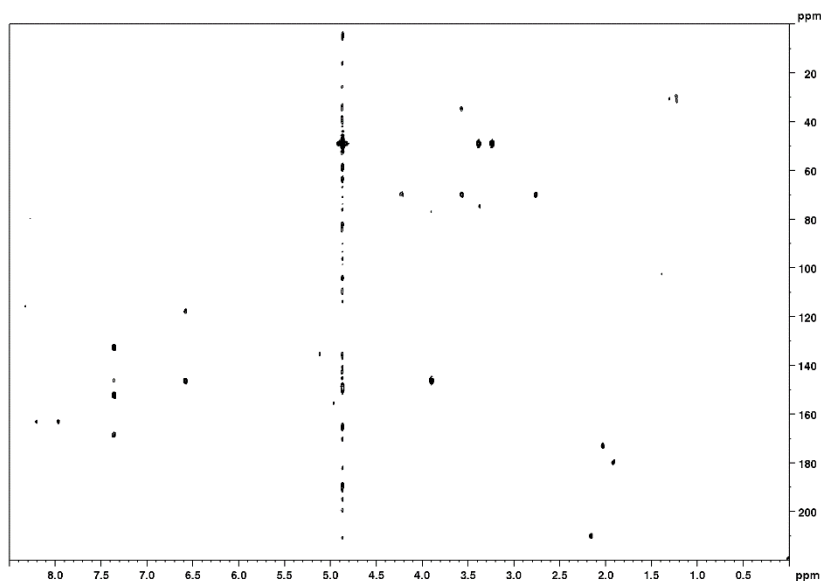


Εικόνα 148. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **34** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 149) και HMBC (Εικ. 150) έγινε εμφανής η παρουσία 13 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε ένα πρωτοταγές, δύο δευτεροταγή, έξι τριτοταγή και τέσσερα τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου, καθώς και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 168.5 και 173.8 που αποδόθηκαν σε δύο αμιδικά καρβονύλια.



Εικόνα 149. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **34** σε CD_3OD .

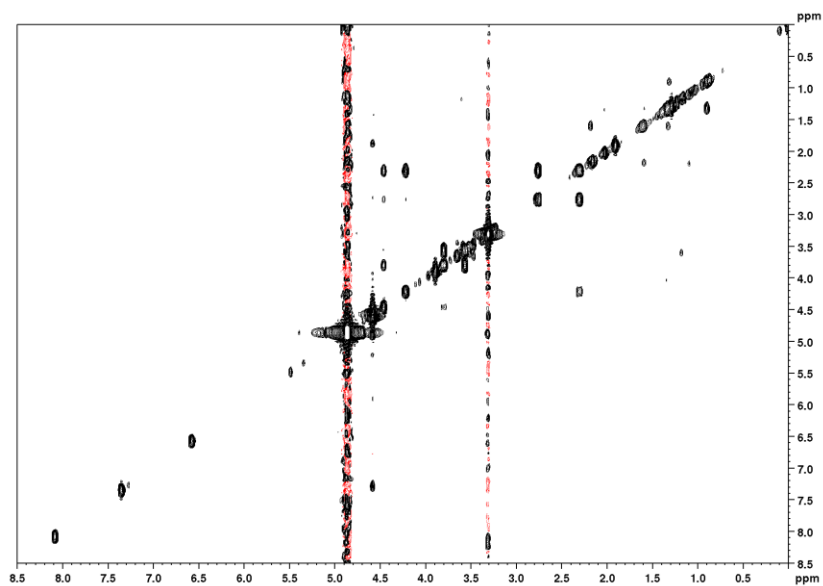


Εικόνα 150. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **34** σε CD₃OD.

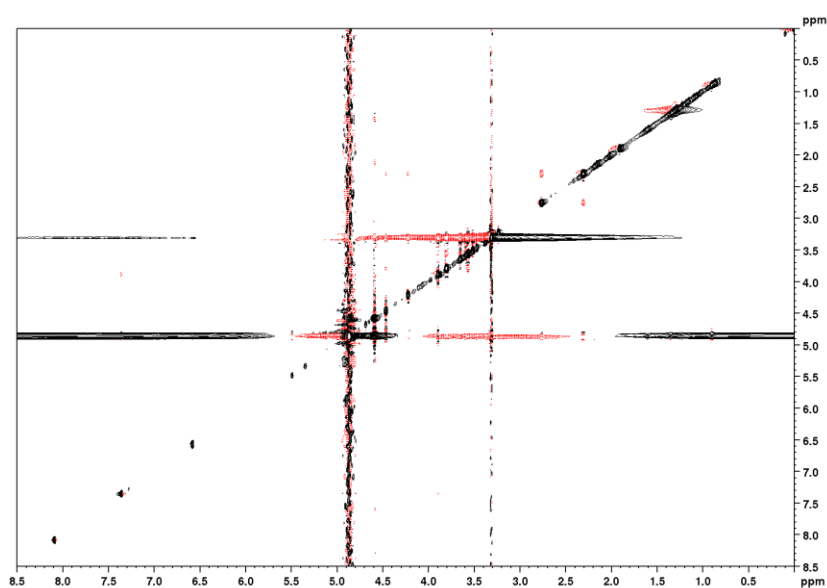
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **34** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₃H₁₄N₂O₅. Με βάση τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, ο μεταβολίτης **34** θα έπρεπε να έχει τον τρικυκλικό σκελετό του μεταβολίτη **33**.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **34** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 151). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY και οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC επιβεβαίωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **34**, κατά αντιστοιχία με τον **33**.

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **34** πραγματοποιήθηκε με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 152). Συγκεκριμένα, οι συσχετίσεις NOE των H-1α/H-2, H-1α/H-11a, H-2/H-3a και H-2/H-11a οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα πρωτόνια H-2 και H-11a έχουν ομοεπίπεδο (*cis*) προσανατολισμό στον χώρο. Η απόλυτη στερεοχημεία του μεταβολίτη **34** δεν προσδιορίστηκε, όμως λαμβάνοντας υπόψη την αναμενόμενη κοινή βιογένεση των μεταβολιτών **32-34** αναμένεται να είναι 2*S*,11*aS*.



Εικόνα 151. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **34** σε CD₃OD.



Εικόνα 152. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **34** σε CD₃OD.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **34** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το συνθετικό προϊόν 2,8-διυδροξυ-7-μεθοξυ-κυκλοανθρανιλυλο-προλίνη (2,8-dihydroxy-7-methoxycycloanthranilyl-proline) (Kaneko et al., 1985; Kamal et al., 1999; Kamal et al., 2006), το οποίο αποτελεί το 2*S*-υδροξυ-παράγωγο του μεταβολίτη **33** και απομονώνεται για πρώτη φορά από φυσική πηγή. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **34**, τα οποία αποδίδονται για πρώτη φορά, παρατίθενται στον Πίνακα 168.

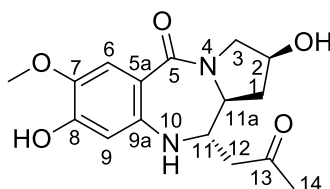
Πίνακας 168. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **34** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	34.5	α 2.31 (ddd, 13.8, 9.0, 5.1) β 2.76 (ddd, 13.8, 4.2, 2.4)
2	69.7	4.46 (m)
3	56.1	α 3.80 (dd, 12.6, 4.6) β 3.57 (dt, 12.6, 1.9)
5	168.5	-
5a	117.7	-
6	112.9	7.36 (s)
7	146.3	-
8	152.4	-
9	108.7	6.58 (s)
9a	132.7	-
11	173.8	-
11a	57.7	4.22 (dd, 9.0, 2.4)
7-OMe	56.3	3.90 (s)

^a Σε CD₃OD.

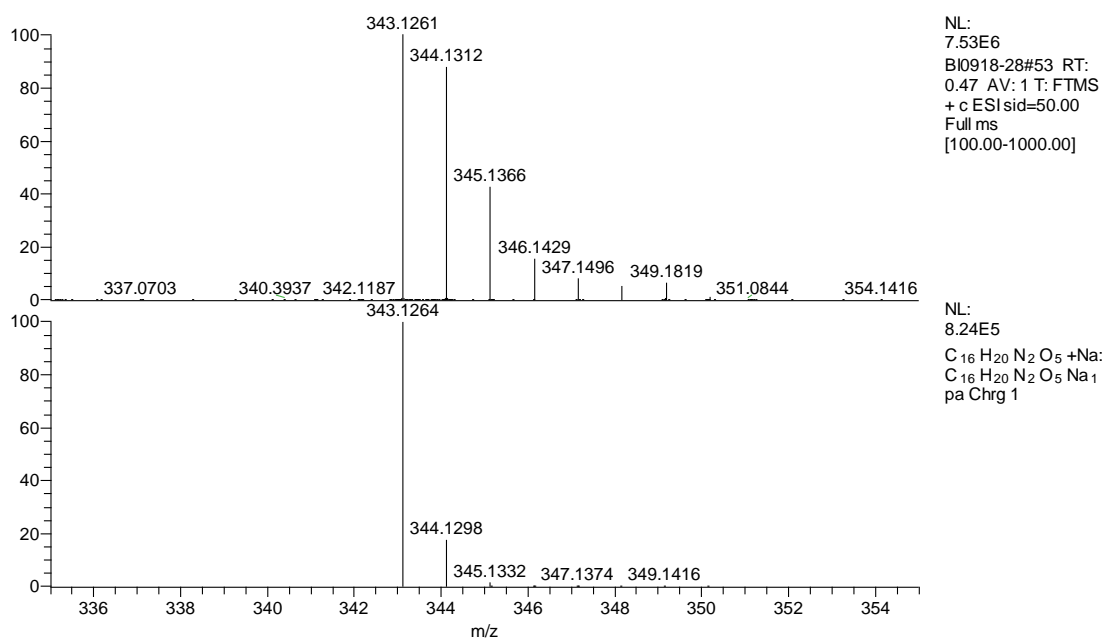
3.35. Μεταβολίτης 35

Ο μεταβολίτης **35** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.5 mg.



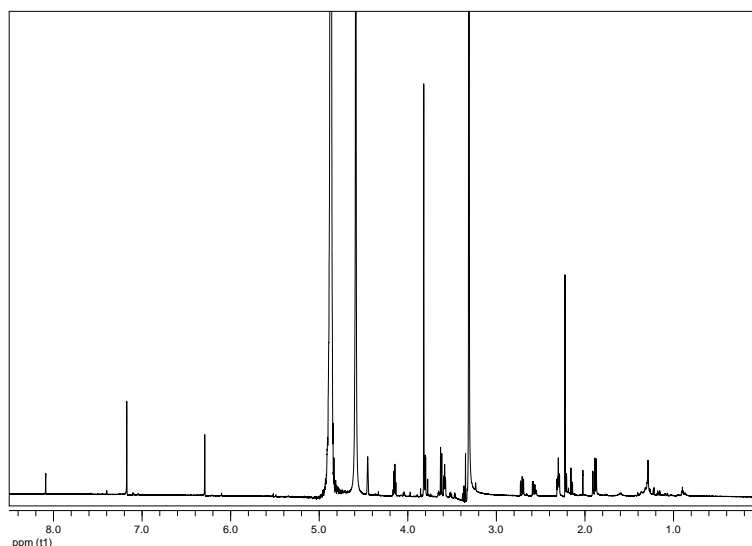
35

Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **35** (Εικ. 153) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 343.1261.



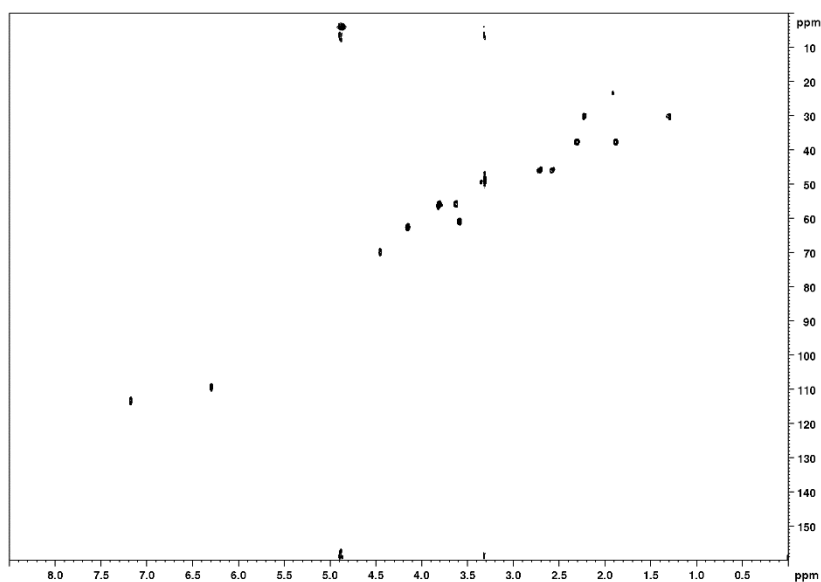
Εικόνα 153. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **35**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **35** (Εικ. 154) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **34**. Επιπλέον παρατηρήθηκαν: (i) μία απλή κορυφή σε δ 2.23, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε σε ένα μεθύλιο σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα και (ii) μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.15, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αποθωρακισμένο μεθίλιο.

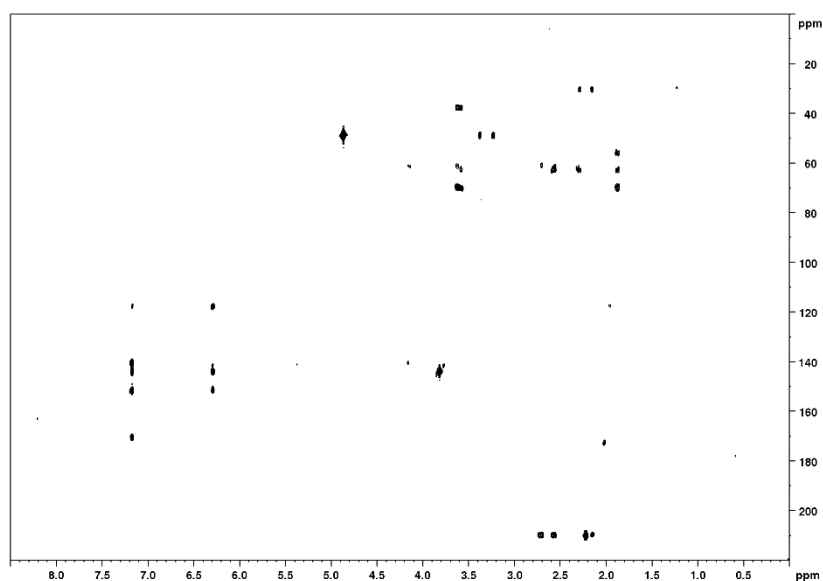


Εικόνα 154. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **35** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 155) και HMBC (Εικ. 156) έγινε εμφανής η παρουσία 16 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτοταγή, τρία δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και έξι τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου, καθώς και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 170.7 και 210.2 που αποδόθηκαν σε δύο καρβονύλια.



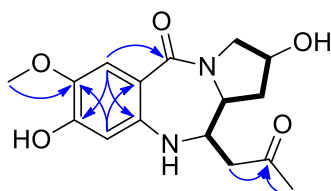
Εικόνα 155. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **35** σε CD_3OD .



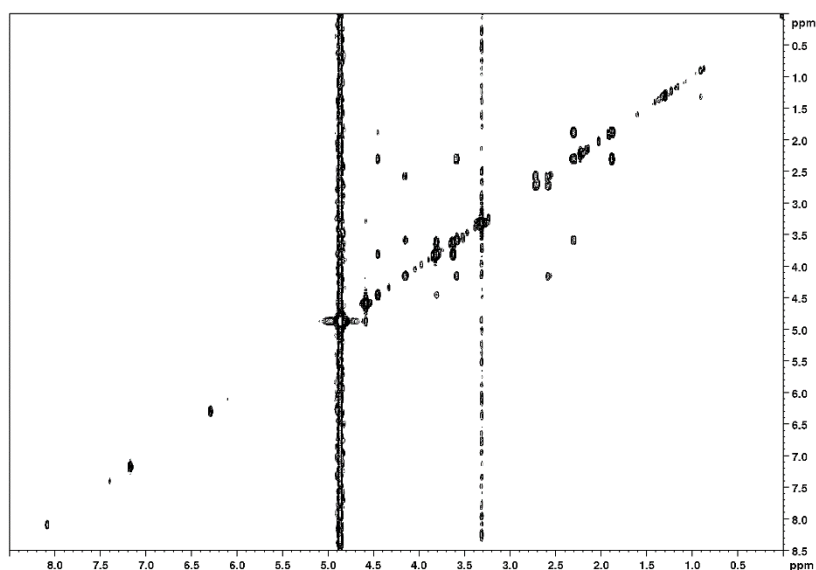
Εικόνα 156. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **35** σε CD₃OD.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **35** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₆H₂₀N₂O₅. Με βάση τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, ο μεταβολίτης **35** θα έπρεπε να έχει τον τρικυκλικό σκελετό των μεταβολιτών **33** και **34**.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **35** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 157) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 158). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν το spin σύστημα H₂-12 / H-11 / H-11a / H₂-1 / H-2 / H₂-3, ενώ οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **35**, με τη θέση του δευτέρου καρβονυλίου να καθορίζεται από τις συσχετίσεις του C-13 με τα H₂-12 και H₃-14.

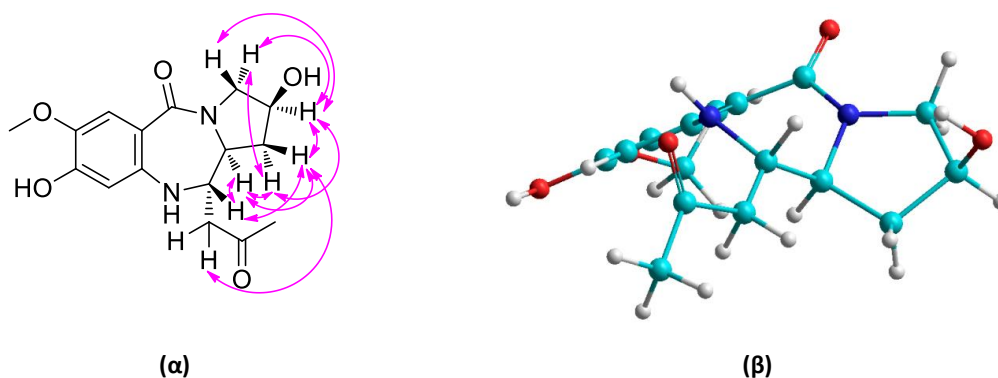


Εικόνα 157. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **35**.

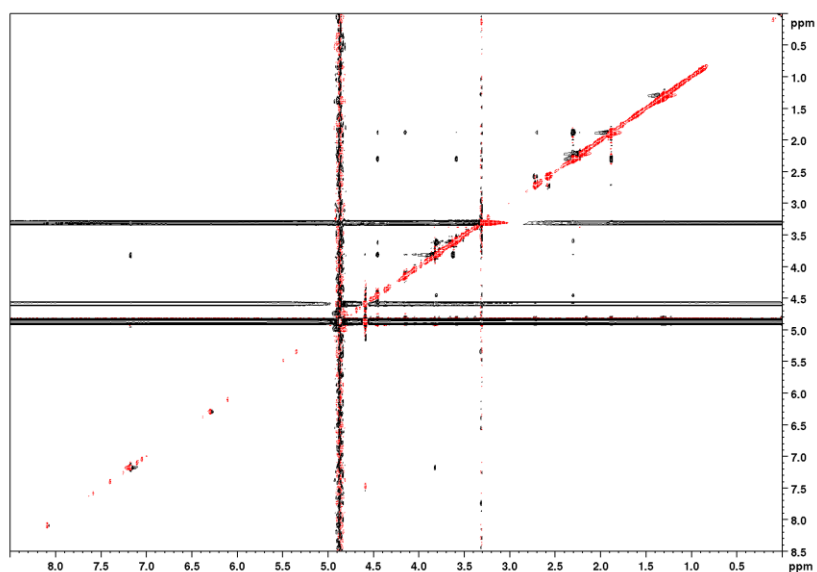


Εικόνα 158. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **35** σε CD₃OD.

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **35** (Εικ. 159) πραγματοποιήθηκε με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 160). Συγκεκριμένα, οι συσχετίσεις NOE των H-1α/H-2, H-1α/H-3α, H-1α/H-11α, H-1β/H-2, H-1β/H-11, H-1β/H-11α, H-1β/H-12α, H-2/H-3α, H-2/H-3β και H-11/H-11α, καθώς και των H-11/H-12α, H-11/H-12b, H-11α/H-12α και H-11α/H-12b οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα πρωτόνια H-2 και H-11α έχουν ομοεπίπεδο (*cis*) προσανατολισμό στον χώρο και αντιπαράλληλο (*trans*) με το H-11. Επιπλέον, η σύγκριση των σταθερών σύζευξης του μεταβολίτη **35** με αυτές της αμπεϊμυκίνης (Hochlowski et al., 1987) καταδεικνύουν πολύ καλή συμφωνία, επιβεβαιώνοντας την προτεινόμενη σχετική στεreoχημεία. Η απόλυτη στεreoχημεία του μεταβολίτη **35** δεν προσδιορίστηκε, όμως λαμβάνοντας υπόψη την αναμενόμενη κοινή βιογένεση των μεταβολιτών **32-35** αναμένεται να είναι 2*S*,11*S*,11*aS*.



Εικόνα 159. (α) Οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE και (β) η στεreoχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας για τον μεταβολίτη **35**.



Εικόνα 160. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **35** σε CD₃OD.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **35** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **35** παρατίθενται στον Πίνακα 169.

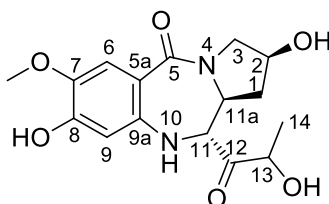
Πίνακας 169. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **35** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	37.8	α 2.30 (ddd, 13.6, 8.8, 4.8) β 1.88 (br d, 13.6)
2	70.0	4.45 (br s)
3	56.0	α 3.81 (dd, 12.9, 4.9) β 3.62 (br d, 12.9)
5	170.7	-
5a	118.0	-
6	113.6	7.17 (s)
7	144.1	-
8	151.7	-
9	109.5	6.29 (s)
9a	140.8	-
11	62.7	4.15 (dd, 10.0, 9.5)
11a	61.1	3.58 (dd, 10.0, 8.8)
12	46.1	2.72 (d, 17.4), 2.58 (dd, 17.4, 9.5)
13	210.2	-
14	30.3	2.23 (s)
7-OMe	56.4	3.82 (s)

^a Σε CD₃OD.

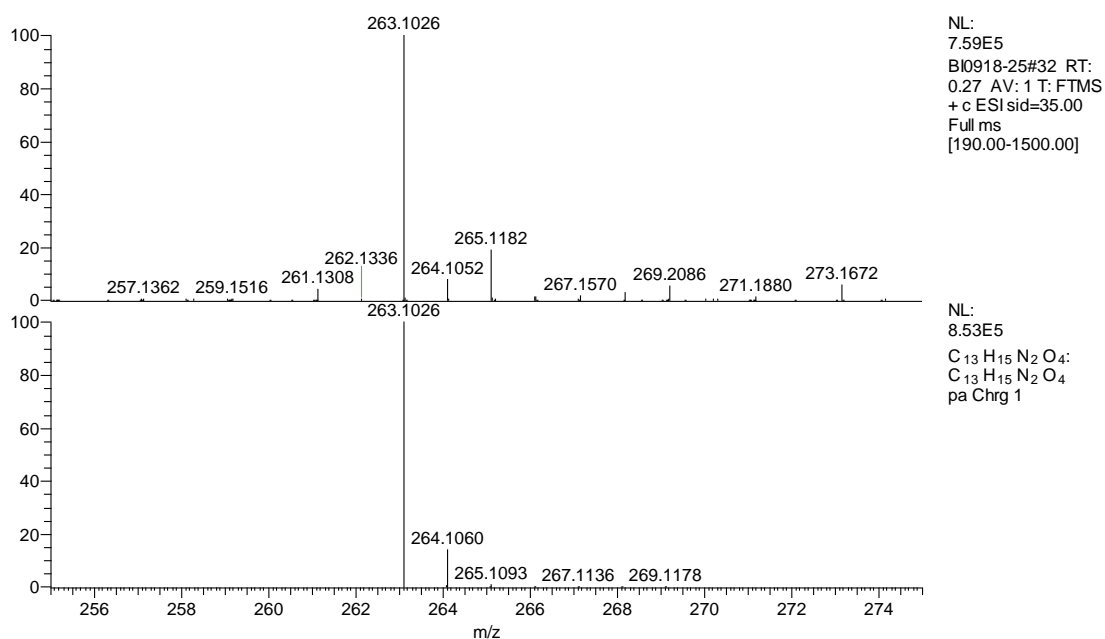
3.36. Μεταβολίτης 36

Ο μεταβολίτης **36** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.1 mg.



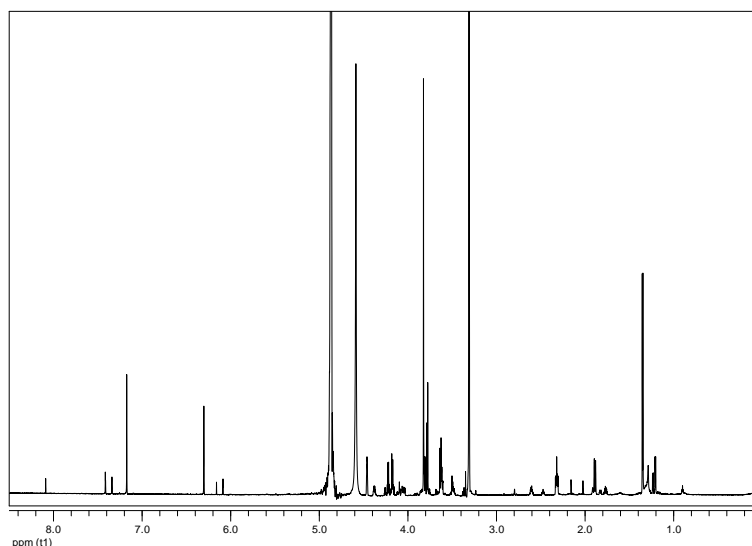
36

Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **36** (Εικ. 161) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$. Αντ' αυτού παρατηρήθηκε θραύσμα $[C_{13}H_{15}N_2O_4]^+$, προϊόν απόσπασης της πλευρικής αλυσίδας ($[M-COCH(OH)CH_3]^+$) σε m/z 263.1026.



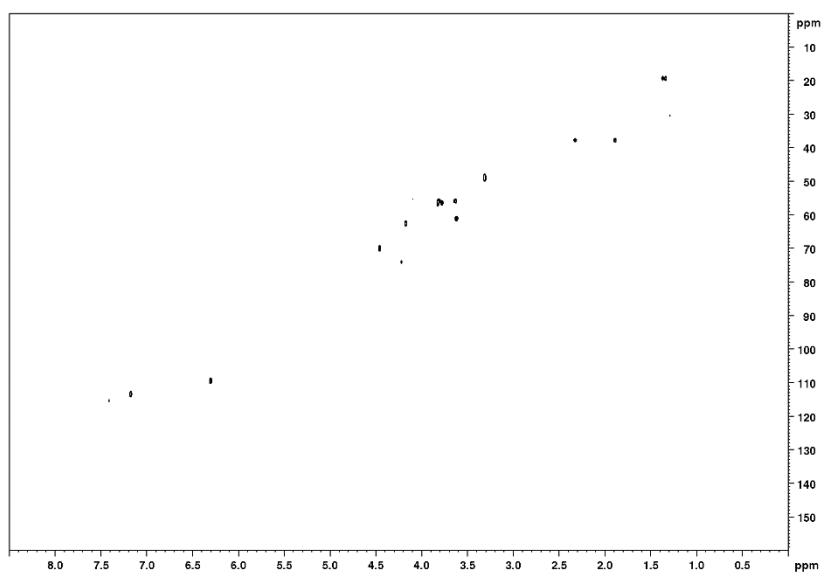
Εικόνα 161. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **36**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **36** (Εικ. 162) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **34**. Επιπλέον παρατηρήθηκαν: (i) μία διπλή κορυφή σε δ 1.35, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε σε ένα μεθύλιο σε τριτοταγές άτομο άνθρακα, και (ii) δύο κορυφές σε δ 4.18 και 4.22, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο αποθωρακισμένα μεθίλια.

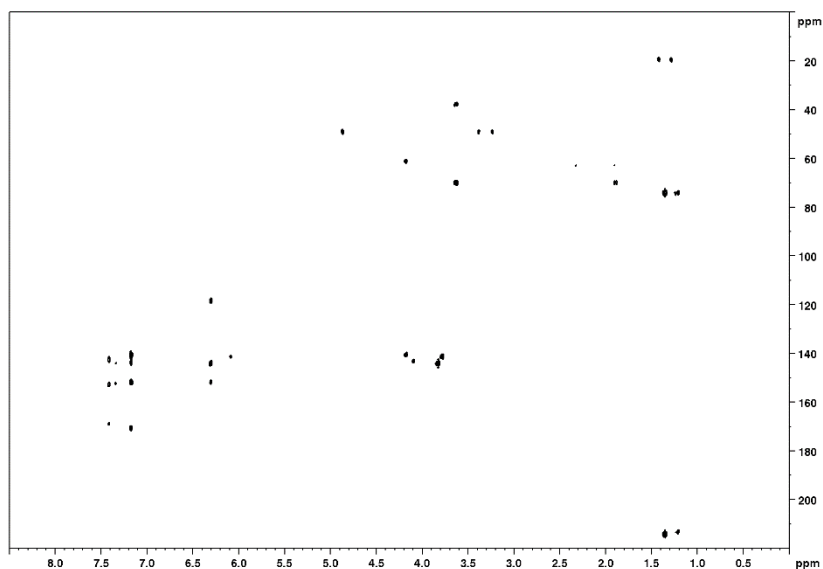


Εικόνα 162. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **36** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 163) και HMBC (Εικ. 164) έγινε εμφανής η παρουσία 16 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτοταγή, δύο δευτεροταγή, έξι τριτοταγή και έξι τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου, καθώς και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα σε δ 170.9 και 214.3 που αποδόθηκαν σε δύο καρβονύλια.



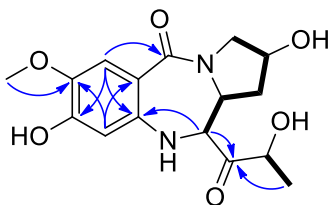
Εικόνα 163. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **36** σε CD_3OD .



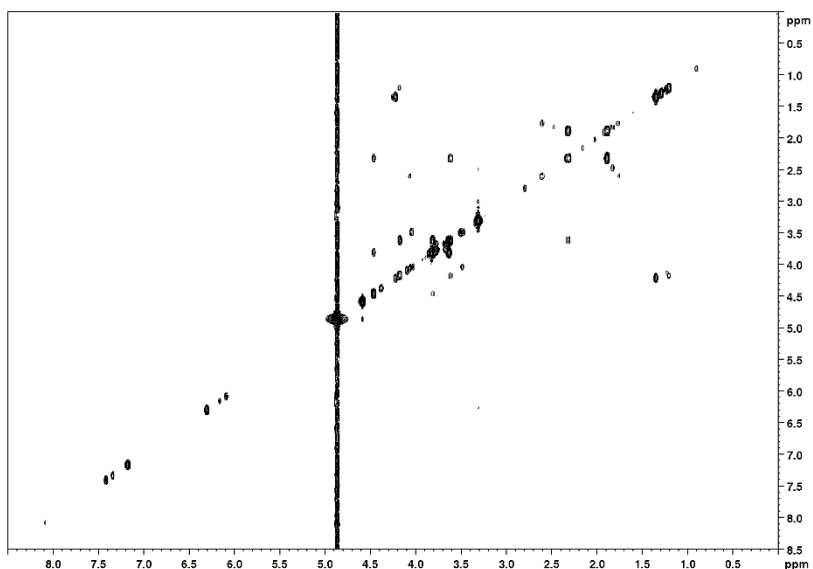
Εικόνα 164. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **36** σε CD₃OD.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **36** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₆H₂₀N₂O₆. Με βάση τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, ο μεταβολίτης **36** θα έπρεπε να έχει τον τρικυκλικό σκελετό των μεταβολιτών **34** και **35**.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **36** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 165) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 166). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα (H-11 / H-11a / H₂-1 / H-2 / H₂-3 και H₃-14 / H-13), ενώ οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **36**, με τη θέση του δεύτερου καρβονυλίου να καθορίζεται από τις συσχετίσεις του C-12 με τα H-11 και H₃-14.

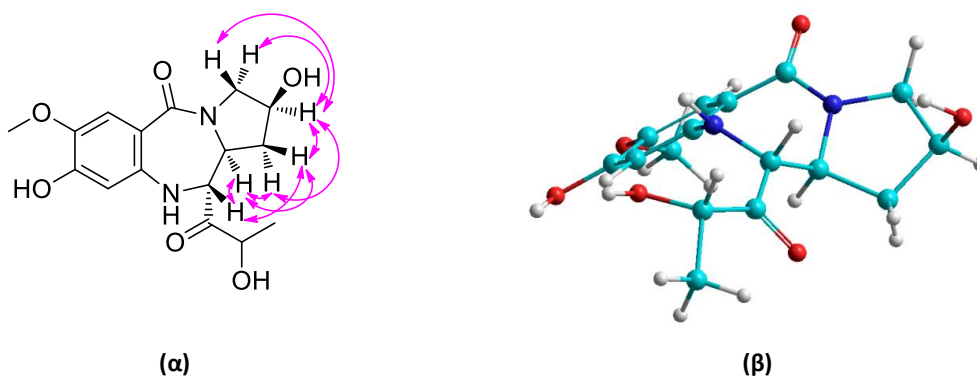


Εικόνα 165. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **36**.

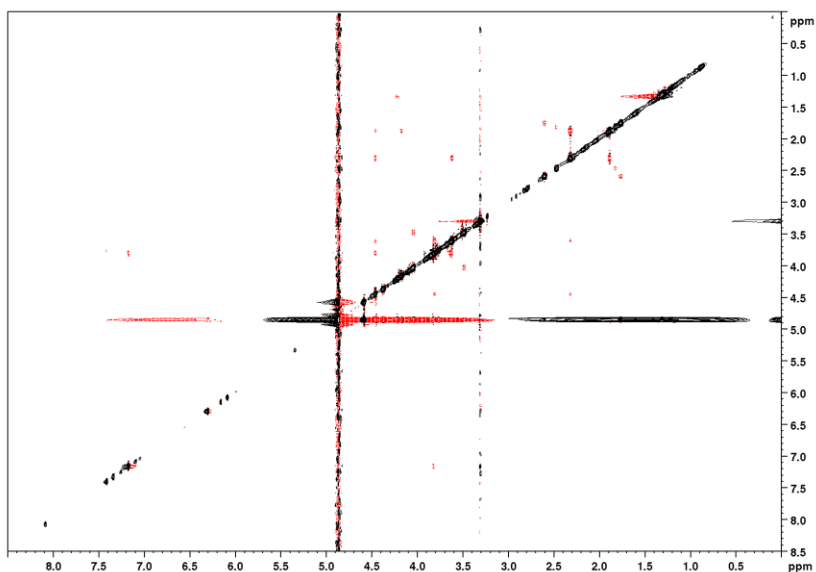


Εικόνα 166. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **36** σε CD₃OD.

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **36** (Εικ. 167) πραγματοποιήθηκε με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 168). Συγκεκριμένα, σε αντιστοιχία με τον μεταβολίτη **35**, οι συσχετίσεις NOE των H-1α/H-2, H-1α/H-3α, H-1α/H-11α, H-1β/H-2, H-1β/H-11, H-1β/H-11α, H-2/H-3α, H-2/H-3β και H-11/H-11α οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα πρωτόνια H-2 και H-11α έχουν ομοεπίπεδο (*cis*) προσανατολισμό στον χώρο και αντιπαράλληλο (*trans*) με το H-11. Η απόλυτη στεreoχημεία του μεταβολίτη **36** δεν προσδιορίστηκε, όμως λαμβάνοντας υπόψη την αναμενόμενη κοινή βιογένεση των μεταβολιτών **32-36** αναμένεται να είναι 2*S*,11*S*,11α*S*.



Εικόνα 167. (α) Οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE και (β) η στεreoχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας για τον μεταβολίτη **36**.



Εικόνα 168. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **36** σε CD₃OD.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **36** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **36** παρατίθενται στον Πίνακα 170.

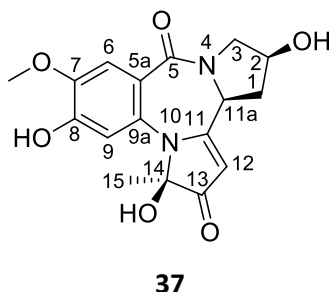
Πίνακας 170. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **36** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	37.8	α 2.32 (ddd, 13.8, 8.9, 4.8) β 1.89 (br d, 13.8)
2	70.0	4.46 (br s)
3	56.0	α 3.81 (dd, 12.7, 4.8) β 3.63 (br d, 12.7)
5	170.8	-
5a	118.4	-
6	113.5	7.17 (s)
7	144.2	-
8	151.8	-
9	109.6	6.30 (s)
9a	140.9	-
11	62.7	4.18 (br d, 10.5)
11a	61.2	3.61 (br dd, 10.5, 8.9)
12	214.3	-
13	74.1	4.22 (q, 7.0)
14	19.3	1.35 (d, 7.0)
7-OMe	56.4	3.82 (s)

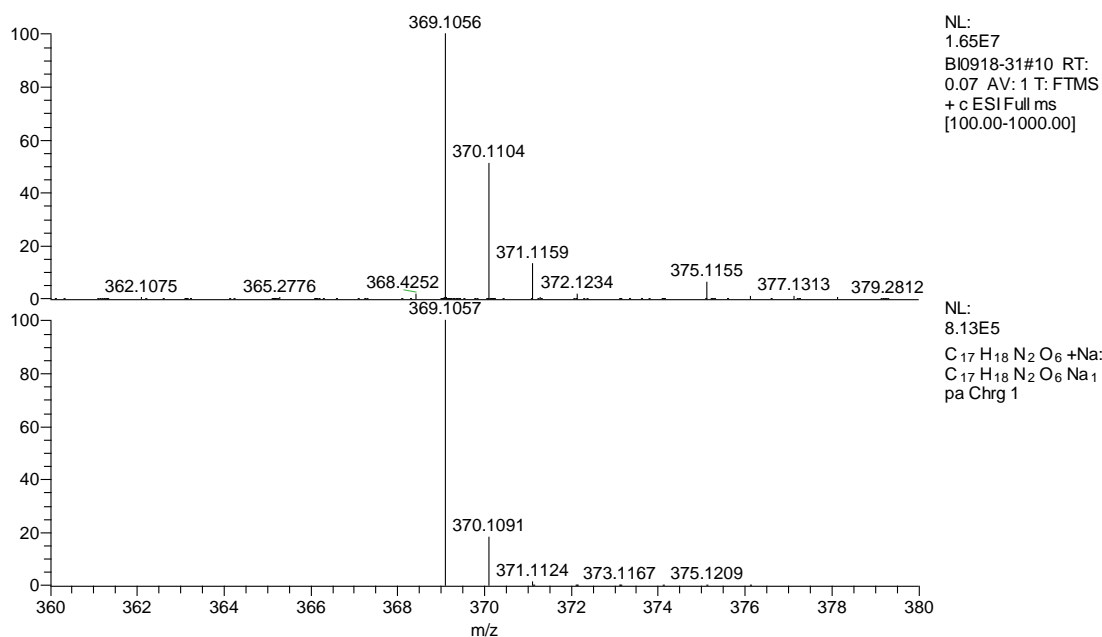
^a Σε CD₃OD.

3.37. Μεταβολίτης 37

Ο μεταβολίτης **37** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.8 mg.



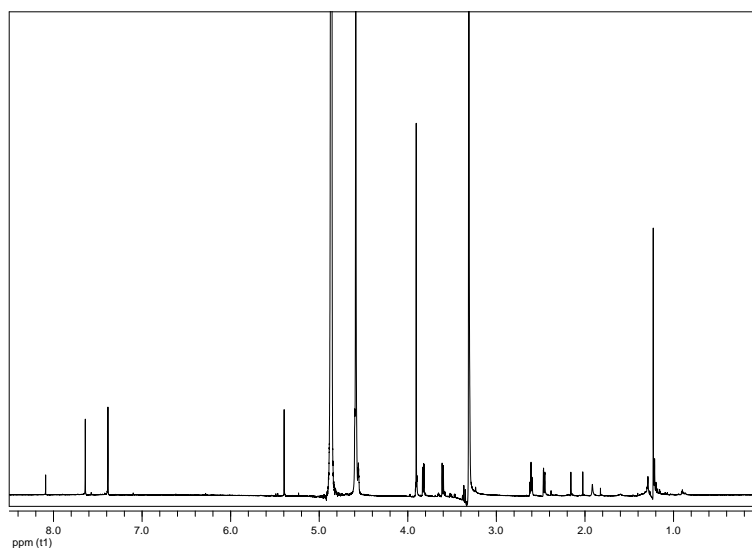
Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **37** (Εικ. 169) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 369.1056.



Εικόνα 169. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **37**.

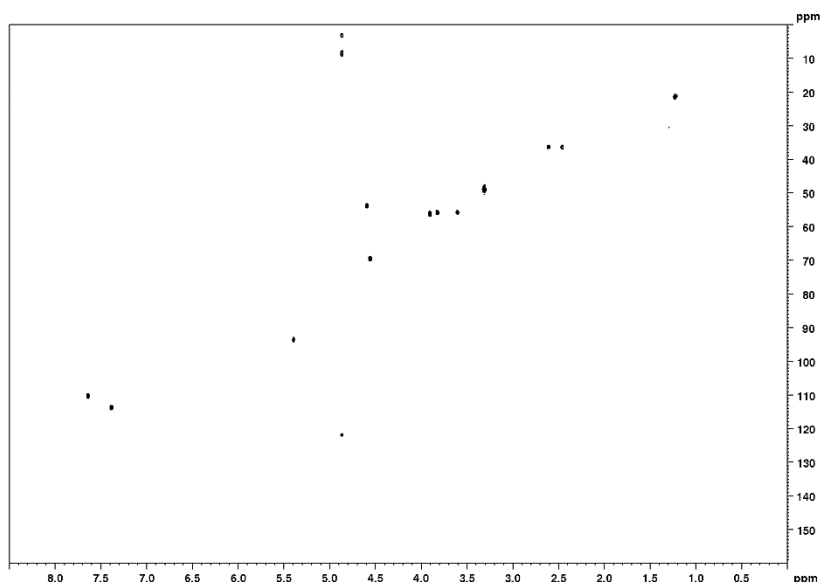
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **37** (Εικ. 170) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **34**, με κύρια διαφορά την αποθωράκιση του ενός εκ των δύο αρωματικών μεθινίων στα 7.64 ppm. Επιπλέον παρατηρήθηκαν: (i) μία απλή κορυφή σε δ 1.23, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε σε ένα μεθύλιο σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα, και (ii) μία απλή κορυφή σε δ 5.40, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο

και αποδόθηκε σε ένα ολεφινικό μεθίλιο.

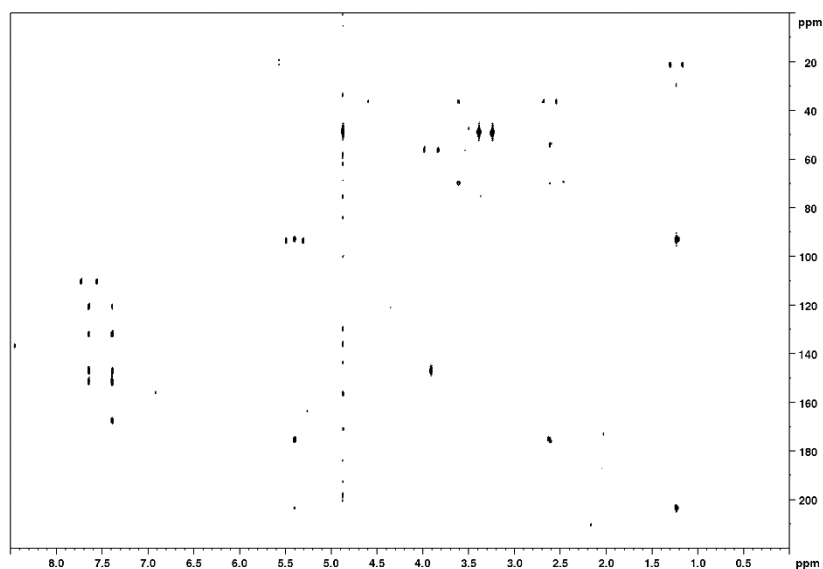


Εικόνα 170. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **37** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 171) και HMBC (Εικ. 172) έγινε εμφανής η παρουσία 17 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτοταγή, δύο δευτεροταγή, πέντε τριτοταγή και οκτώ τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν οκτώ sp^2 άνθρακες, καθώς και δύο καρβονύλια σε δ 175.4 και 203.4.



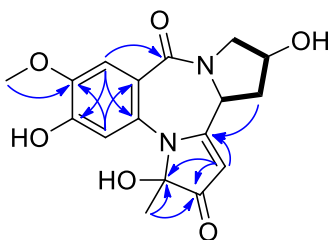
Εικόνα 171. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **37** σε CD_3OD .



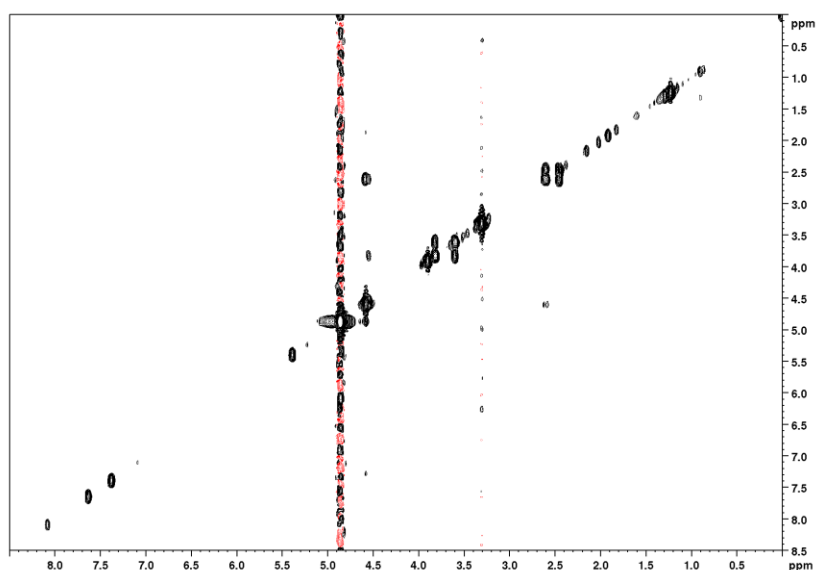
Εικόνα 172. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **37** σε CD₃OD.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **37** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₇H₁₈N₂O₆. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια, τον αρωματικό δακτύλιο και τον επιπλέον διπλό δεσμό ως επτά από τους δέκα βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τετρακυκλικό.

Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **37** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 173) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 174). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν το spin σύστημα H-11a / H₂-1 / H-2 / H₂-3. Στο φάσμα HMBC του μεταβολίτη **37** παρατηρήθηκαν αντίστοιχες συσχετίσεις με αυτές των μεταβολιτών **34-36** για το τρικυκλικό σύστημα, ενώ οι συσχετίσεις του C-11 με τα H₂-1 και H-12, καθώς και των C-13 και C-14 με τα H-12 και H₃-15 ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στο μόριο και καθόρισαν τη θέση του πυρρολικού δακτυλίου.

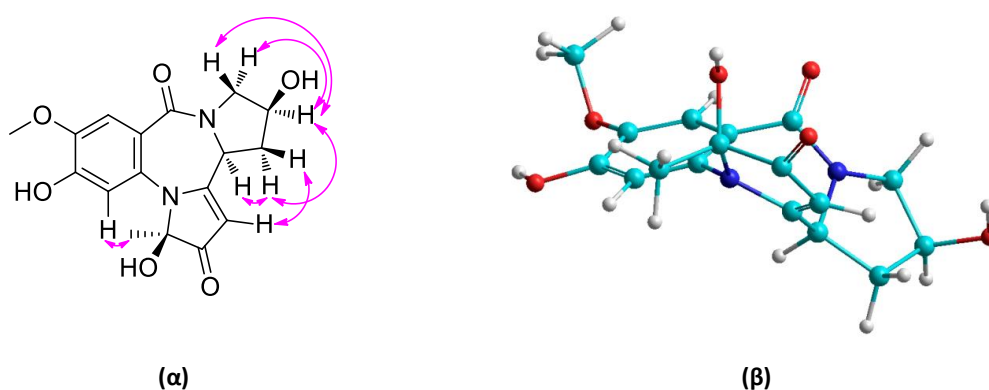


Εικόνα 173. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **37**.

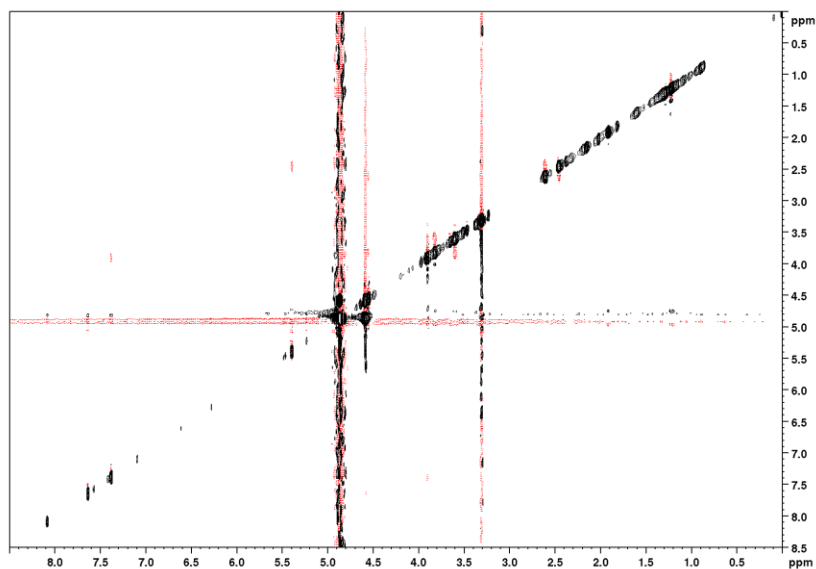


Εικόνα 174. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **37** σε CD₃OD.

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **37** (Εικ. 175) πραγματοποιήθηκε με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 176). Συγκεκριμένα, οι συσχετίσεις NOE των H-1α/H-2, H-1α/H-11a, H-1β/H-12, H-2/H-3α, H-2/H-3β και H-9/H₃-15 οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα πρωτόνια H-2 και H-11a, καθώς και το μεθύλιο στον C-14 έχουν ομοεπίπεδο (*cis*) προσανατολισμό στον χώρο. Η απόλυτη στεreoχημεία του μεταβολίτη **37** δεν προσδιορίστηκε, όμως λαμβάνοντας υπόψη την αναμενόμενη κοινή βιογένεση των μεταβολιτών **32-37** αναμένεται να είναι 2*S*,11*aS*,14*R*.



Εικόνα 175. (α) Οι πιο σημαντικές συσχετίσεις NOE και (β) η στεreoχημική διαμόρφωση δομής ελάχιστης ενέργειας για τον μεταβολίτη **37**.



Εικόνα 176. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **37** σε CD₃OD.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **37** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν με πρωτότυπο ανθρακικό σκελετό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **37** παρατίθενται στον Πίνακα 171.

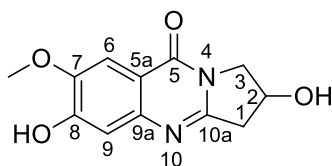
Πίνακας 171. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **37** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	36.4	α 2.61 (ddd, 14.6, 9.2, 5.3) β 2.46 (ddd, 14.6, 4.1, 2.3)
2	69.5	4.56 (m)
3	55.9	α 3.82 (dd, 12.9, 5.0) β 3.61 (dt, 12.9, 1.7)
5	167.7	-
5a	120.8	-
6	113.8	7.38 (s)
7	146.9	-
8	151.4	-
9	110.4	7.64 (s)
9a	131.9	-
11	175.4	-
11a	53.9	4.60 (dd, 9.2, 2.3)
12	93.7	5.40 (s)
13	203.4	-
14	93.0	-
15	21.4	1.23 (s)
7-OMe	56.2	3.90 (s)

^a Σε CD₃OD.

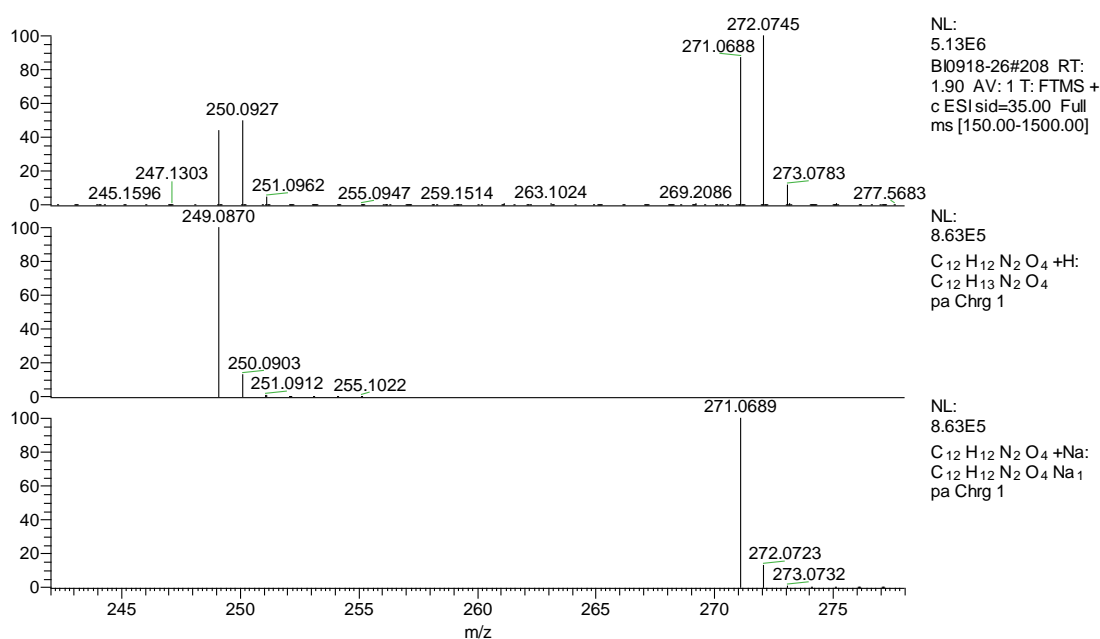
3.38. Μεταβολίτης 38

Ο μεταβολίτης **38** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο κρυσταλλικό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.6 mg.



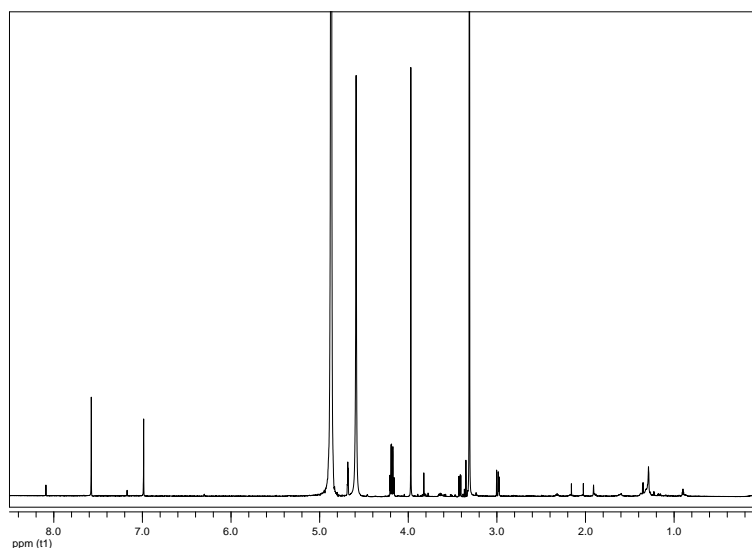
38

Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **38** (Εικ. 177) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 249.0869 και $[M+Na]^+$ σε m/z 271.0688.



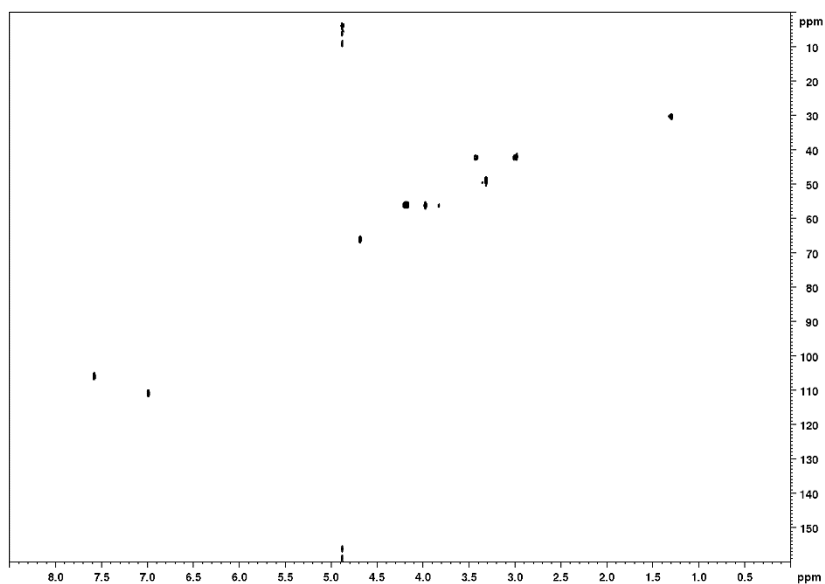
Εικόνα 177. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **38**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **38** (Εικ. 178) παρατηρήθηκαν: i) μία απλή κορυφή σε δ 3.97, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια μίας μεθοξυομάδας, ii) μίας πολλαπλής κορυφής σε δ 4.68, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθινίου και iii). δύο απλές κορυφές σε δ 6.99 και 7.58, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία, υποδεικνύοντας 1,2,4,5-υποκατάσταση ενός αρωματικού δακτυλίου.

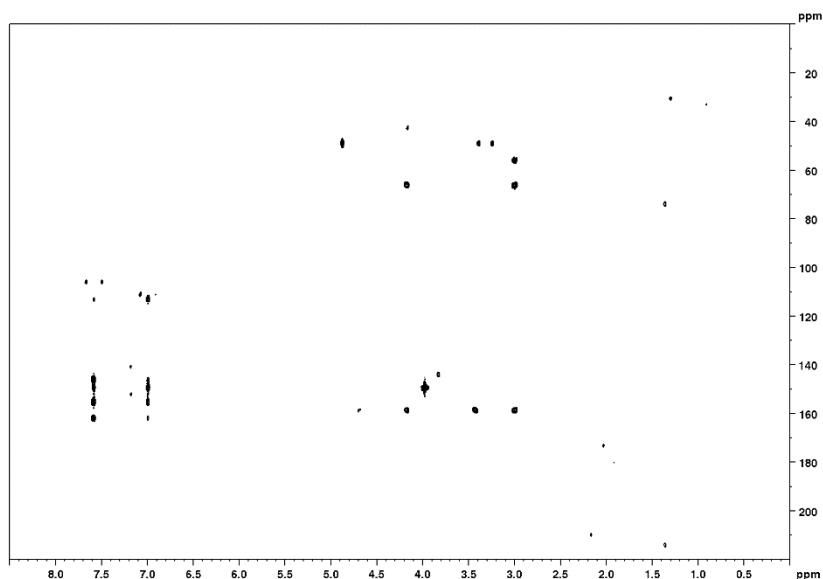


Εικόνα 178. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **38** σε CD_3OD .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 179) και HMBC (Εικ. 180) έγινε εμφανής η παρουσία 12 ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε ένα πρωτοταγές, δύο δευτεροταγή, τρία τριτοταγή και έξι τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν επτά sp^2 άνθρακες που υποδείκνυε την ύπαρξη ενός διπλού δεσμού με ετεροάτομο, καθώς και ένα αμιδικό καρβονύλιο σε δ 161.1.



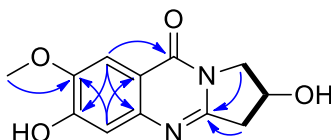
Εικόνα 179. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **38** σε CD_3OD .



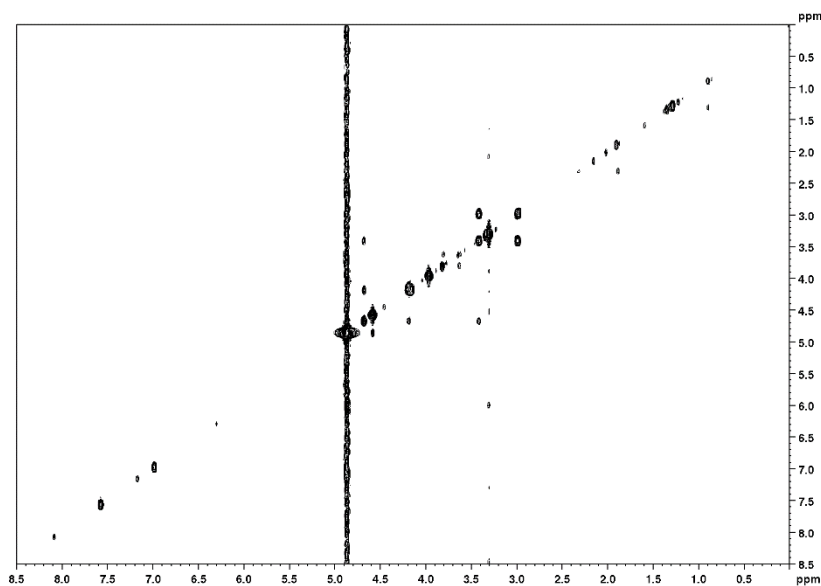
Εικόνα 180. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **38** σε CD₃OD.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **38** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₂H₁₂N₂O₄. Λαμβάνοντας υπόψη το καρβονύλιο, τον διπλό δεσμό και τον αρωματικό δακτύλιο ως έξι από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι τρικυκλικό.

Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **38** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 181) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 182). Οι ομοκυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν καθόρισαν το spin σύστημα H₂-1 / H-2 / H₂-3, ενώ οι συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **38** και υπέδειξαν την αντικατάσταση του δακτυλίου της διυδρο-1,4-διαζεπino-2,5-διόνης από έναν πυριμιδινονικό δακτύλιο.



Εικόνα 181. Ομοκυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροκυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **38**.



Εικόνα 182. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **38** σε CD₃OD.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **38** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **38** παρατίθενται στον Πίνακα 172.

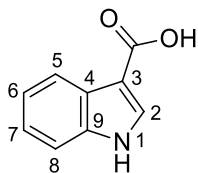
Πίνακας 172. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **38** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	42.3	3.42 (dd, 17.2, 5.6), 2.99 (br d, 17.2)
2	66.1	4.68 (m)
3	56.2	4.20 (dd, 12.6, 4.5), 4.17 (br d, 12.6)
5	161.1	-
5a	113.1	-
6	106.0	7.58 (s)
7	149.5	-
8	155.2	-
9	111.0	6.99 (s)
9a	146.1	-
10a	158.6	-
7-OMe	56.3	3.97 (s)

^a Σε CD₃OD.

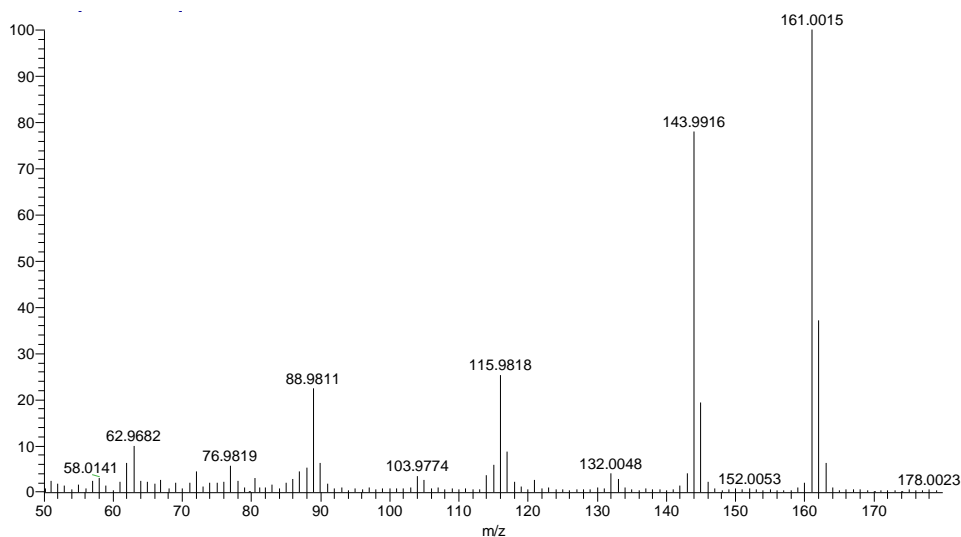
3.39. Μεταβολίτης 39

Ο μεταβολίτης **39** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως καφέ στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 10.3 mg.



39

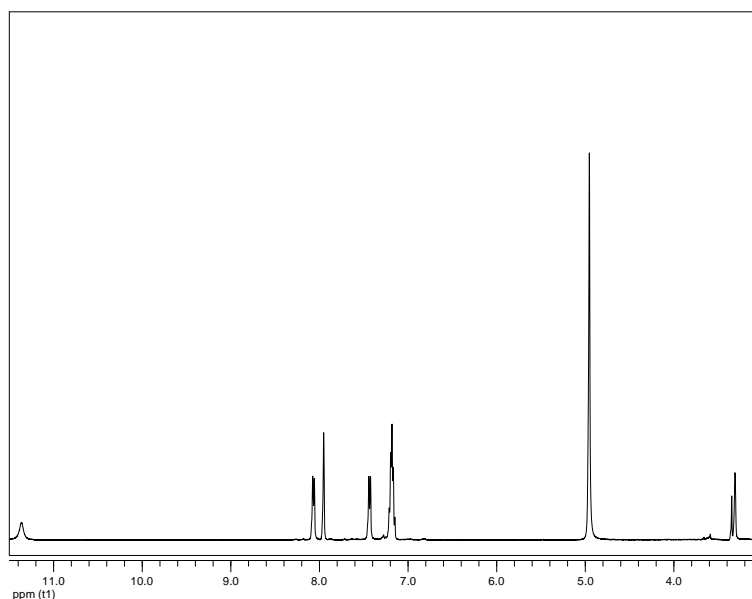
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **39** (Εικ. 183) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 161 και θραύσμα $[M-OH]^+$ σε m/z 144.



Εικόνα 183. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **39**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **39** (Εικ. 184) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.00-8.20), οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός ινδολικού πυρήνα.
- Μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 11.36, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα ευκίνητο πρωτόνιο.



Εικόνα 184. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **39** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **39** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **39** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 3-ινδολοφορμικό οξύ (indole 3-carboxylic acid) (Tan et al., 2004; Hawas et al., 2009), το οποίο έχει επιδείξει *in vitro* κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές σειρές A549 (καρκίνωμα πνεύμονα) και MCF-7 (καρκίνος μαστού) και αντιική δράση έναντι του ιού HIV (Wu et al., 2004) και αποτελεί αναστολέα της τυροσινάσης (Yang et al., 2018). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **39** παρατίθενται στον Πίνακα 173.

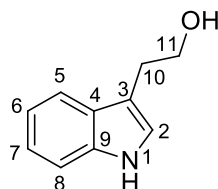
Πίνακας 173. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **39** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.95 (br s)	7.94 (s)
5	8.07 (d, 7.2)	8.05 (dd, 8.0, 1.1)
6	7.18 (m)	7.17 (ddd, 8.0, 8.0, 1.1)
7	7.18 (m)	7.19 (ddd, 8.0, 8.0, 1.1)
8	7.43 (d, 7.6)	7.43 (dd, 8.0, 1.1)
COOH	11.36 (br s)	-

^a Σε CD_3OD . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Tan et al. (2004).

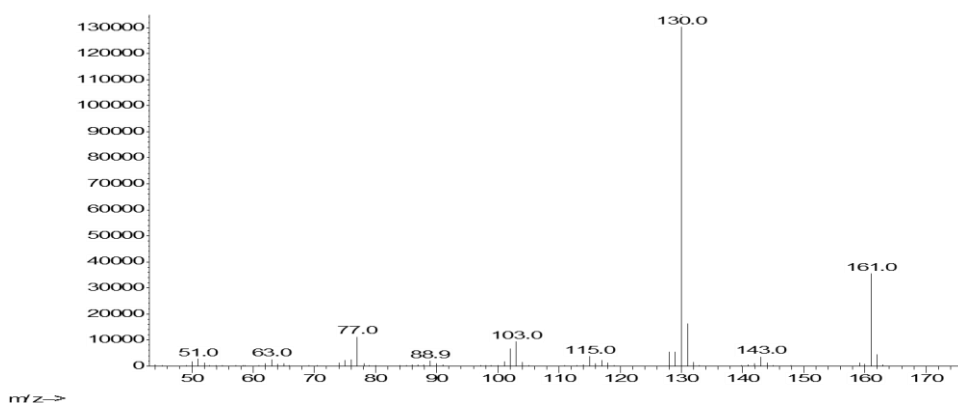
3.40. Μεταβολίτης 40

Ο μεταβολίτης **40** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως μωβ ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.9 mg.



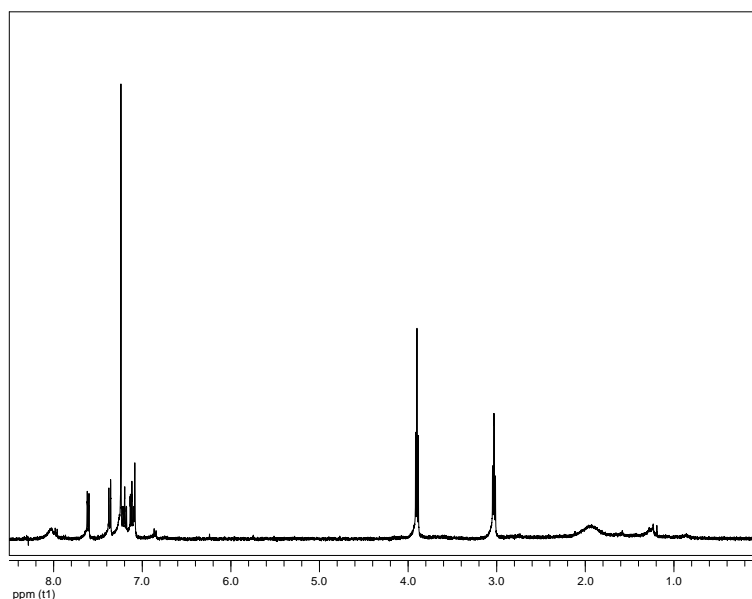
40

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **40** (Εικ. 185) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 161 και θραύσμα $[M-CH_2OH]^+$ σε m/z 130.



Εικόνα 185. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **40**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **40** (Εικ. 186) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν, όπως και στον μεταβολίτη **39**, σήματα στην αρωματική περιοχή (δ 7.00-8.10) που υποδείκνυαν την παρουσία ενός ινδολικού συστήματος και επιπλέον: (i) δύο τριπλές κορυφές σε δ 3.03 και 3.90, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αποθωρακισμένων μεθυλενίων ενός απομονωμένου spin συστήματος και (ii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 1.94, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα ευκίνητο πρωτόνιο.



Εικόνα 186. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **40** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **40** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **40** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν τρυπτοφόλη (tryptophol) (Sugawara & Strobel, 1987), το οποίο έχει εμφανίσει γενοτοξική (Kosalec et al., 2008; Inagaki et al., 2007), αντιισταμινική (Xie et al., 2017) και αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Cryphonectria parasitica* (Yue et al., 2000). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **40** παρατίθενται στον Πίνακα 174.

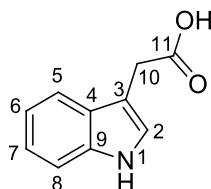
Πίνακας 174. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **40** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	8.03 (br s)	8.08 (br s)
2	7.08 (br s)	7.08 (s)
5	7.61 (d, 8.0)	7.37 (d, 7.5)
6	7.12 (ddd, 8.0, 7.2, 1.0)	7.15 (t, 7.5)
7	7.20 (ddd, 8.0, 7.2, 1.2)	7.18 (t 7.5)
8	7.37 (d, 8.0)	7.62 (d, 7.5)
10	3.03 (t, 6.4)	3.03 (t, 6.4)
11	3.90 (t, 6.4)	3.90 (t, 6.4)
OH	1.94 (br s)	1.65 (s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Sugawara & Strobel (1987).

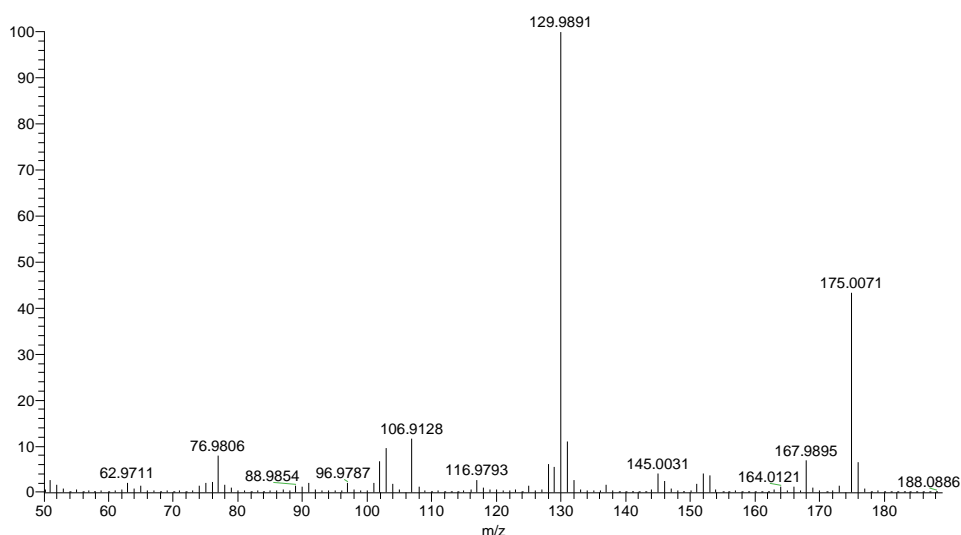
3.41. Μεταβολίτης 41

Ο μεταβολίτης **41** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως καφέ ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 4.1 mg.



41

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **41** (Εικ. 187) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 175, υποδεικνύοντας τη παρουσία ενός επιπλέον μεθυλενίου σε σχέση με τον μεταβολίτη **39**, και θραύσμα $[M-COOH]^+$ σε m/z 130.

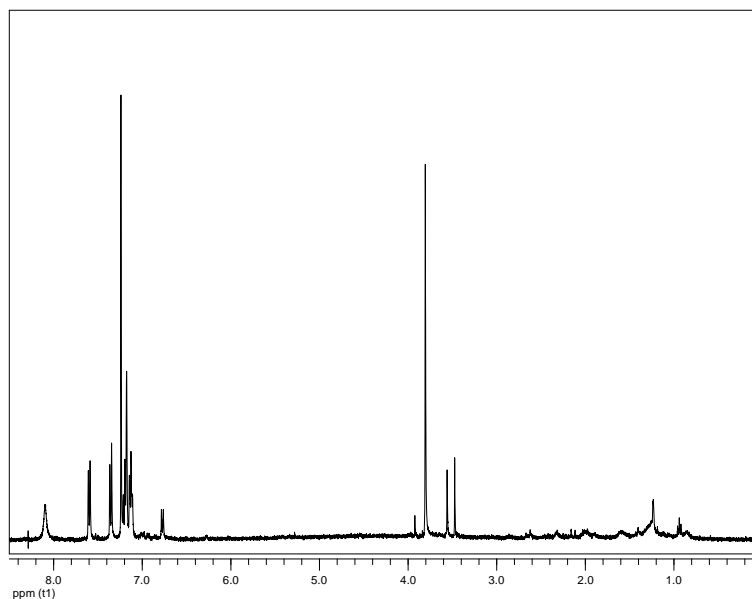


Εικόνα 187. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **41**.

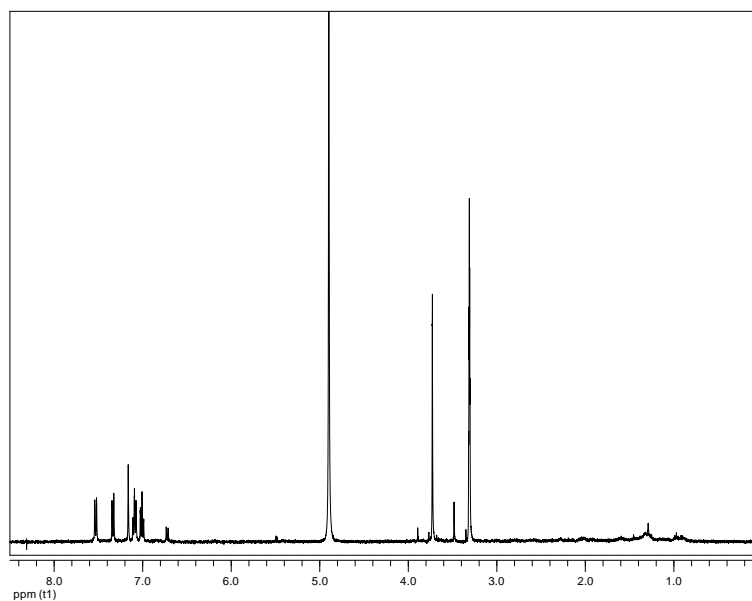
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **41** (Εικ. 188) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν, κατ' αναλογία με τους μεταβολίτες **39** και **40**, σήματα στην αρωματική περιοχή (δ 7.00-8.15) που υποδείκνυαν την παρουσία ενός ινδολικού συστήματος και επιπλέον μία απλή κορυφή σε δ 3.81, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **41** (Εικ. 189) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτό του ευκίνητου πρωτονίου που είχε ανταλλαχθεί με

δευτέριο.



Εικόνα 188. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **41** σε CDCl_3 .



Εικόνα 189. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **41** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **41** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **41** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 3-ινδολοξικό οξύ (indole 3-acetic acid) (Obata et al., 1997; Han et al., 2018), το

οποίο έχει εμφανίσει αντιαγγειογενετική (Cerezo et al., 2017), τοπική αντιφλεγμονώδη (Jones et al., 1995), φυτοτοξική (Shimada et al., 1999) και αντιμυκητιακή δράση έναντι του *C. parasitica* (Yue et al., 2000). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **41** παρατίθενται στον Πίνακα 175.

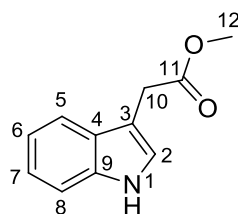
Πίνακας 175. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **41** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c,d}}$
1	8.10 (br s)	7.14 (s)		
2	7.18 (s)	7.24 (s)	7.16 (s)	7.15 (s)
5	7.60 (d, 7.7)	7.38 (d, 7.3)	7.53 (d, 8.0)	7.53 (d, 7.5)
6	7.13 (br t, 7.7)	7.17-7.22 (m)	7.01 (ddd, 8.0, 7.2, 0.8)	6.99 (t, 7.0)
7	7.20 (br t, 7.7)	7.17-7.22 (m)	7.09 (ddd, 8.1, 7.2, 1.1)	7.08 (t, 7.0)
8	7.36 (d, 7.7)	7.63 (d, 7.6)	7.34 (d, 8.1)	7.32 (d, 7.5)
10	3.81 (s)	3.80 (s)	3.73 (s)	3.72 (s)
OH		8.09 (br s)		

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Obata et al. (1997). ^c Σε CD₃OD. ^d Βιβλιογραφικά δεδομένα από Han et al. (2018).

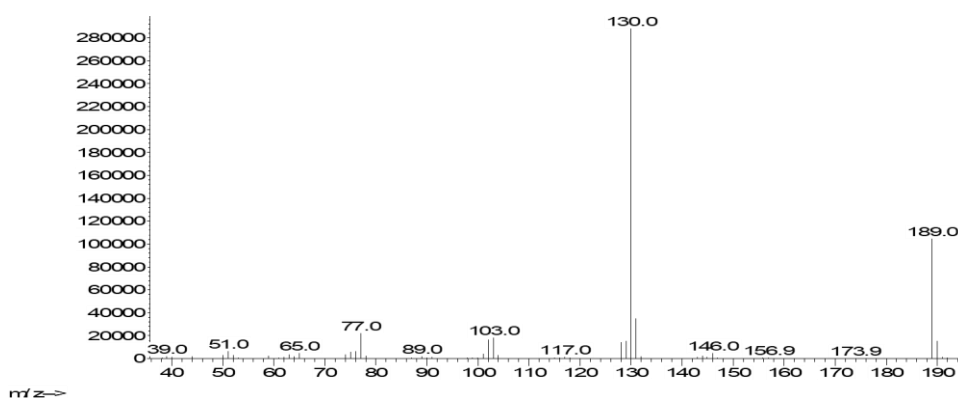
3.42. Μεταβολίτης 42

Ο μεταβολίτης **42** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κόκκινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.4 mg.



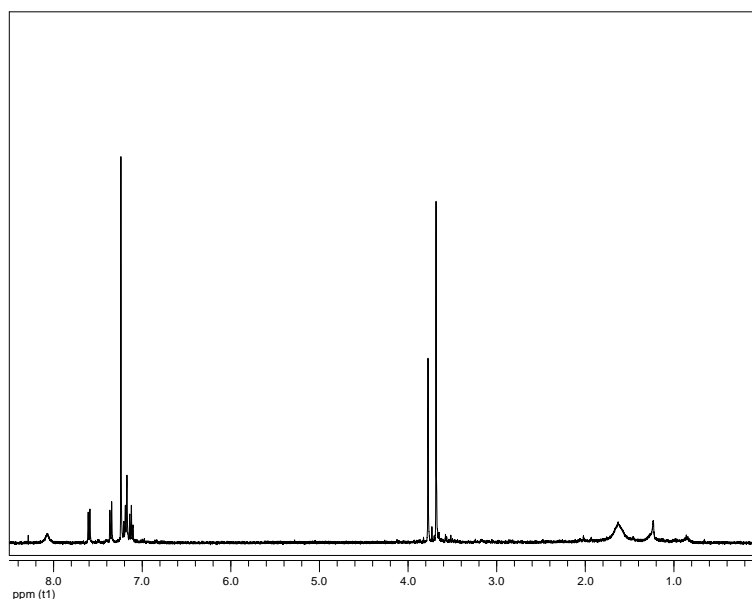
42

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **42** (Εικ. 190) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 189 και θραύσμα $[M-CH_3COOH]^+$ σε m/z 130.



Εικόνα 190. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **42**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **42** (Εικ. 191) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν, κατ' αναλογία με τους μεταβολίτες **39-41**, σήματα στην αρωματική περιοχή (δ 7.00-8.10) που υποδείκνυαν την παρουσία ενός ινδολικού συστήματος και επιπλέον: (i) μία απλή κορυφή σε δ 3.68, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε σε μία μεθοξυ-ομάδα και (ii) μία απλή κορυφή σε δ 3.77, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου.



Εικόνα 191. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **42** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **42** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **42** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν μεθυλεστέρας του 3-ινδολοξικού οξέος (methyl indole-3-acetate) (Kang et al., 2018b), το οποίο έχει δείξει φυτοτοξική (Choi et al., 1993) και αντιμυκητιακή δράση έναντι του *C. parasitica* (Yue et al., 2000). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **42** παρατίθενται στον Πίνακα 176.

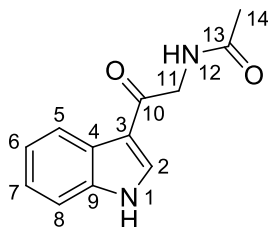
Πίνακας 176. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **42** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	8.07 (br s)	8.06 (br s)
2	7.17 (s)	7.20 (m)
5	7.60 (d, 7.7)	7.62 (d, 7.5)
6	7.12 (t, 7.7)	7.14 (ddd, 8.1, 7.5, 1.1)
7	7.19 (t, 7.7)	7.21 (m)
8	7.35 (d, 7.7)	7.37 (dt, 8.1, 1.1)
10	3.77 (s)	3.79 (s)
12	3.68 (s)	3.70 (s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Kang et al. (2018b).

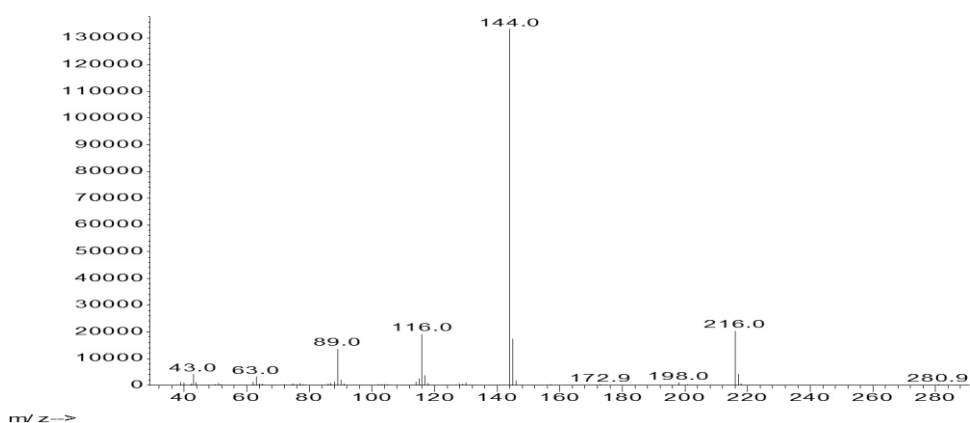
3.43. Μεταβολίτης 43

Ο μεταβολίτης **43** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κόκκινο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 5.3 mg.



43

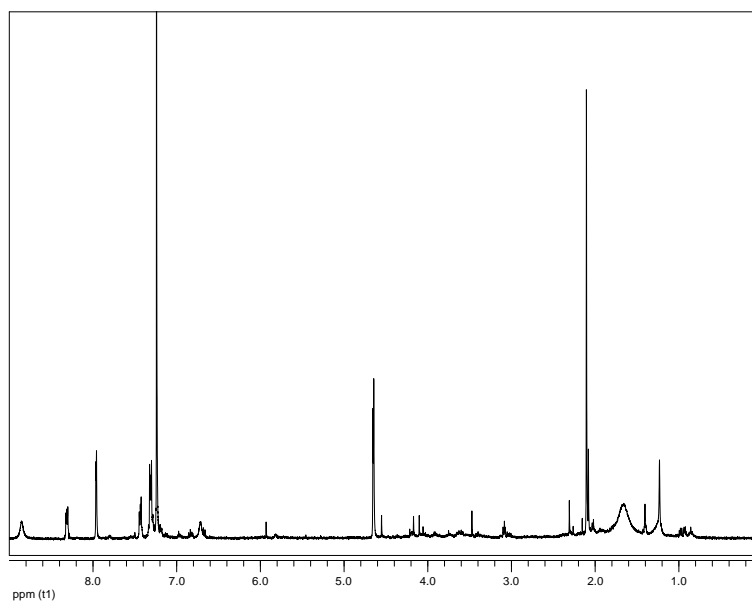
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **43** (Εικ. 192) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 216 και θραύσμα $[M-C_3H_6NO]^+$ σε m/z 144.



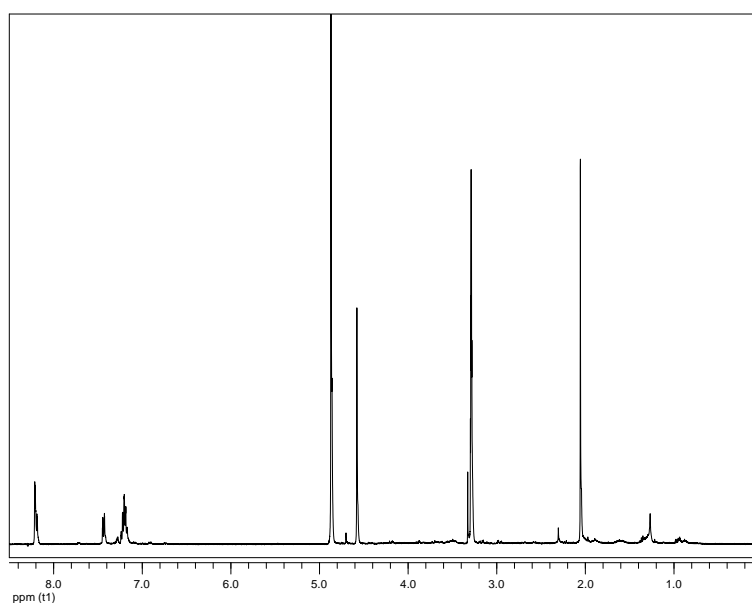
Εικόνα 192. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **43**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **43** (Εικ. 193) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν, όπως στους μεταβολίτες **39-42**, σήματα στην αρωματική περιοχή (δ 7.00-8.90) που παρέπεμπαν στη παρουσία ενός ινδολικού συστήματος. Επιπλέον, εμφανίστηκαν: i) μία απλή κορυφή σε δ 2.10, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε ένα μεθυλίο μίας ακετοξυομάδας, ii) μία διπλή κορυφή σε δ 4.65, οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αποθωρακισμένο μεθυλένιο και iii) μία απλή κορυφή σε δ 6.71 που αποδόθηκε σε ένα ευκίνητο πρωτόνιο.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **43** (Εικ. 194) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτό του ευκίνητου πρωτονίου που είχε ανταλλαχθεί με δευτέριο.



Εικόνα 193. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **43** σε CDCl_3 .



Εικόνα 194. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **43** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **43** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **43** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *N*-ακετυλο- β -οξοτρυπταμίνη (*N*-acetyl- β -oxo-tryptamine) (Iakovou et al., 2002; Martínez-Luis et al., 2012), το οποίο έχει δείξει ήπια αντιπαρασιτική δράση έναντι του *Trypanosoma cruzi*, καθώς και μέτρια κυτταροτοξικότητα έναντι φυσιολογικών κυττάρων *in*

vitro. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **43** παρατίθενται στον Πίνακα 177.

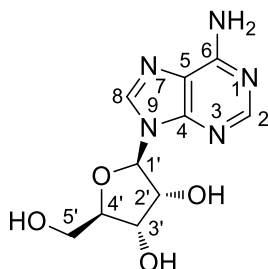
Πίνακας 177. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **43** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{c,d}}$
1	8.85 (br s)	8.77 (s)		
2	7.96 (d, 2.9)	7.99 (s)	8.21 (d, 2.9)	8.26 (br s)
5	8.31 (m)	8.32-8.36 (m)	8.19 (dd, 7.0, 2.0)	8.24 (m)
6	7.31 (m)	7.34-7.44 (m)	7.20 (m)	7.25 (m)
7	7.31 (m)	7.34-7.44 (m)	7.20 (m)	7.25 (m)
8	7.43 (m)	7.34-7.44 (m)	7.44 (dd, 7.0, 2.0)	7.48 (m)
11	4.65 (d, 3.9)	4.66 (s)	4.58 (br s)	4.62 (s)
12	6.71 (br s)	6.71 (br s)		
14	2.10 (s)	2.16 (s)	2.06 (s)	2.11 (s)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ιακονου et al. (2002). ^c Σε CD₃OD. ^d Βιβλιογραφικά δεδομένα από Martínez-Luis et al. (2012).

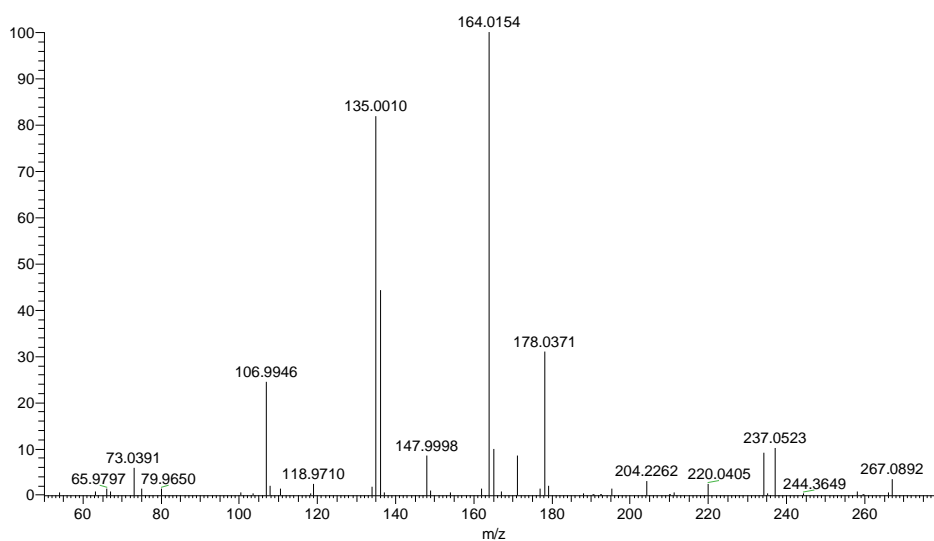
3.44. Μεταβολίτης 44

Ο μεταβολίτης **44** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.7 mg.



44

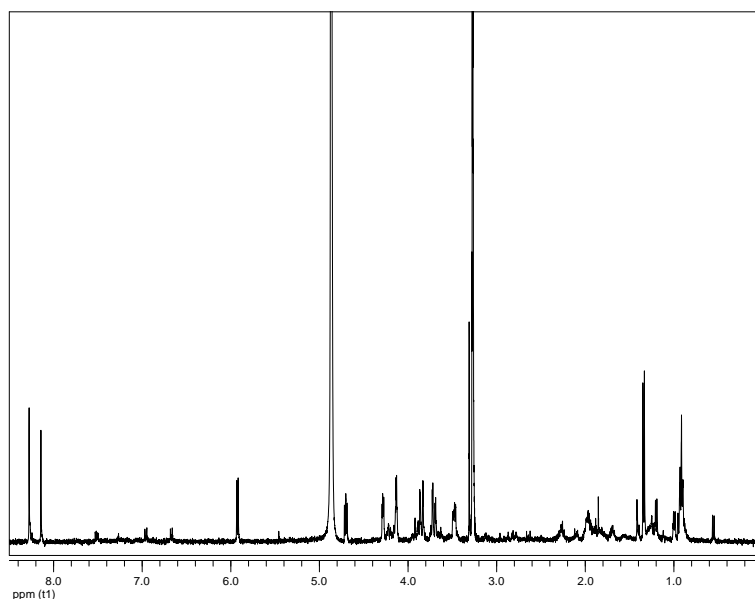
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **44** (Εικ. 195) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 267 και θραύσμα $[C_5H_5N_5]^+$ σε m/z 135.



Εικόνα 195. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **44**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **44** (Εικ. 196) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν:

- Έξι κορυφές μεταξύ 3.50 και 6.00 ppm, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός σακχάρου.
- Δύο απλές κορυφές σε δ 8.14 και 8.28, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο αποθωρακισμένα αρωματικά πρωτόνια.



Εικόνα 196. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **44** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **44** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **44** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό νουκλεοσίδιο αδενοσίνη (adenosine), το οποίο έχει απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές και αποτελεί δομικό συστατικό του DNA (Wu et al., 2000; Ding et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **44** παρατίθενται στον Πίνακα 178.

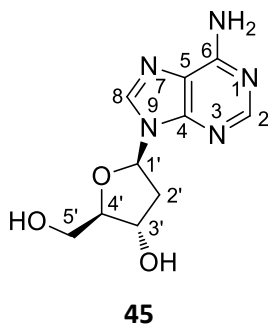
Πίνακας 178. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **44** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	8.28 (s)	8.30 (s)
8	8.14 (s)	8.17 (s)
1'	5.93 (d, 6.3)	5.95 (d, 7.2)
2'	4.70 (dd, 6.3, 5.1)	4.72 (dd, 7.2, 4.8)
3'	4.28 (dd, 5.1, 2.6)	4.30 (dd, 4.8, 2.4)
4'	4.13 (ddd, 2.6, 2.6, 2.6)	4.16 (ddd, 2.4, 2.4, 2.4)
5'	3.85 (dd, 12.6, 2.6), 3.71 (dd, 12.6, 2.6)	3.87 (dd, 12.4, 2.4), 3.73 (dd, 12.4, 2.4)

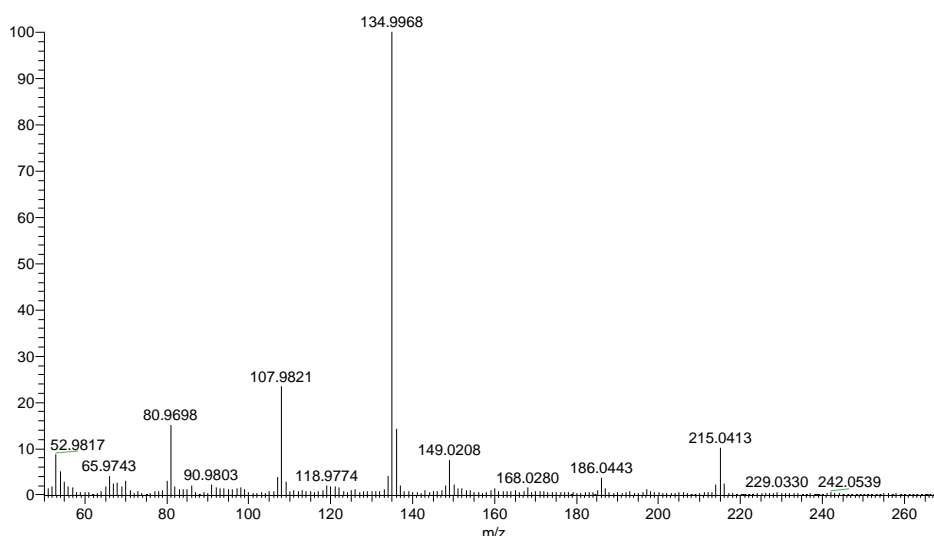
^a Σε CD_3OD . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Wu et al. (2000).

3.45. Μεταβολίτης 45

Ο μεταβολίτης **45** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.6 mg.

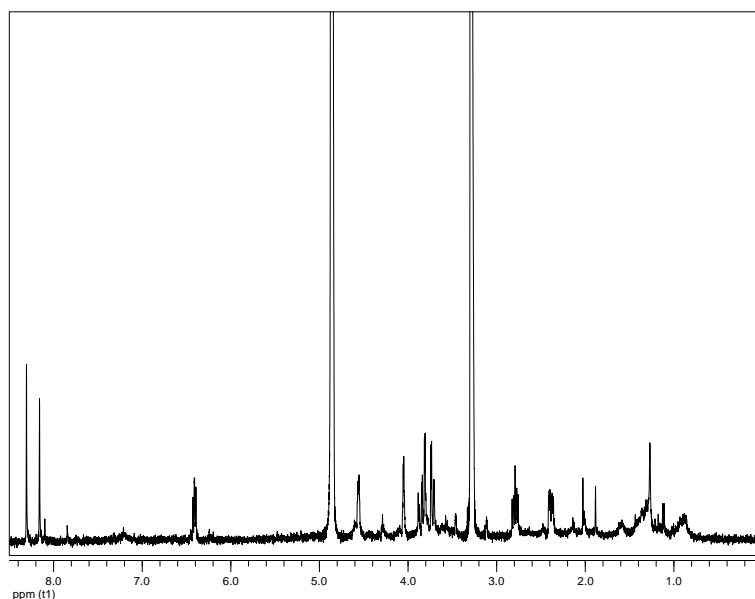


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **45** (Εικ. 197) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσμα $[M-2H_2O]^+$ σε m/z 215, καθώς και θραύσμα $[C_5H_5N_5]^+$ σε m/z 135, όπως και στη περίπτωση του μεταβολίτη **44**.



Εικόνα 197. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **45**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **45** (Εικ. 198) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **44** σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Η κυριότερη διαφορά εντοπίστηκε στην αντικατάσταση ενός μεθινίου από ένα μεθυλένιο (2.79 και 2.39 ppm), υποδεικνύοντας ότι το σάκχαρο του μεταβολίτη **45** είναι η δεοξυριβόζη αντί της ριβόζης στον μεταβολίτη **44**.



Εικόνα 198. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **45** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **45** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **45** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό νουκλεοσίδιο 2'-δεοξυ-αδενοσίνη (2'-deoxy-adenosine), το οποίο έχει απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές και αποτελεί δομικό συστατικό του DNA (Huang et al., 2011; Ciuffreda et al., 2007). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **45** παρατίθενται στον Πίνακα 179.

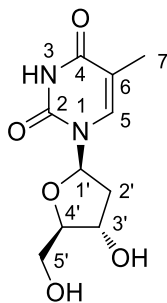
Πίνακας 179. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **45** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	8.31 (s)	8.33 (s)
8	8.16 (s)	8.19 (s)
1'	6.41 (dd, 7.8, 6.1)	6.45 (t, 6.2)
2'	2.79 (ddd, 13.5, 7.8, 5.7), 2.39 (ddd, 13.5, 6.1, 2.5)	2.83 (m), 2.43 (m)
3'	4.05 (dd, 5.7, 2.5)	4.09 (m)
4'	4.56 (m)	4.59 (m)
5'	3.83 (dd, 12.4, 3.0), 3.72 (dd, 12.4, 3.4)	3.86 (dd, 12.0, 3.0), 3.76 (dd, 12.0, 3.3)

^a Σε CD_3OD . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Huang et al. (2011).

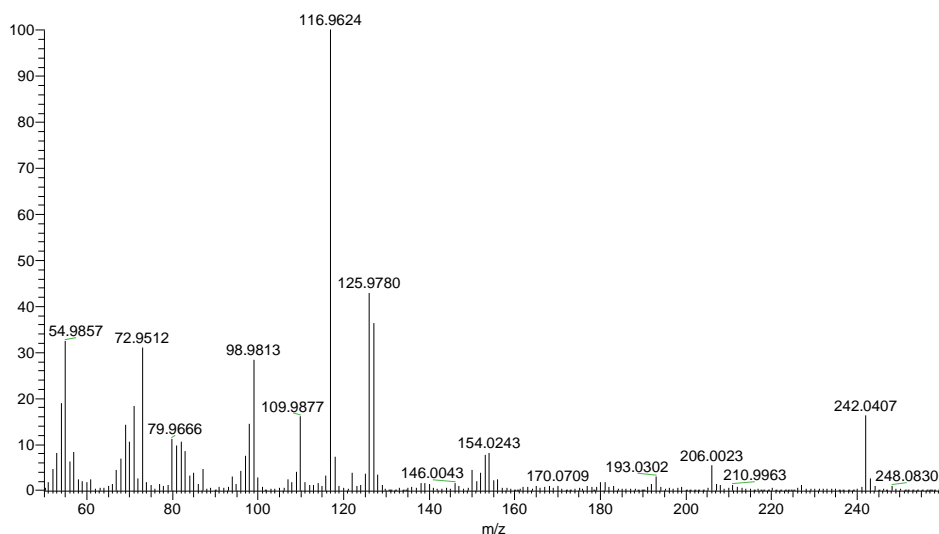
3.46. Μεταβολίτης 46

Ο μεταβολίτης **46** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.3 mg.



46

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **46** (Εικ. 199) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 242 και θραύσματα $[C_5H_6N_2O_2]^+$ και $[C_5H_9O_3]^+$ σε m/z 126 και 117, αντίστοιχα.

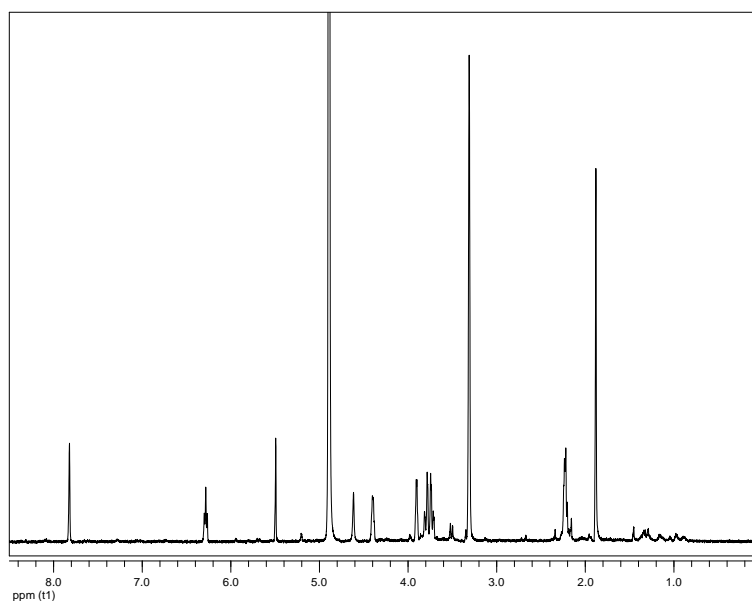


Εικόνα 199. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **46**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **46** (Εικ. 200) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 1.88 που ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε σε ένα βινυλικού μεθύλιο σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.
- Επτά κορυφές από 2.00 έως 6.50 ppm, οι οποίες κατ' αναλογία με τους μεταβολίτες **44** και **45** αποδόθηκαν σε πρωτόνια ενός σακχάρου.
- Μία απλή κορυφή σε δ 7.82, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και

αντιστοιχούσε σε ολεφινικό μεθίλιο ενός τριυποκατεστημένου διπλού δεσμού.



Εικόνα 200. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **46** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **46** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **46** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό νουκλεοσίδιο θυμιδίνη (thymidine), το οποίο έχει απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές και αποτελεί δομικό συστατικό του DNA (Ying et al., 2013; Xie et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **46** παρατίθενται στον Πίνακα 180.

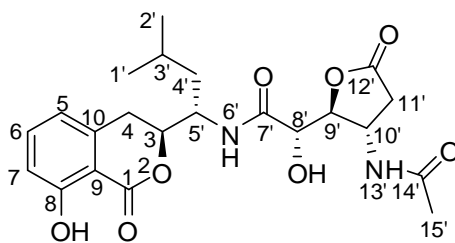
Πίνακας 180. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **46** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.62 (br s)	4.61 (br s)
6	7.82 (s)	7.83 (d, 0.5)
7	1.88 (s)	1.90 (d, 1.0)
1'	6.28 (t, 6.7)	6.29 (t, 7.0)
2'	2.23 (m)	2.25 (m)
3'	4.40 (m)	4.42 (ddd, 6.5, 3.5, 3.0)
4'	3.90 (m)	3.93 (dd, 7.0, 3.5)
5'	3.80 (dd, 12.0, 2.6), 3.73 (dd, 12.0, 3.2)	3.82 (dd, 12.0, 3.0), 3.75 (dd, 12.0, 1.5)

^a Σε CD_3OD . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ying et al. (2013).

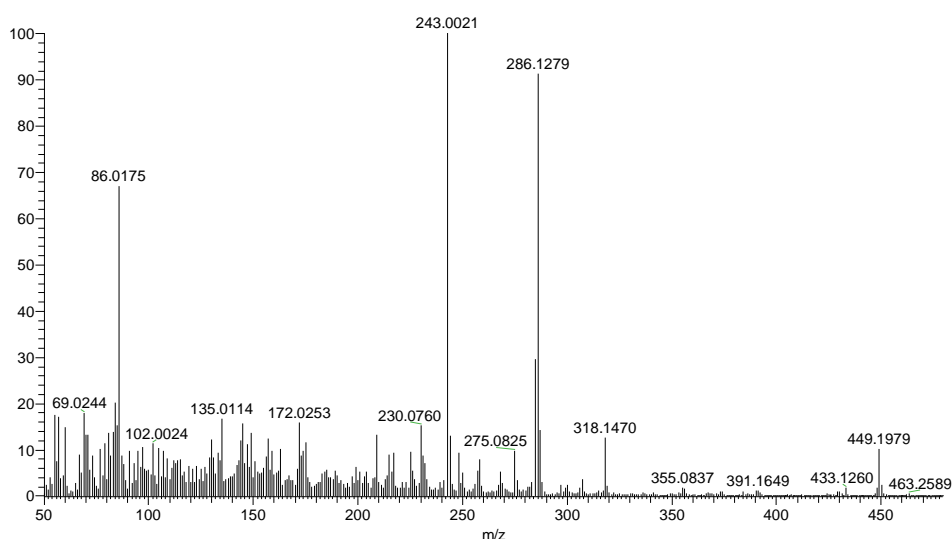
3.47. Μεταβολίτης 47

Ο μεταβολίτης **47** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.3 mg.



47

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **47** (Εικ. 201) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 449 και θραύσμα $[C_{13}H_{22}N_2O_5]^+$ σε m/z 286.



Εικόνα 201. Φάσμα μάζας (CIMS) του μεταβολίτη **47**.

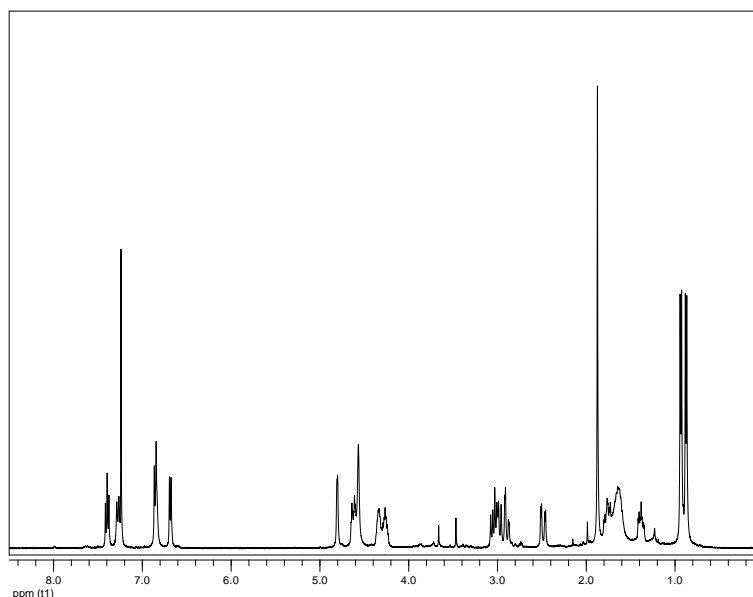
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **47** (Εικ. 202) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 0.88 και 0.93, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλιφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.87, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.
- Πέντε κορυφές σε δ 4.27, 4.34, 4.57, 4.63 και 4.80, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα

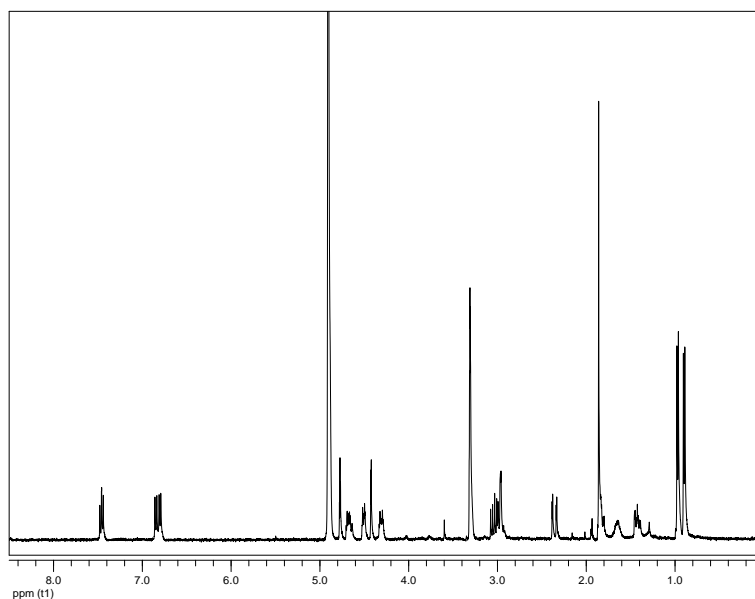
πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε αποθωρακισμένα μεθίλια πιθανώς λόγω γειτνίασης με ετεροάτομα.

- Μία ευρεία απλή και μία διπλή κορυφή σε δ 6.83 και 7.28, αντίστοιχα, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο ευκίνητα πρωτόνια.
- Τρεις κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.40, 6.85 και 6.68), οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός 1,2,3-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **47** (Εικ. 203) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα, με εξαίρεση αυτά των ευκίνητων πρωτονίων που είχαν ανταλλαχθεί με δευτέριο.



Εικόνα 202. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **47** σε CDCl_3 .



Εικόνα 203. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **47** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **47** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **47** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *N*-ακετυλοκουμαρίνη C (*N*-acetylcoumarin C) (Park et al., 2016), το οποίο απομονώθηκε πρώτη φορά από στέλεχος του *Bacillus rumilus* (Shimojima et al., 1982) και δεν επέδειξε γαστροπροστατευτική δράση, όπως άλλα παρόμοια μόρια. Επίσης, δεν παρουσίασε κυτταροτοξική δράση έναντι διάφορων καρκινικών σειρών στις οποίες αξιολογήθηκε η δράση του (Bai et al., 2014). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **47** παρατίθενται στον Πίνακα 181.

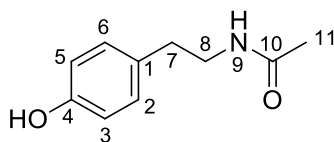
Πίνακας 181. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **47** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,c}}$
3	4.63 (dt, 11.8, 3.8)	4.68 (ddd, 10.7, 4.3, 3.8)	4.67 (dt, 11.3, 3.8)
4	2.99 (dd, 16.5, 11.8), 2.89 (dd, 16.5, 3.8)	2.96 (m)	2.95 (m)
5	6.85 (d, 7.9)	6.80 (d, 7.5)	6.79 (d, 8.0)
6	7.40 (t, 7.9)	7.46 (dd, 8.4, 7.5)	7.45 (t, 8.0)
7	6.68 (d, 7.9)	6.85 (d, 8.4)	6.83 (d, 8.0)
1'	0.93 (d, 6.6)	0.97 (d, 6.6)	0.95 (d, 6.7)
2'	0.88 (d, 6.5)	0.90 (d, 6.5)	0.88 (d, 6.5)
3'	1.63 (m)	1.65 (m)	1.62 (m)
4'	1.77 (ddd, 14.0, 11.0, 4.7), 1.38 (ddd, 14.0, 9.6, 4.6)	1.84 (m), 1.42 (m)	1.82 (m), 1.41 (ddd, 13.9, 9.8, 4.2)
5'	4.27 (m)	4.31 (dt, 10.7, 3.8)	4.30 (dt, 10.9, 3.9)
6'	7.28 (d, 9.3)		
8'	4.57 (br s)	4.42 (d, 2.5)	4.41 (d, 2.4)
9'	4.80 (d, 2.3)	4.77 (t, 2.5)	4.76 (t, 2.4)
10'	4.34 (m)	4.51 (dt, 8.9, 2.5)	4.49 (dt, 8.9, 2.5)
11'	3.04 (dd, 18.2, 9.2), 2.49 (dd, 18.2, 4.3)	3.04 (dd, 18.3, 8.9), 2.36 (dd, 18.3, 2.7)	3.03 (dd, 18.3, 8.9), 2.35 (dd, 18.3, 2.7)
13'	6.83 (br s)		
15'	1.87 (s)	1.86 (s)	1.85 (s)

^a Σε CDCl₃. ^b Σε CD₃OD. ^c Βιβλιογραφικά δεδομένα από Park et al. (2016).

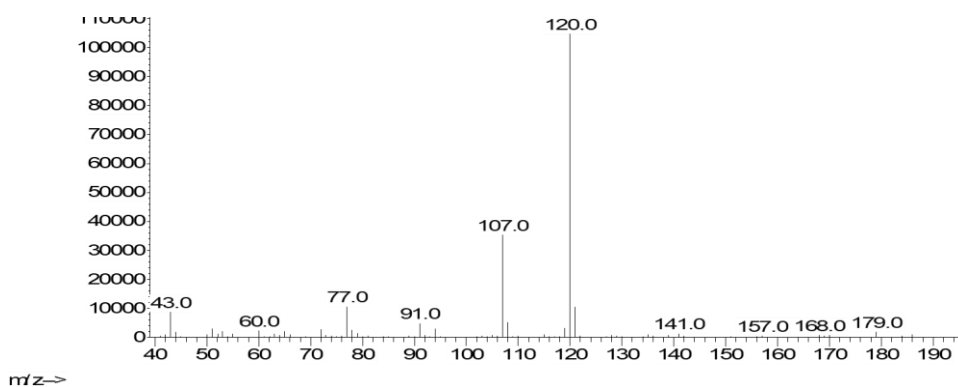
3.48. Μεταβολίτης 48

Ο μεταβολίτης **48** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.1 mg.



48

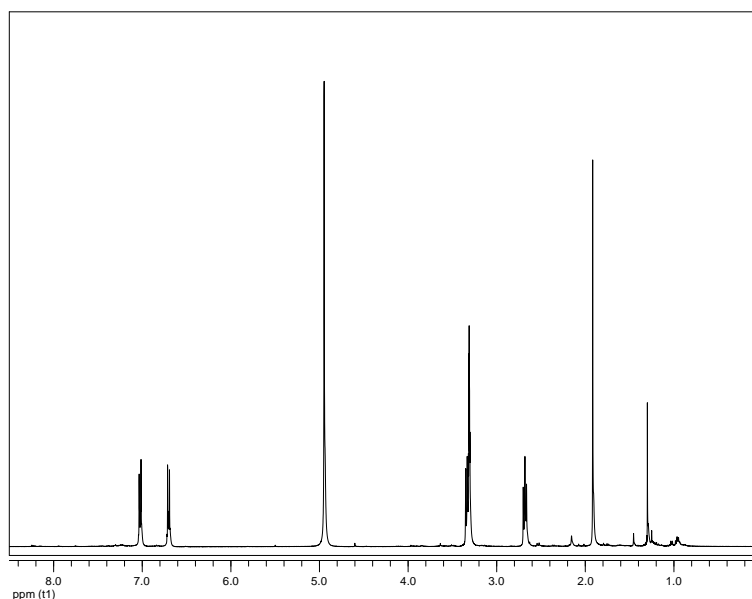
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **48** (Εικ. 204) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 179 και θραύσματα $[M-CH_3CONH_3]^+$ και $[C_7H_7O]^+$ σε m/z 120 και 107, αντίστοιχα.



Εικόνα 204. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **48**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **48** (Εικ. 205) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 1.92, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τεταρτοταγές άτομο άνθρακα.
- Δύο τριπλές κορυφές σε δ 2.68 και 3.33, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός απομονωμένου συστήματος δύο μεθυλενίων.
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 6.70 και 7.02, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 205. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **48** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **48** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **48** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *N*-ακετυλοτυραμίνη (*N*-acetyltyramine) (Sun et al., 2015), το οποίο έχει επιδείξει αντιαμοπεταλιακή δράση (Lee et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48** παρατίθενται στον Πίνακα 182.

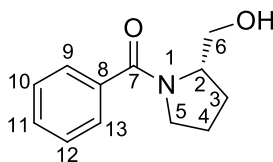
Πίνακας 182. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **48** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.02 (d, 8.5)	7.04 (d, 7.5)
3	6.70 (d, 8.5)	6.74 (d, 7.5)
5	6.70 (d, 8.5)	6.74 (d, 7.5)
6	7.02 (d, 8.5)	7.04 (d, 7.5)
7	2.68 (t, 7.3)	2.70 (d, 7.5)
8	3.33 (t, 7.3)	3.33 (t, 7.5)
11	1.92 (s)	1.92 (s)

^a Σε CD_3OD . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Sun et al. (2015).

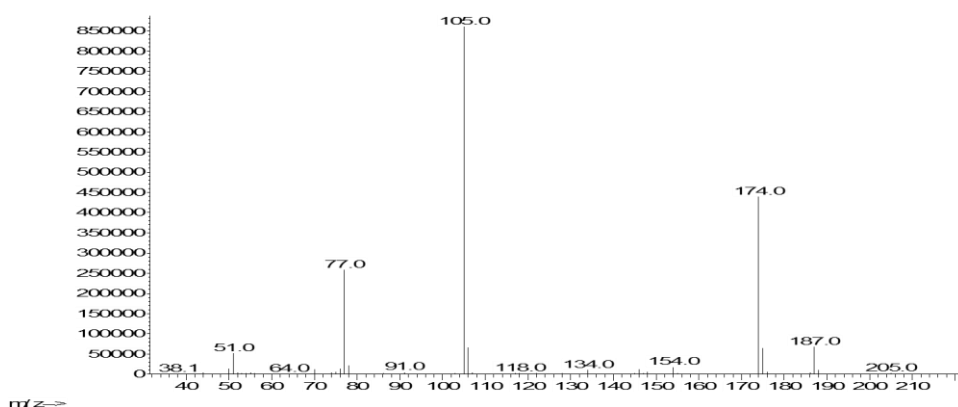
3.49. Μεταβολίτης 49

Ο μεταβολίτης **49** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 6.7 mg.



49

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **49** (Εικ. 206) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 205 και θραύσματα $[M-H_2O]^+$, $[M-CH_2OH]^+$, $[C_6H_5CO]^+$ και $[C_6H_5]^+$ σε m/z 187, 174, 105 και 77, αντίστοιχα, που υποδεικνυαν την παρουσία υδροξυλίου και αρωματικού δακτυλίου στο μόριο.

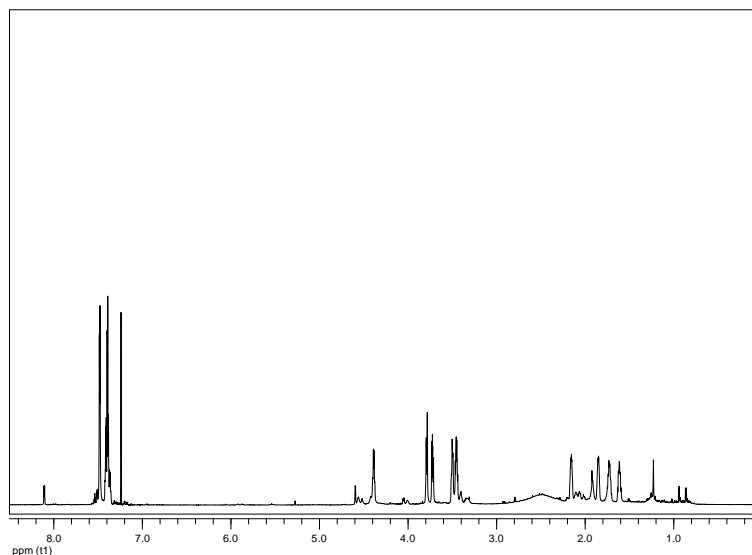


Εικόνα 206. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **49**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **49** (Εικ. 207) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

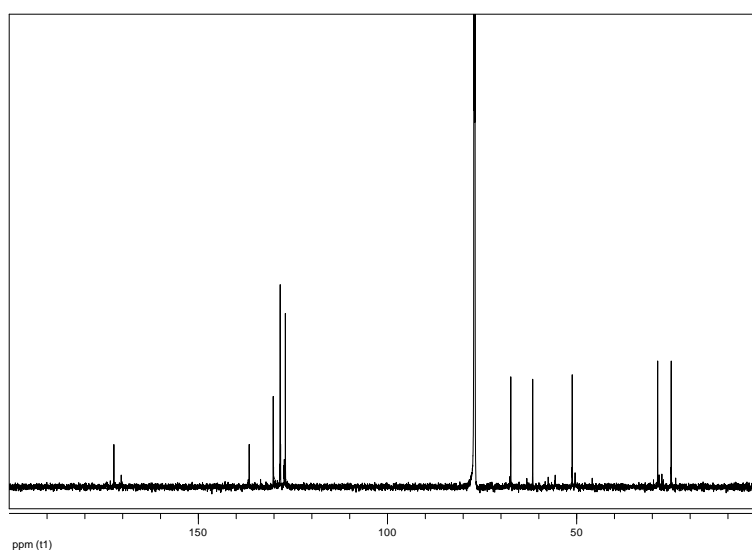
- Τέσσερις πολλαπλές κορυφές σε δ 3.45, 3.50, 3.72 και 3.79, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια δύο αποθωρακισμένων μεθυλενίων.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.39, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα αποθωρακισμένο μεθίλιο πιθανώς λόγω γεινίασης με ετεροάτομο.
- Δύο κορυφές στην αρωματική περιοχή (δ 7.39 και 7.48), οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου

αρωματικού δακτυλίου.

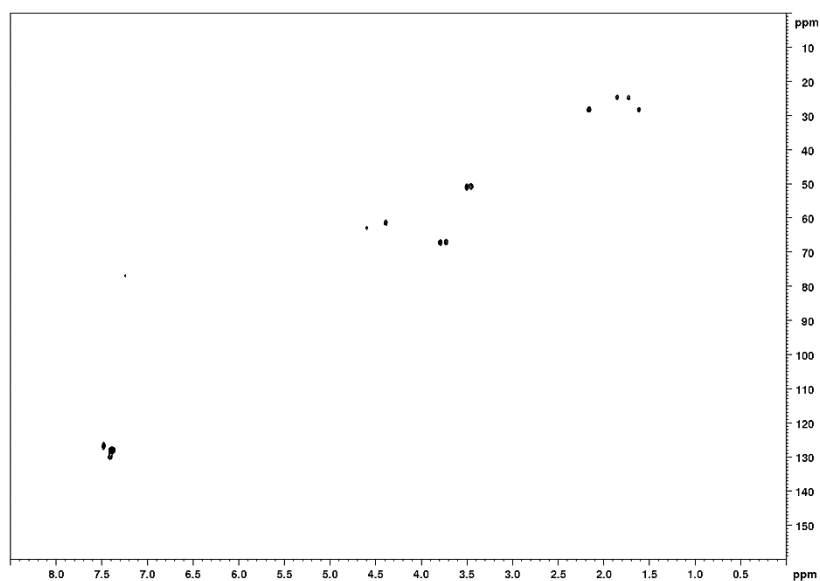


Εικόνα 207. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **49** σε CDCl_3 .

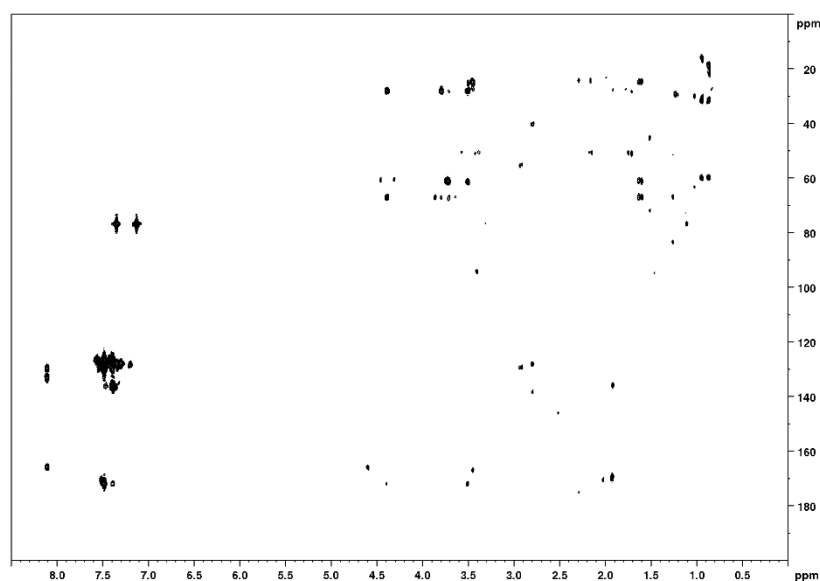
Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **49** (Εικ. 208) σε CDCl_3 εμφανίσθηκαν 12 κορυφές, οι οποίες με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 209) και HMBC (Εικ. 210) αντιστοιχούσαν σε τέσσερα δευτεροταγή, έξι τριτοταγή και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου, καθώς και ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 172.3, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία ενός αμιδίου στο μόριο.



Εικόνα 208. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **49** σε CDCl_3 .



Εικόνα 209. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **49** σε CDCl₃.

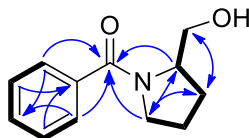


Εικόνα 210. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **49** σε CDCl₃.

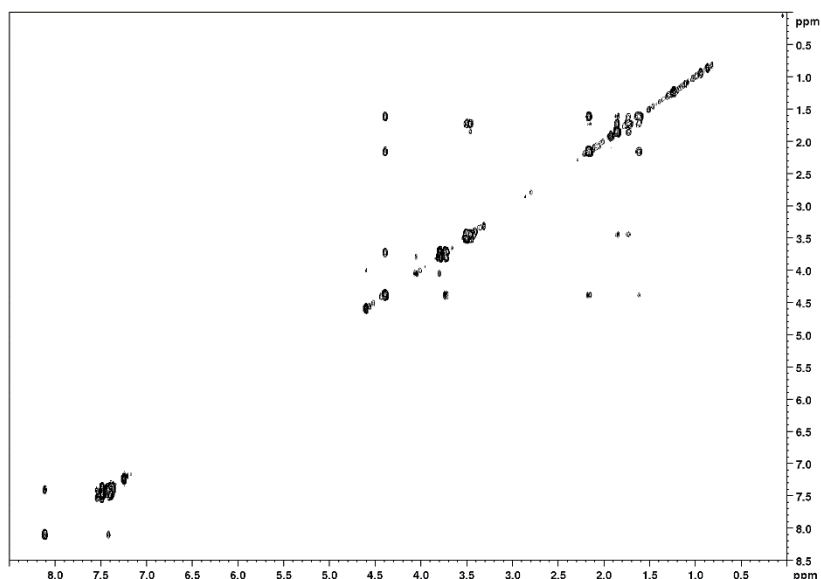
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **49** οδήγησε στον μοριακό τύπο C₁₂H₁₅NO₂. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο και τον καρβονύλιο ως πέντε από τους έξι βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δicyclic.

Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **49** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 211) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT, HMBC και COSY (Εικ. 212). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο

απομονωμένα spin συστήματα: i) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-9 έως H-13) και iii) H-2 / (H₂-6) H₂-3 / H₂-4 / H₂-5. Οι ετεροπυρηνικές συζεύξεις του C-7 με τα H-2, H-5, 9 και 11, καθώς και οι συσχετίσεις του C-8 με τα H-10 και 12 που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC συνέδεσαν τα δύο spin συστήματα και καθόρισαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **49**.



Εικόνα 211. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **49**.



Εικόνα 212. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **49** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων και της ειδικής στροφικής ικανότητας ($[\alpha]_D^{-87^\circ}$, c 0.4, MeOH) του μεταβολίτη **49** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το συνθετικό προϊόν *N*-βενζοϋλ-*(S)*-προλινόλη [*N*-benzoyl-*(S)*-prolinol], το οποίο απομονώνεται για πρώτη φορά από φυσική πηγή (Takahashi et al., 1987; Ghosh et al., 2014). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **49** παρατίθενται στον Πίνακα 183.

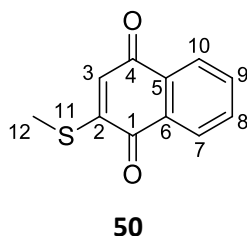
Πίνακας 183. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **49** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	$\delta_c^{a,b}$	$\delta_H^{a,b}$
2	61.6	4.39 (dd, 14.5, 7.5)	61.6	4.39 (dd, 14.5, 7.2)
3	28.6	2.16 (m), 1.62 (m)	28.6	2.23-2.07 (m), 1.96-1.49 (m)
4	25.0	1.85 (m), 1.73 (m)	25.1	1.96-1.49 (m)
5	51.2	3.50 (ddd, 10.4, 7.3, 3.0), 3.45 (ddd, 10.4, 10.1, 6.6)	51.2	3.60-3.34 (m)
6	67.4	3.79 (br d, 11.5), 3.72 (dd, 11.5, 7.5)	67.3	3.85-3.63 (m)
7	172.3	-	172.3	-
8	136.6	-	136.8	-
9	127.0	7.48 (d, 7.8)	127.1	7.49 (dd, 7.4, 1.8)
10	128.4	7.39 (m)	128.7	7.40 (t, 6.2)
11	130.2	7.39 (m)	130.3	7.40 (t, 6.2)
12	128.4	7.39 (m)	128.5	7.40 (t, 6.2)
13	127.0	7.48 (d, 7.8)	127.0	7.49 (dd, 7.4, 1.8)

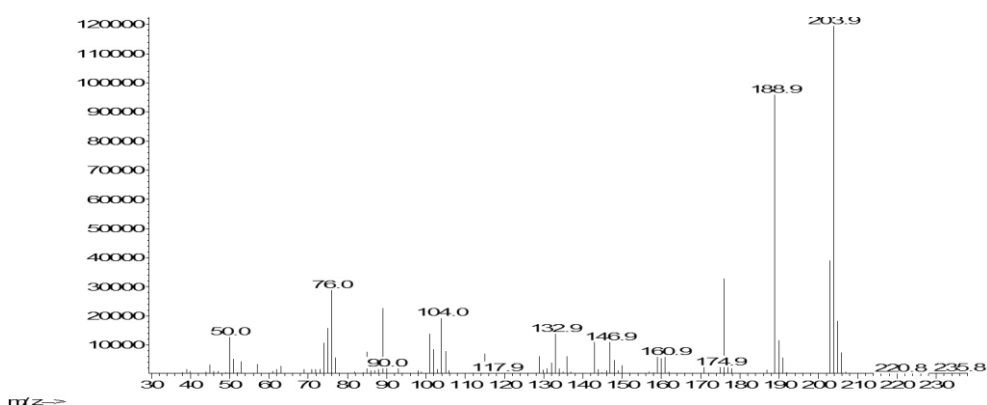
^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ghosh et al. (2014).

3.50. Μεταβολίτης 50

Ο μεταβολίτης **50** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.5 mg.



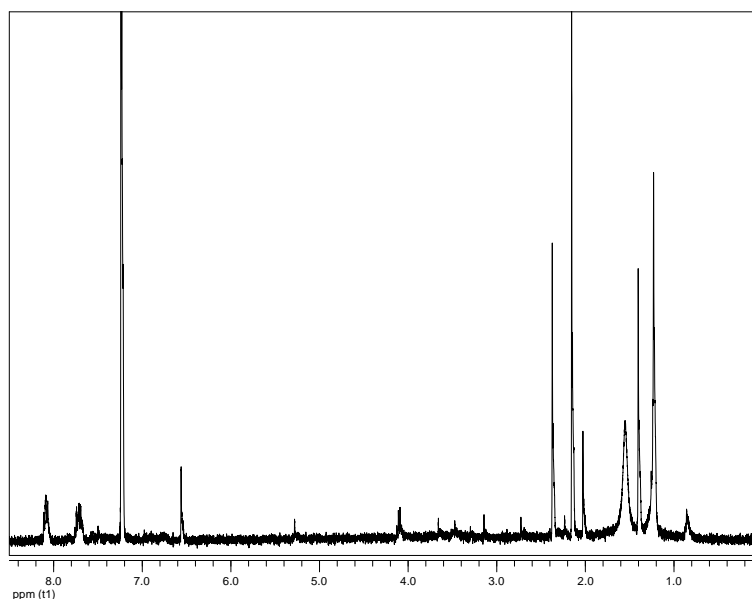
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **50** (Εικ. 213) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 204 και θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 189.



Εικόνα 213. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **50**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **50** (Εικ. 214) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 2.37, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλίου, πιθανώς ενωμένου με άτομο θείου.
- Μία απλή κορυφή σε δ 6.56, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε σε ένα απομονωμένο ολεφινικό μεθίλιο.
- Δύο πολλαπλές κορυφές σε δ 7.71 και 8.09, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός 1,2-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 214. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **50** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **50** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{SO}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **50** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 2-μεθυλοθειο-1,4-ναφθοκινόνη (2-methylthio-1,4-naphthoquinone) (Pratt et al., 2011), το οποίο έχει εμφανίσει *in vitro* ανασταλτική δράση στην ακυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης σε ανθρώπινα μακροφάγα κύτταρα (Lee et al., 2013). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **50** παρατίθενται στον Πίνακα 184.

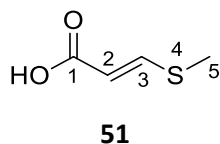
Πίνακας 184. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **50** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	6.56 (s)	6.56 (s)
7	8.09 (m)	8.10 (dd, 7.3, 1.5)
8	7.71 (m)	7.74 (dd, 7.3, 2.0)
9	7.71 (m)	7.69 (dd, 7.3, 1.5)
10	8.09 (m)	8.08 (dd, 7.3, 2.0)
12	2.37 (s)	2.37 (s)

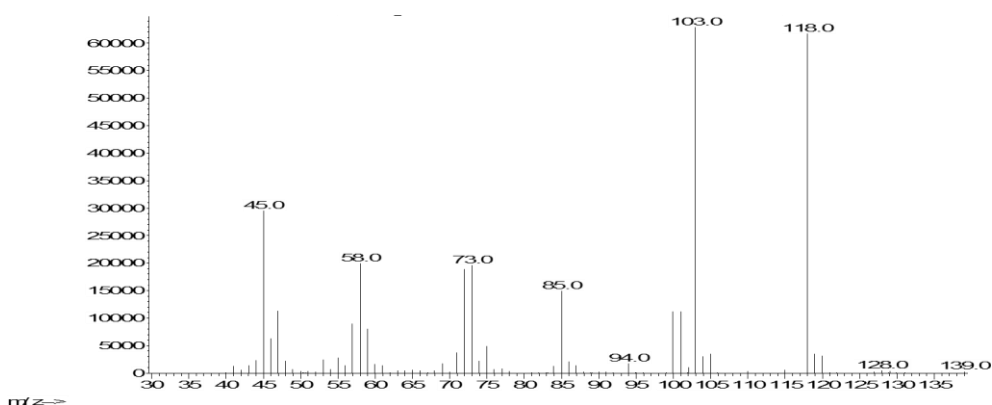
^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Pratt et al. (2011).

3.51. Μεταβολίτης 51

Ο μεταβολίτης **51** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.0 mg.



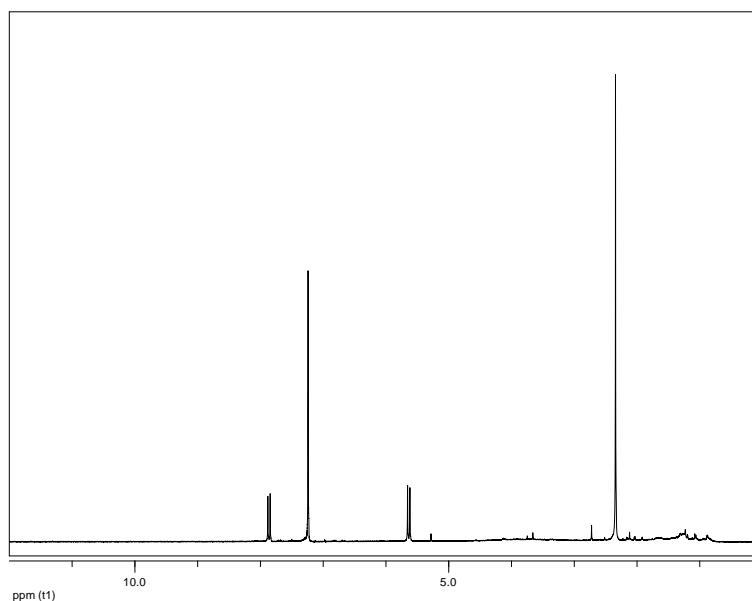
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **51** (Εικ. 215) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 118 και θραύσματα $[M-CH_3]^+$ και $[M-COOH]^+$ σε m/z 103 και 73, αντίστοιχα.



Εικόνα 215. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **51**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **51** (Εικ. 216) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 2.34, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλίου, πιθανά ενωμένου με ένα άτομο θείου.
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 5.64 και 7.86 με σύζευξη μεταξύ τους, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός 1,2-υποκατεστημένου διπλού δεσμού.



Εικόνα 216. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **51** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **51** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_4\text{H}_6\text{SO}_2$. Λαμβάνοντας υπόψη τον διπλό δεσμό ως τον ένα και μοναδικό βαθμό ακορεστότητας, το μόριο έπρεπε να είναι γραμμικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **51** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *trans*-3-μεθυλοθειο-ακρυλικό οξύ (*trans*-3-methylthioacrylic acid) (Ómarsdóttir et al., 2018), το οποίο απομονώθηκε πρώτη φορά από στέλεχος του *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* (Visser & Meyer, 1969). Η βιοσύνθεση του περιλαμβάνει την οξειδωτική αποικοδόμηση της μεθειονίνης και αποτελεί πρόδρομο μόριο πιο πολύπλοκων φυσικών προϊόντων. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **51** παρατίθενται στον Πίνακα 185.

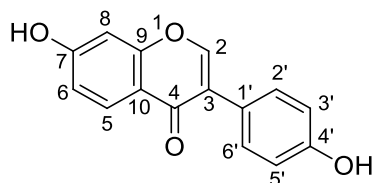
Πίνακας 185. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **51** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	5.64 (d, 14.9)	5.66 (d, 14.8)
3	7.86 (d, 14.9)	7.89 (d, 14.8)
5	2.34 (s)	2.36 (s)
OH		10.5 (br s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ómarsdóttir et al. (2018).

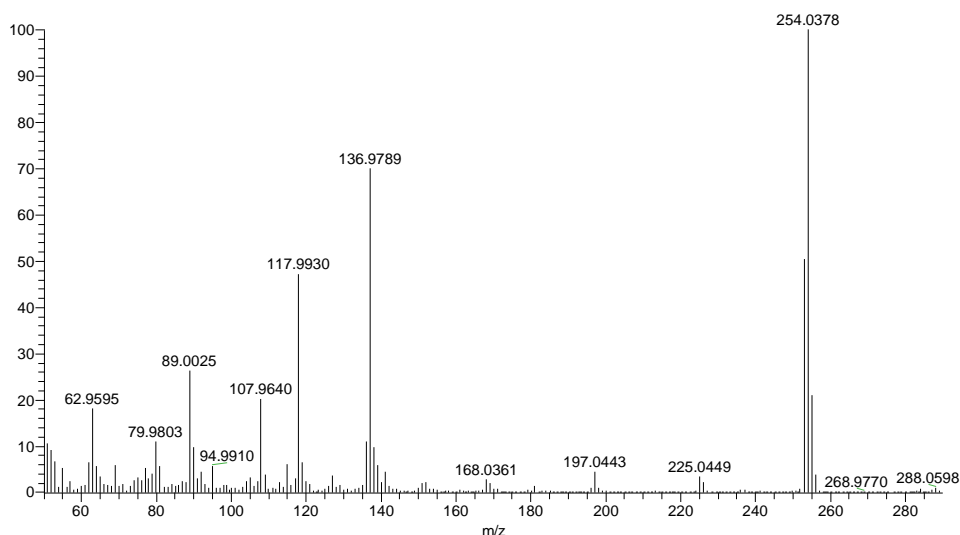
3.52. Μεταβολίτης 52

Ο μεταβολίτης **52** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως πορτοκαλί στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.4 mg.



52

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **52** (Εικ. 217) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 254.

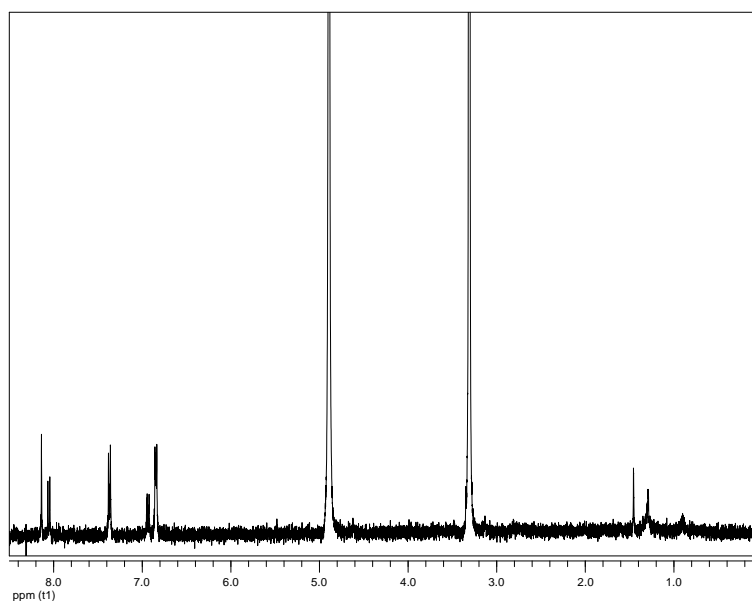


Εικόνα 217. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **52**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **52** (Εικ. 218) σε CD_3OD παρατηρήθηκαν:

- Δύο διπλές κορυφές σε δ 6.85 και 7.37, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.
- Μία απλή, μία διπλή διπλών και μία διπλή κορυφή σε δ 6.86, 6.94 και 8.06, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός 1,2,4-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.
- Μία ακόμη απλή κορυφή σε δ 8.14, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα πολύ αποθωρακισμένο μεθίλιο ενός εκτεταμένου συζυγιακού

συστήματος.



Εικόνα 218. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **52** σε CD_3OD .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **52** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **52** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φλαβονοειδές δαϊδζεΐνη (daidzein) (He et al., 2018; Wei et al., 2017b), το οποίο έχει οιστρογονική δράση και μελετάται ως υποκατάστατο σε μεταεμμηνόπαυσιακές γυναίκες (Jin et al., 2017). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **52** παρατίθενται στον Πίνακα 186.

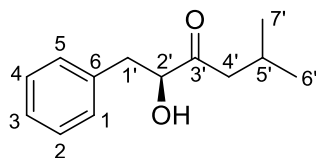
Πίνακας 186. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **52** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	8.14 (s)	8.12 (s)
5	8.06 (d, 8.9)	8.03 (d, 8.8)
6	6.94 (dd, 8.9, 2.4)	6.93 (dd, 8.8, 2.3)
8	6.86 (m)	6.83 (m)
2'	7.37 (d, 8.5)	7.36 (d, 8.5)
3'	6.85 (d, 8.5)	6.85 (d, 8.5)
5'	6.85 (d, 8.5)	6.85 (d, 8.5)
6'	7.37 (d, 8.5)	7.36 (d, 8.5)

^a Σε CD_3OD . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Wei et al. (2017b).

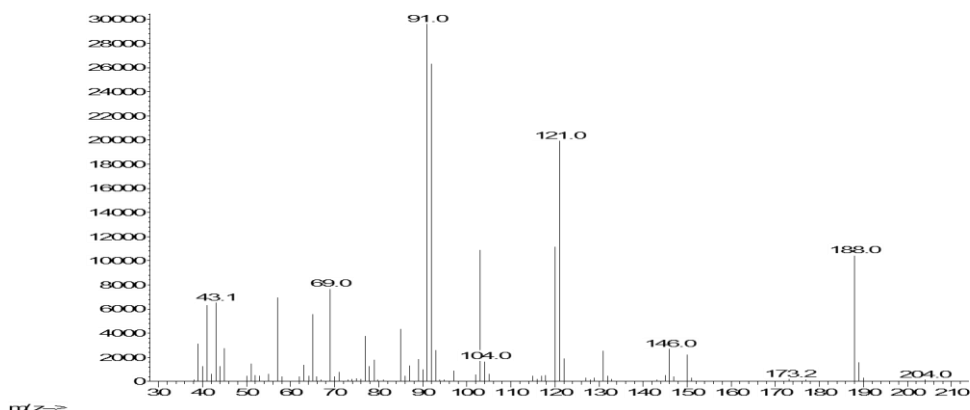
3.53. Μεταβολίτης 53

Ο μεταβολίτης **53** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.6 mg.



53

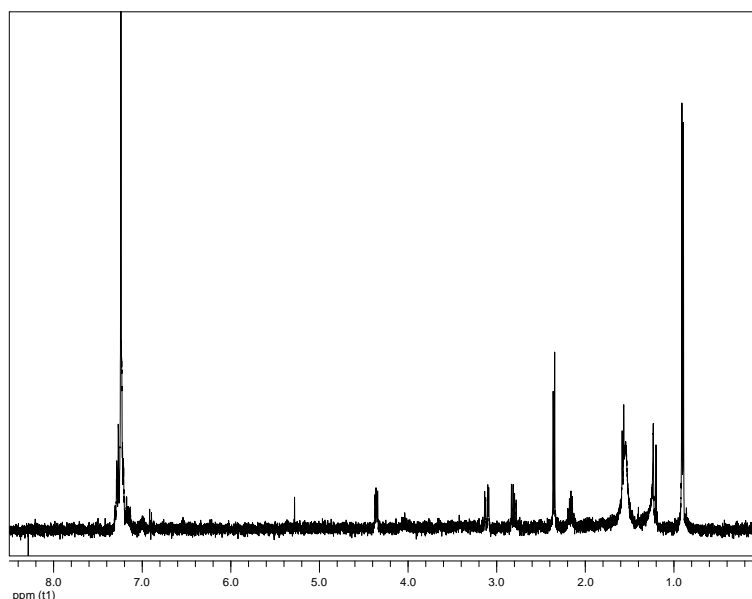
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **53** (Εικ. 219) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 204 και θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 188, ενδεικτικό της παρουσίας υδροξυλίου.



Εικόνα 219. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **53**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **53** (Εικ. 220) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Μία διπλή κορυφή σε δ 0.90, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Δύο διπλές διπλών κορυφές σε δ 2.81 και 3.11, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.36, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου.
- Μία πολλαπλή κορυφή στην αρωματική περιοχή (δ 7.20-7.31), η οποία ολοκλήρωνε για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 220. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **53** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **53** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων και της ειδικής στροφικής ικανότητας ($[\alpha]_{\text{D}} +37^\circ$, c 0.05, CHCl_3) του μεταβολίτη **53** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν (*S*)-σαταμπακίνη [(*S*)-sattabacin], το οποίο έχει απομονωθεί στο παρελθόν από βακτήρια, όπως και το εναντιομερές του. Η ολική σύνθεση του μεταβολίτη έκανε δυνατή την απόδοση της απόλυτης στερεοχημείας του (Aronoff et al., 2010). Η (*S*)-σαταμπακίνη έχει εμφανίσει αντιική δράση (Lampis et al., 1995; Mancha et al., 2013), ενώ κανένα από τα δύο εναντιομερή δεν εμφάνισε αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση στα στελέχη που μελετήθηκαν, ούτε κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές σειρές που ελέγχθηκαν (Park et al., 2014). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **53** παρατίθενται στον Πίνακα 187.

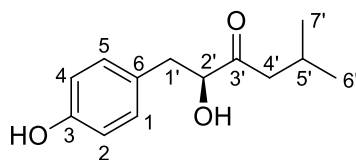
Πίνακας 187. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **53** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.20-7.31 (m)	7.20-7.32 (m)
3	7.20-7.31 (m)	7.20-7.32 (m)
4	7.20-7.31 (m)	7.20-7.32 (m)
5	7.20-7.31 (m)	7.20-7.32 (m)
6	7.20-7.31 (m)	7.20-7.32 (m)
1'	3.11 (dd, 13.9, 4.4), 2.81 (dd, 13.9, 7.5)	3.12 (dd, 14.2, 4.4), 2.81 (dd, 14.2, 7.7)
2'	4.36 (dd, 7.5, 4.4)	4.36 (dd, 7.4, 4.4)
4'	2.35 (d, 7.0)	2.36 (d, 6.8)
5'	2.16 (m)	2.17 (eptet)
6'	0.90 (d, 6.6)	0.91 (d, 6.7)
7'	0.90 (d, 6.6)	0.91 (d, 6.7)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Lampis et al. (1995).

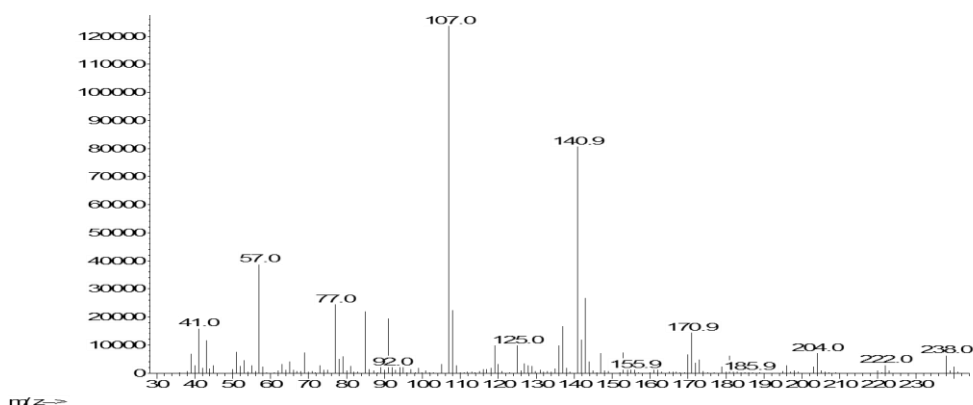
3.54. Μεταβολίτης 54

Ο μεταβολίτης **54** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.6 mg.



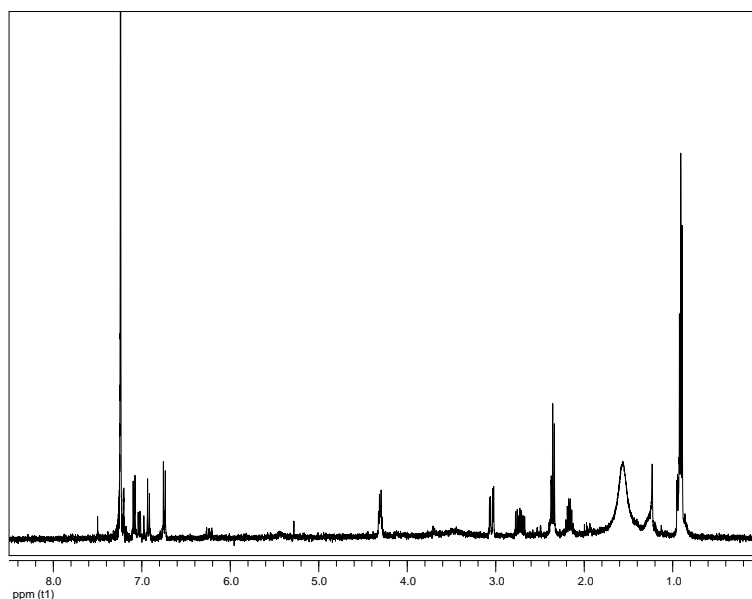
54

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **54** (Εικ. 221) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 222 και θραύσματα $[M-H_2O]^+$ και $[C_7H_7O]^+$ σε m/z 204 και 107, αντίστοιχα.



Εικόνα 221. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **54**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **54** (Εικ. 222) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **53**. Η κυριότερη διαφορά εντοπίστηκε στην αρωματική περιοχή, όπου εμφανίστηκαν δύο διπλές κορυφές σε δ 6.74 και 7.09, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία, υποδεικνύοντας ότι ο μεταβολίτης **54** διαθέτει ένα *para*-υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.



Εικόνα 222. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **54** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **54** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων και της ειδικής στροφικής ικανότητας ($[\alpha]_D +14^\circ$, c 0.07, CHCl_3) του μεταβολίτη **54** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν (*S*)-4-υδροξυ-σαταμπακίνη [(*S*)-4-hydroxysattabacin], το οποίο έχει επίσης απομονωθεί στο παρελθόν από βακτήρια, όπως και η εναντιομερής μορφή του, ενώ η απόλυτη στερεοχημεία του αποδόθηκε μέσω της ολικής του σύνθεσης (Huang et al., 2010). Η (*S*)-4-υδροξυ-σαταμπακίνη έχει εμφανίσει αντιική δράση κατά του ιού HSV (Lampis et al., 1995), αλλά δεν έδειξε νευροτροπική ή αξιωσημείωτη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση στα στελέχη που μελετήθηκαν (Lin et al., 2013), ενώ το (*R*) εναντιομερές είναι δραστικό σε καρκινικές σειρές μελανώματος και ήπια αντιοξειδωτικό (Kim et al., 2017b; Li et al., 2008). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **54** παρατίθενται στον Πίνακα 188.

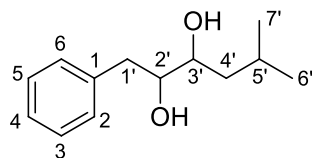
Πίνακας 188. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **54** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.09 (d, 8.3)	7.07 (d, 8.3)
3	6.74 (d, 8.3)	6.73 (d, 8.3)
5	6.74 (d, 8.3)	6.73 (d, 8.3)
6	7.09 (d, 8.3)	7.07 (d, 8.3)
1'	3.05 (dd, 14.3, 4.4), 2.75 (dd, 14.3, 7.6)	3.06 (dd, 14.3, 4.4), 2.75 (dd, 14.3, 7.4)
2'	4.30 (ddd, 7.6, 4.4, 4.4)	4.34 (dd, 7.4, 4.4)
4'	2.35 (d, 7.5)	2.37 (d, 6.6)
5'	2.17 (m)	2.18 (eptet)
6'	0.90 (d, 6.4)	0.92 (d, 6.6)
7'	0.90 (d, 6.4)	0.92 (d, 6.6)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Huang et al. (2010).

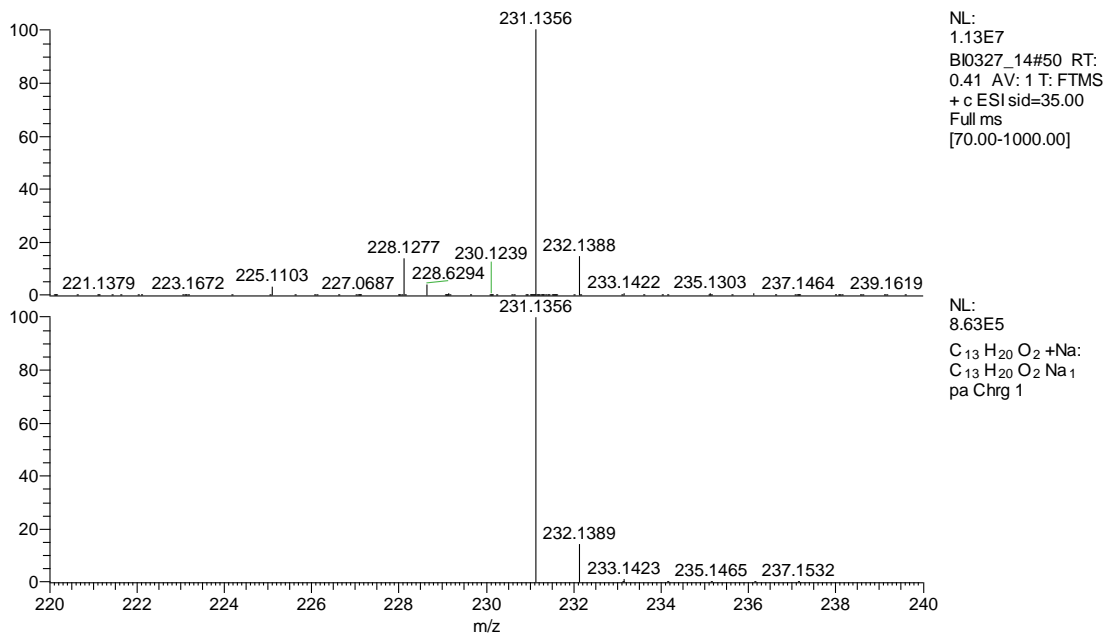
3.55. Μεταβολίτης 55

Ο μεταβολίτης **55** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως καφέ στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.2 mg.



55

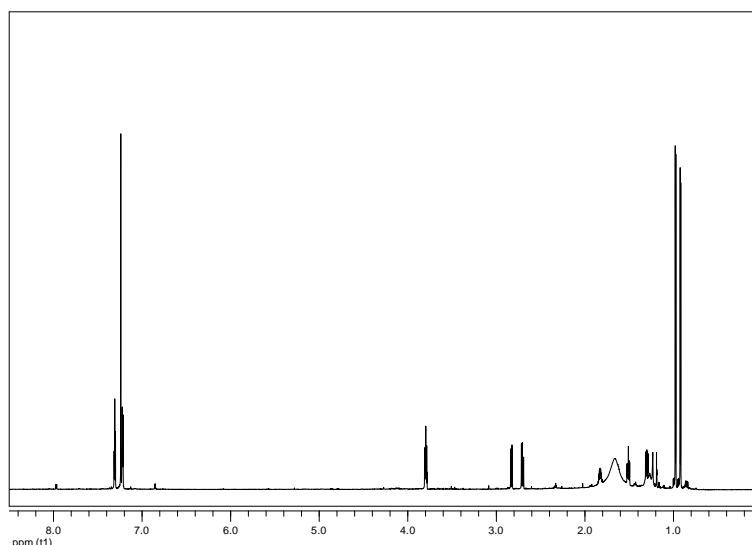
Το φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **55** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 208 και θραύσματα $[M-H_2O]^+$ και $[C_6H_5CH_3]^+$ σε m/z 190 και 92, αντίστοιχα, ενώ το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (Εικ. 223) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 231.1356. Σε σύγκριση με τον μεταβολίτη **53**, το μοριακό βάρος του **55** ήταν μεγαλύτερο κατά δύο ατομικές μονάδες, υποδηλώνοντας τη πιθανή αναγωγή της καρβονυλομάδας του μεταβολίτη **53**.



Εικόνα 223. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **55**.

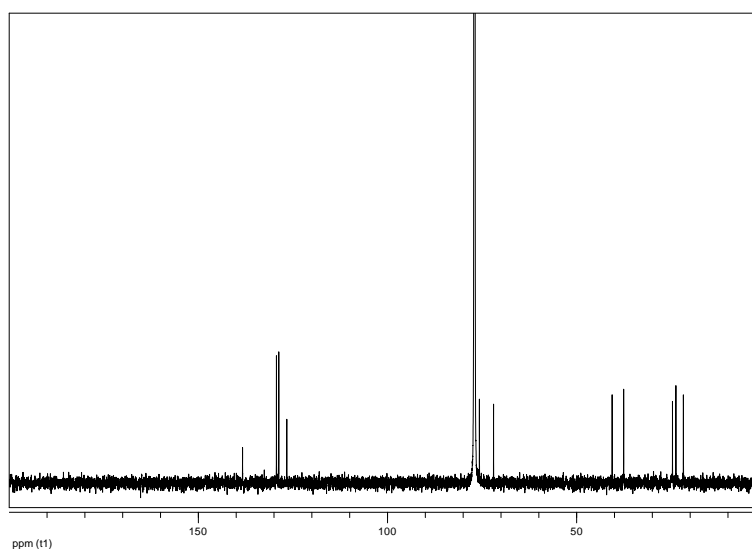
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **55** (Εικ. 224) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **53**, με βασική διαφορά την παρουσία ενός επιπλέον σήματος ενός

αποθωρακισμένου μεθινίου.

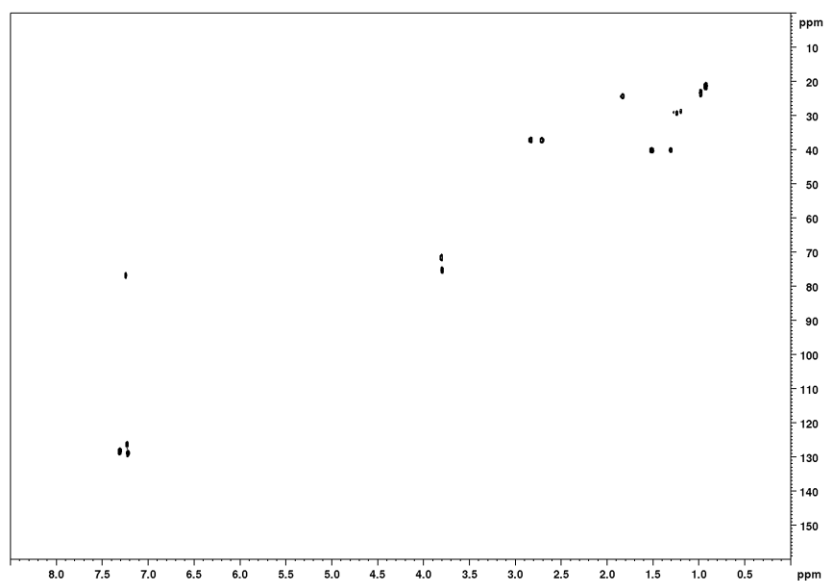


Εικόνα 224. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **55** σε CDCl_3 .

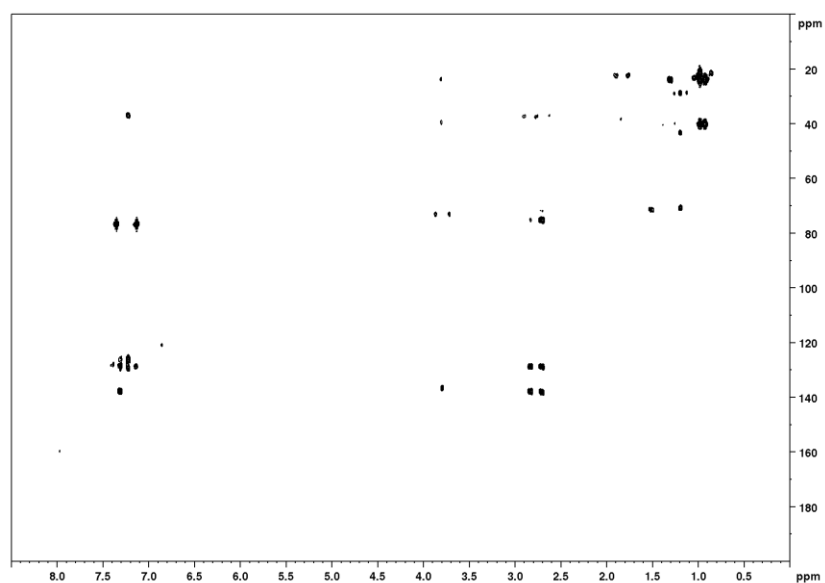
Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **55** (Εικ. 225) σε CDCl_3 εμφανίσθηκαν 11 κορυφές, οι οποίες με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 226) και HMBC (Εικ. 227) αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτοταγή, δύο δευτεροταγή, οκτώ τριτοταγή και ένα τεταρτοταγές άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν έξι sp^2 άνθρακες ενός αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 225. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **55** σε CDCl_3 .



Εικόνα 226. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη **55** σε CDCl_3 .

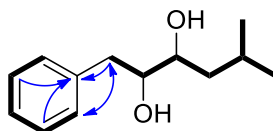


Εικόνα 227. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **55** σε CDCl_3 .

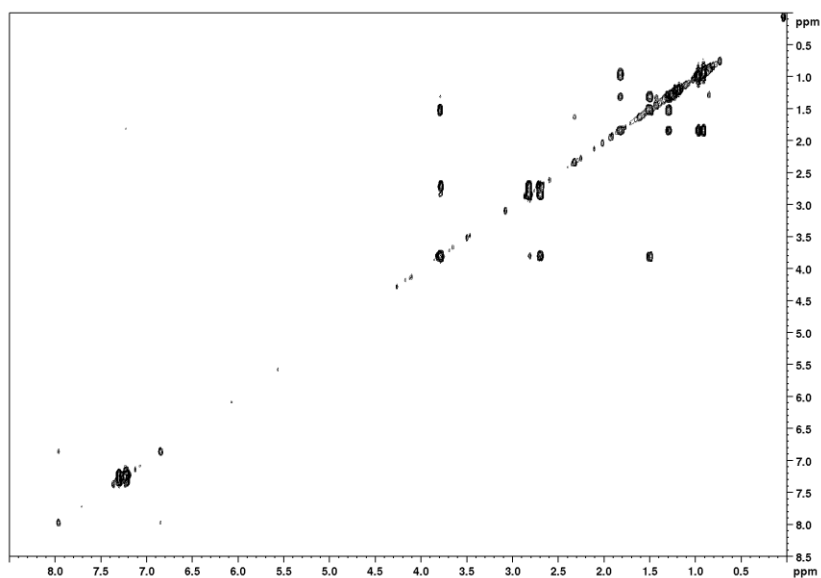
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **55** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2$. Ο αρωματικός δακτύλιος αντιστοιχούσε στους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας του μορίου, το οποίο επομένως έπρεπε να είναι μονοκυκλικό.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **55** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 228) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC, HMBC και COSY (Εικ. 229). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: i) μία αλειφατική αλυσίδα ($\text{H}_2\text{-1}' / \text{H-2}' / \text{H-3}' / \text{H}_2\text{-4}' / \text{H-5}' /$

(H₃-7') H₃-6') και ii) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-2 έως H-6). Οι ετεροπυρηνικές συζεύξεις του C-1 με το H-1', καθώς και του C-1' με τα H-2 και H-5 που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC συνέδεσαν τα δύο spin συστήματα. Επίσης, η συσχέτιση HMBC του C-1 με τα H-3 και H-5 καθόρισε την αλληλουχία των ατόμων στον αρωματικό δακτύλιο του μεταβολίτη **55**.



Εικόνα 228. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **55**.



Εικόνα 229. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **55** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **55** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το οποίο αποτελεί ανηγμένο παράγωγο του μεταβολίτη **53**. Η σχετική στερεοχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-2' και C-3' βρίσκεται υπό διερεύνηση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **55** παρατίθενται στον Πίνακα 189.

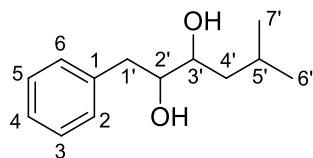
Πίνακας 189. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **55** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	138.3	-
2	129.4	7.22 (d, 7.5)
3	128.7	7.31 (t, 7.5)
4	126.6	7.23 (t, 7.5)
5	128.7	7.31 (t, 7.5)
6	129.4	7.22 (d, 7.5)
1'	37.6	2.83 (dd, 13.9, 3.2), 2.70 (dd, 13.9, 9.7)
2'	75.7	3.80 (m)
3'	72.0	3.80 (m)
4'	40.6	1.50 (ddd, 14.2, 9.8, 4.8), 1.30 (ddd, 14.2, 9.4, 2.9)
5'	24.7	1.83 (m)
6'	21.8	0.92 (d, 6.5)
7'	23.8	0.98 (d, 6.5)

^a Σε CDCl₃.

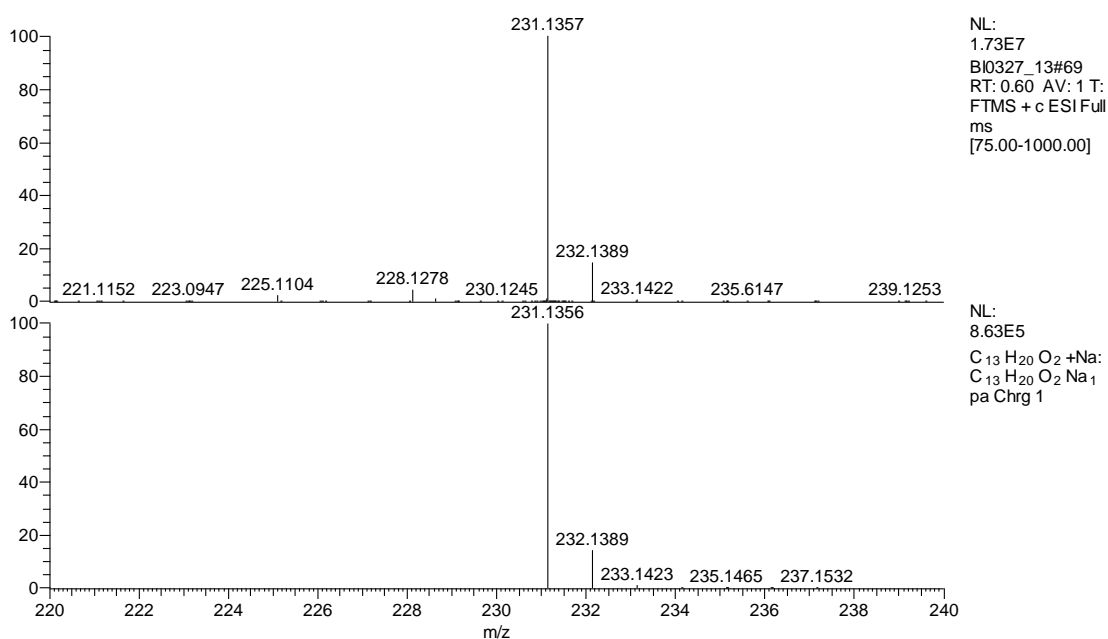
3.56. Μεταβολίτης 56

Ο μεταβολίτης **56** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως καφέ ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.0 mg.



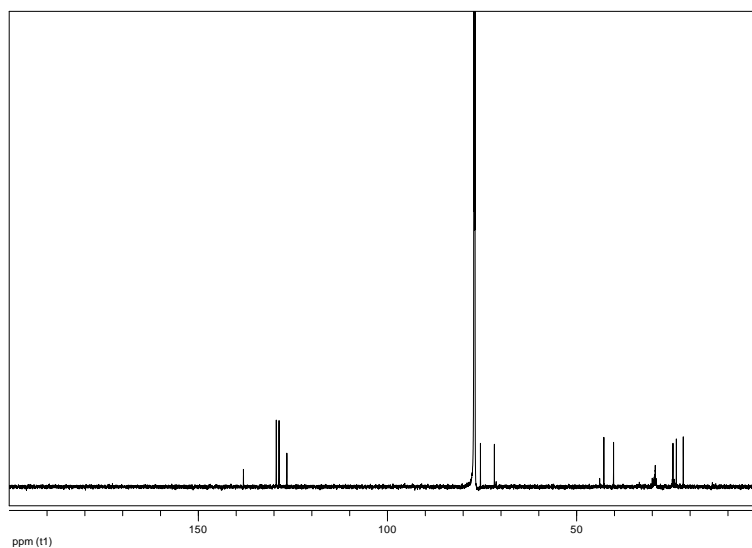
56

Το φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **56** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 208, όπως και ο μεταβολίτης **55**, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ισομερή μόρια. Επιπλέον, το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (Εικ. 230) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 231.1357.

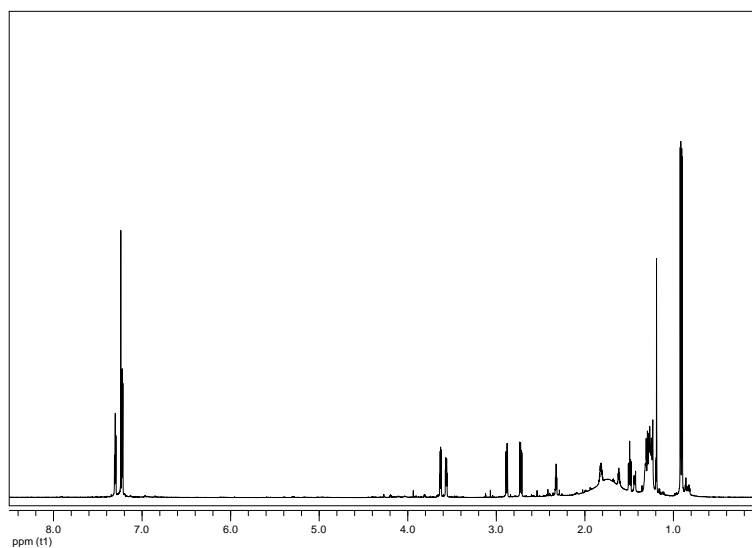


Εικόνα 230. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **56**.

Στα φάσματα ^{13}C NMR (Εικ. 231) και ^1H NMR (Εικ. 232) του μεταβολίτη **56** εμφανίσθηκαν παρόμοια σήματα με τον μεταβολίτη **55** σε ελαφρώς διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις, με κυριότερη διαφορά ότι τα δύο οξυγονωμένα μεθίλια συντονίζονταν σε δ 3.57 και 3.63 στον **56**, ενώ στον **55** συντονίζονταν και τα δύο σε δ 3.80.

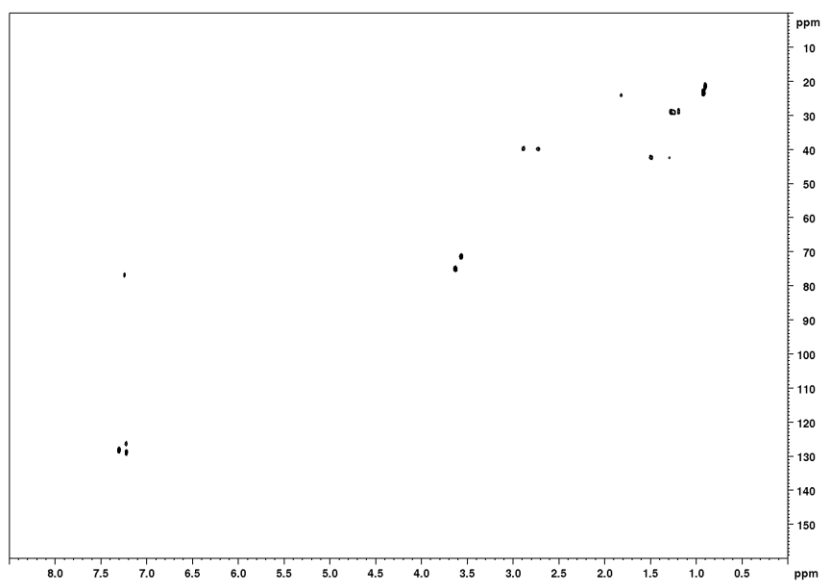


Εικόνα 231. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **56** σε CDCl_3 .

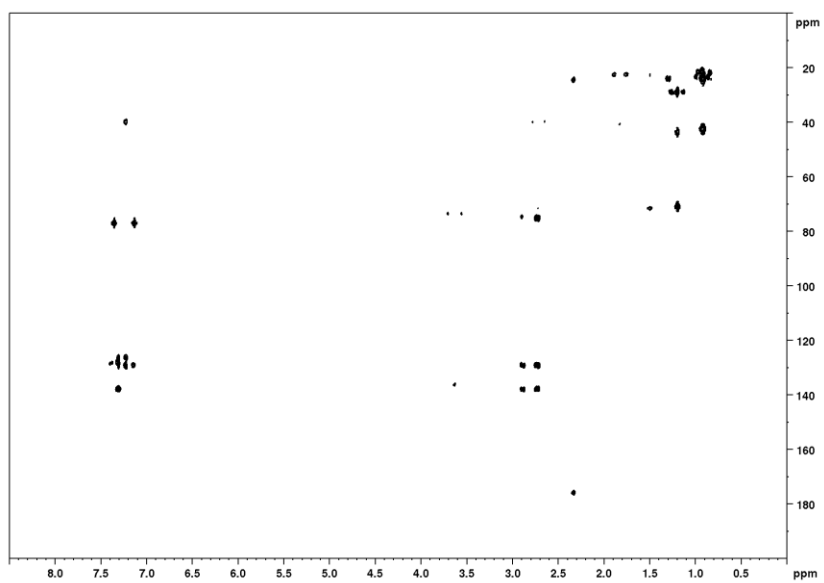


Εικόνα 232. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **56** σε CDCl_3 .

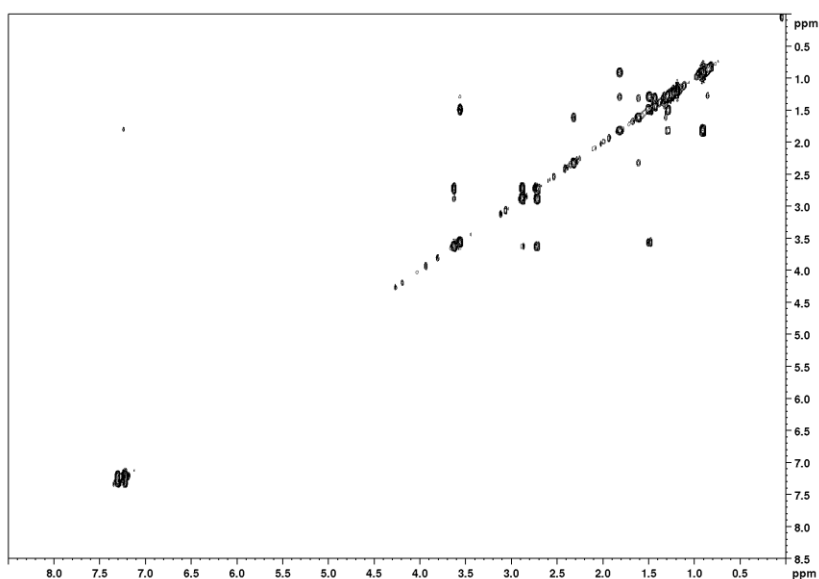
Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **56**, η οποία αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 233), HMBC (Εικ. 234) και COSY (Εικ. 235), ήταν η ίδια με αυτή του μεταβολίτη **55**.



Εικόνα 233. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 56 σε $CDCl_3$.



Εικόνα 234. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 56 σε $CDCl_3$.



Εικόνα 235. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 56 σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 56 με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το οποίο αποτελεί στερεοϊσομερές του μεταβολίτη 55. Η σχετική στερεοχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-2' και C-3' βρίσκεται υπό διερεύνηση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 56 παρατίθενται στον Πίνακα 190.

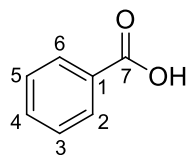
Πίνακας 190. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 56 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
1	138.1	-
2	129.4	7.22 (d, 7.6)
3	128.7	7.30 (t, 7.6)
4	126.6	7.22 (t, 7.6)
5	128.7	7.30 (t, 7.6)
6	129.4	7.22 (d, 7.6)
1'	40.2	2.88 (dd, 13.8, 4.2), 2.72 (dd, 13.8, 9.0)
2'	75.4	3.63 (ddd, 9.0, 4.2, 4.1)
3'	71.7	3.57 (ddd, 9.4, 4.1, 4.1)
4'	42.8	1.49 (ddd, 14.0, 9.7, 4.1), 1.29 (ddd, 14.0, 9.4, 3.6)
5'	24.5	1.82 (m)
6'	21.8	0.90 (d, 6.4)
7'	23.6	0.92 (d, 7.0)

^a Σε CDCl_3 .

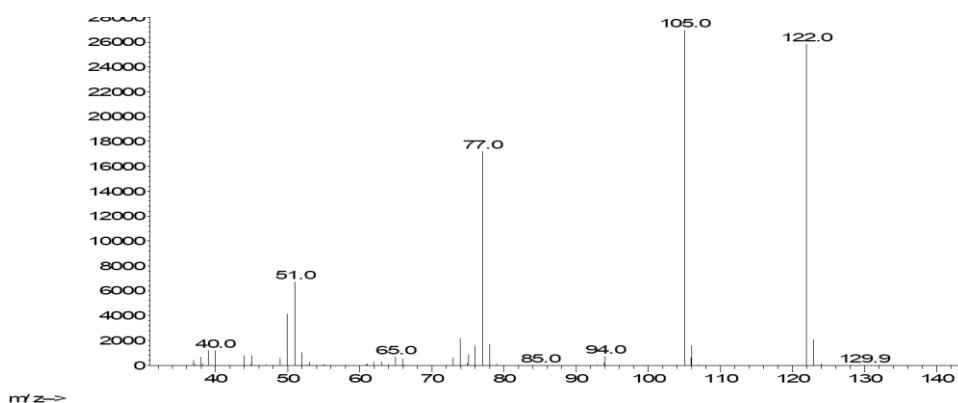
3.57. Μεταβολίτης 57

Ο μεταβολίτης **57** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.1 mg.



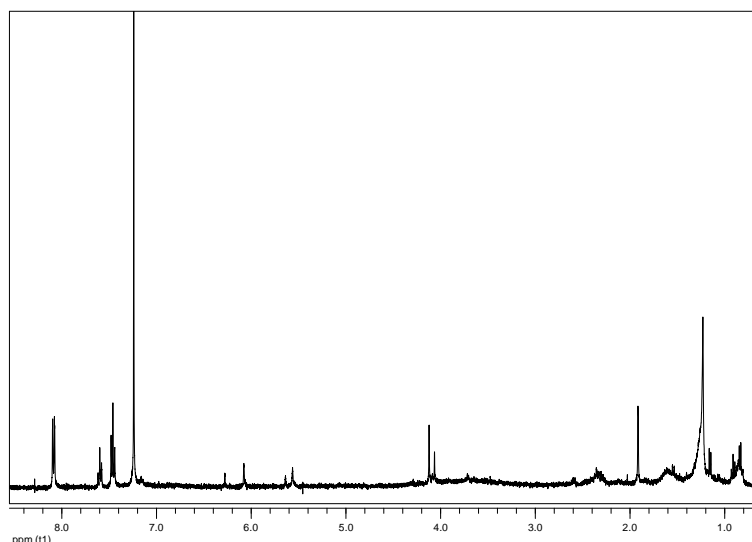
57

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **57** (Εικ. 236) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 122 και θραύσμα $[M-OH]^+$ σε m/z 105. Το θραύσμα $[C_6H_5]^+$ σε m/z 77 είναι χαρακτηριστικό της παρουσίας βενζυλίου στο μόριο.



Εικόνα 236. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **57**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **57** (Εικ. 237) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα μόνο στην αρωματική περιοχή, συγκεκριμένα δύο τριπλές και μία διπλή διπλών κορυφές σε δ 7.46, 7.60 και 8.08, οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 237. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **57** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **57** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **57** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν βενζοϊκό οξύ (benzoic acid) (Maity et al., 2018). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **57** παρατίθενται στον Πίνακα 191.

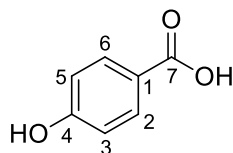
Πίνακας 191. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **57** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	8.08 (dd, 7.6, 1.4)	8.12 (d, 7.0)
3	7.46 (br t, 7.6)	7.48 (t, 7.5)
4	7.60 (br t, 7.6)	7.60-7.65 (m)
5	7.46 (br t, 7.6)	7.48 (t, 7.5)
6	8.08 (dd, 7.6, 1.4)	8.08 (dd, 8.0, 1.4)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Maity et al. (2018).

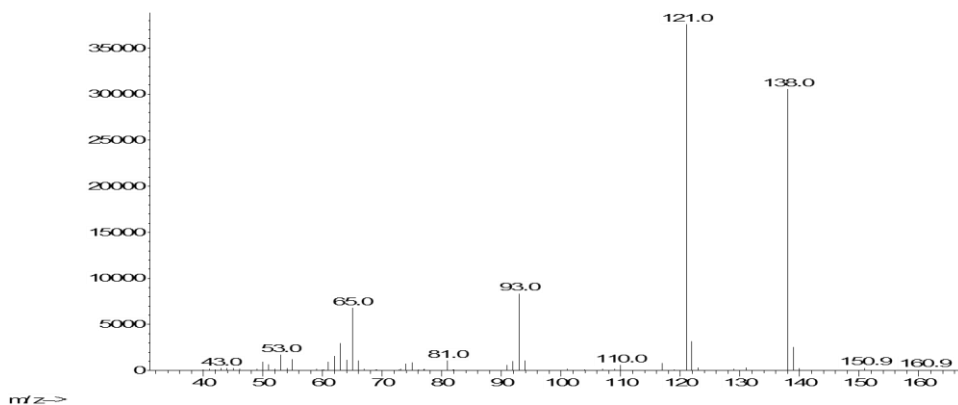
3.58. Μεταβολίτης 58

Ο μεταβολίτης **58** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.5 mg.



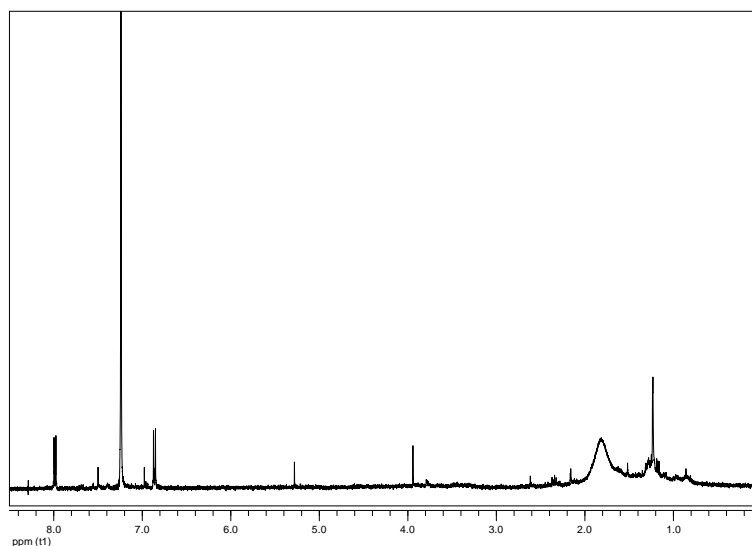
58

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **58** (Εικ. 238) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 138 και θραύσμα $[M-OH]^+$ σε m/z 121.



Εικόνα 238. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **58**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **58** (Εικ. 239) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν δύο διπλές κορυφές σε δ 6.86 και 7.99, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 239. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **58** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **58** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **58** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ (4-hydroxy-benzoic acid) (Chen et al., 2018). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **58** παρατίθενται στον Πίνακα 192.

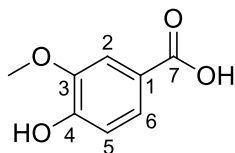
Πίνακας 192. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **58** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.99 (d, 8.8)	7.96 (d, 8.6)
3	6.86 (d, 8.8)	6.85 (d, 8.6)
5	6.86 (d, 8.8)	6.85 (d, 8.6)
6	7.99 (d, 8.8)	7.96 (d, 8.6)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Chen et al. (2018).

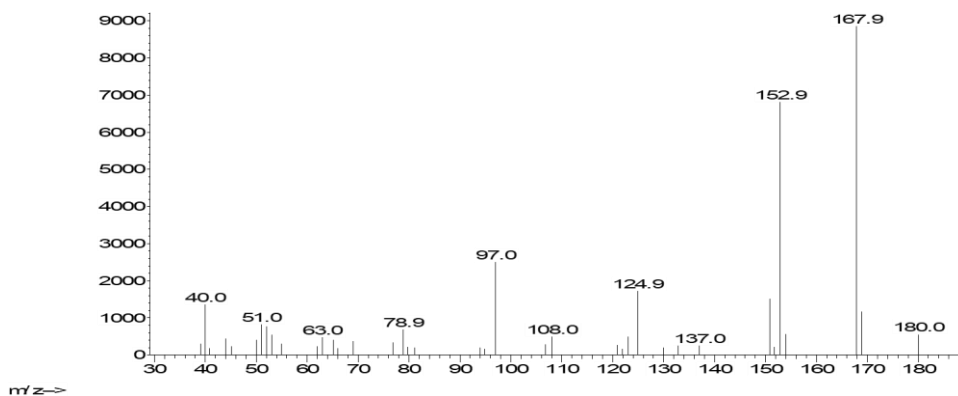
3.59. Μεταβολίτης 59

Ο μεταβολίτης **59** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.5 mg.



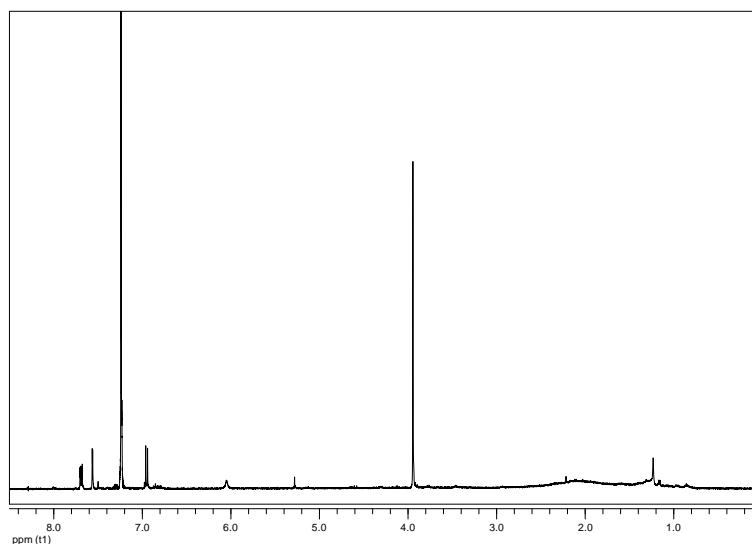
59

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **59** (Εικ. 240) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 168 και θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 153.



Εικόνα 240. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **59**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **59** (Εικ. 241) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκε μια απλή κορυφή σε δ 3.95, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια μίας μεθοξυ-ομάδας. Επίσης, παρατηρήθηκαν δύο διπλές και μία διπλή διπλών κορυφές σε δ 6.95, 7.56 και 7.69, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός 1,3,4-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 241. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **59** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **59** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **59** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν βανιλικό οξύ (vanillic acid), το οποίο είναι το 3-μεθοξυ-ανάλογο του μεταβολίτη **58** (Kang et al., 2014). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **59** παρατίθενται στον Πίνακα 193.

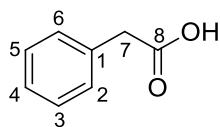
Πίνακας 193. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **59** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.56 (d, 1.9)	7.60 (d, 1.5)
5	6.95 (d, 8.3)	6.98 (d, 8.5)
6	7.69 (dd, 8.3, 1.9)	7.73 (dd, 8.5, 1.5)
OMe	3.95 (s)	3.97 (s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Kang et al. (2014).

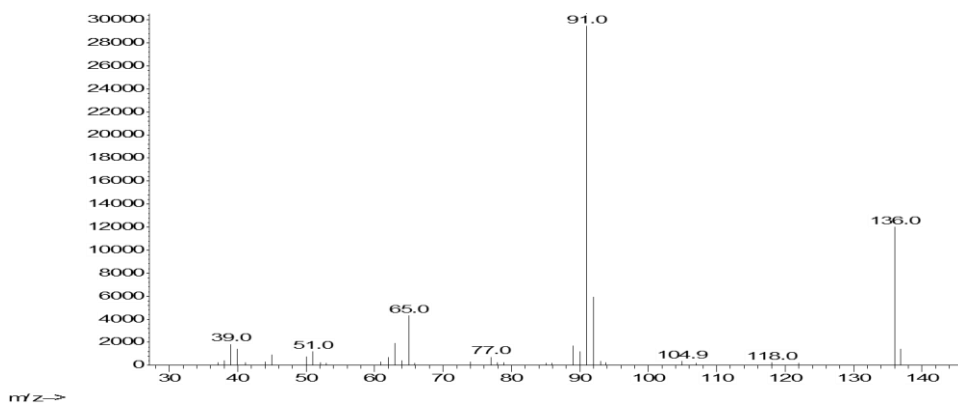
3.60. Μεταβολίτης 60

Ο μεταβολίτης **60** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 13.4 mg.



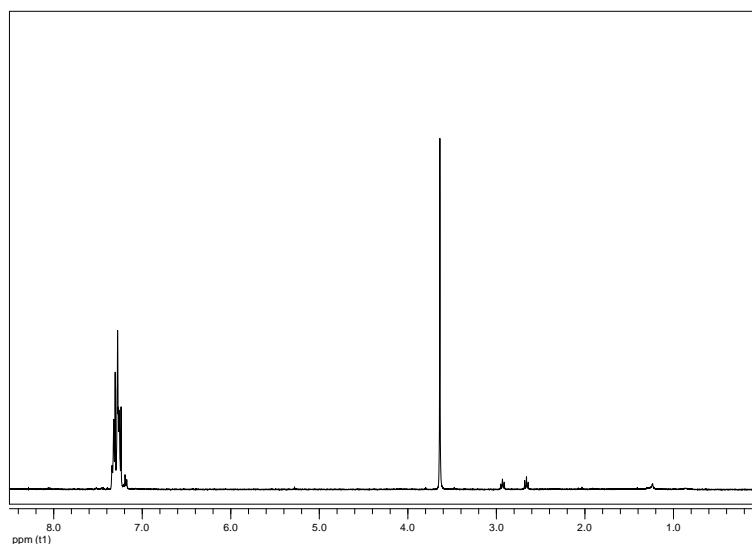
60

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **60** (Εικ. 242) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 136 και θραύσμα $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 91, χαρακτηριστικό της παρουσίας φαινυλίου στο μόριο.



Εικόνα 242. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **60**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **60** (Εικ. 243) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου (7.25 έως 7.35 ppm) και μία απλή κορυφή σε δ 3.64, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου απομονωμένου μεθυλενίου.



Εικόνα 243. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **60** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **60** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **60** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν φαινυλοξικό οξύ (phenylacetic acid) (Evidente et al., 2005). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **60** παρατίθενται στον Πίνακα 194.

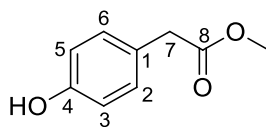
Πίνακας 194. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **60** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.25-7.35 (m)	7.26-7.36 (m)
3	7.25-7.35 (m)	7.26-7.36 (m)
4	7.25-7.35 (m)	7.26-7.36 (m)
5	7.25-7.35 (m)	7.26-7.36 (m)
6	7.25-7.35 (m)	7.26-7.36 (m)
7	3.64 (s)	3.66 (s)
8	-	12.3 (br s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Evidente et al. (2005).

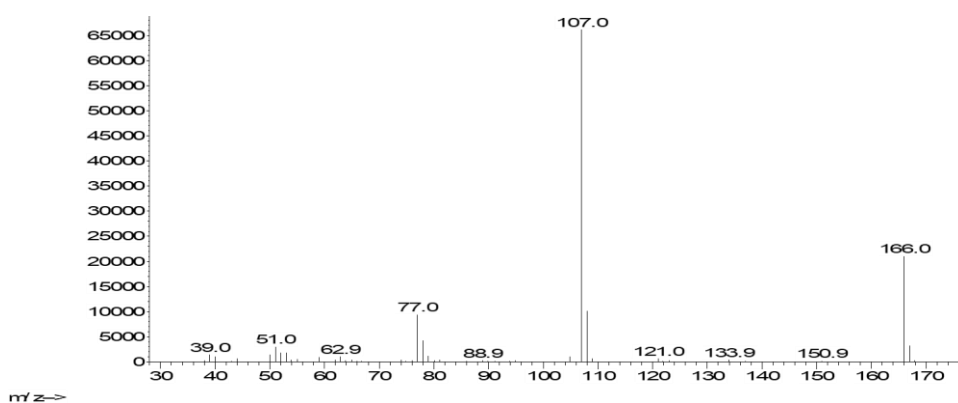
3.61. Μεταβολίτης 61

Ο μεταβολίτης **61** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.7 mg.



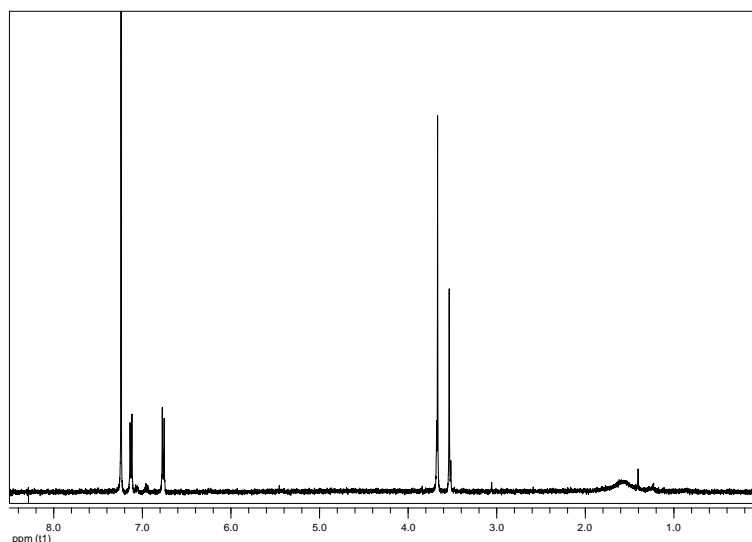
61

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **61** (Εικ. 244) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 166 και θραύσμα $[C_7H_7O]^+$ σε m/z 107, χαρακτηριστικό της παρουσίας υδροξυφαινυλίου στο μόριο.



Εικόνα 244. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **61**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **61** (Εικ. 245) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα ενός *para*-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου (δ 6.76 και 7.13), ενός αποθωρακισμένου απομονωμένου μεθυλενίου (δ 3.54) και μίας μεθοξυ-ομάδας (δ 3.67).



Εικόνα 245. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **61** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **61** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **61** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν μεθυλεστέρας του 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (4-hydroxy-phenylacetic acid methyl ester) (Pieters et al., 1989). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **61** παρατίθενται στον Πίνακα 195.

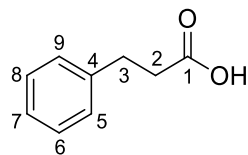
Πίνακας 195. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **61** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	7.13 (d, 8.5)	7.10 (d, 8.3)
3	6.76 (d, 8.5)	6.76 (d, 8.3)
5	6.76 (d, 8.5)	6.76 (d, 8.3)
6	7.13 (d, 8.5)	7.10 (d, 8.3)
7	3.54 (s)	3.54 (s)
OMe	3.67 (s)	3.68 (s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Pieters et al. (1989).

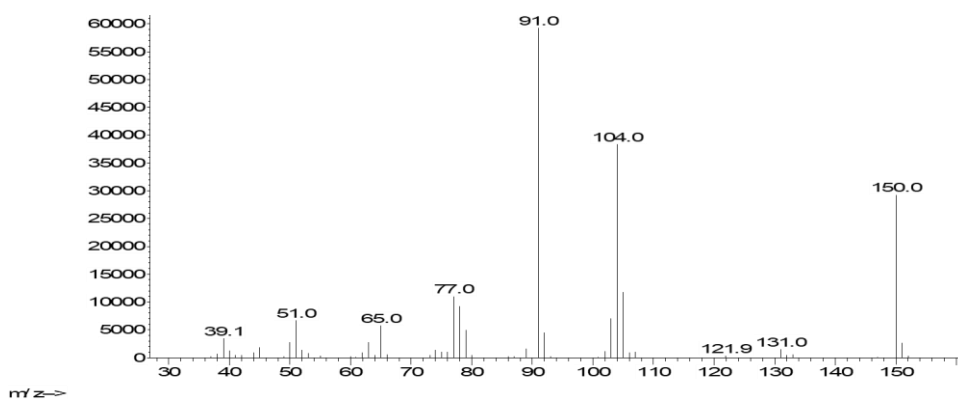
3.62. Μεταβολίτης 62

Ο μεταβολίτης **62** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.8 mg.



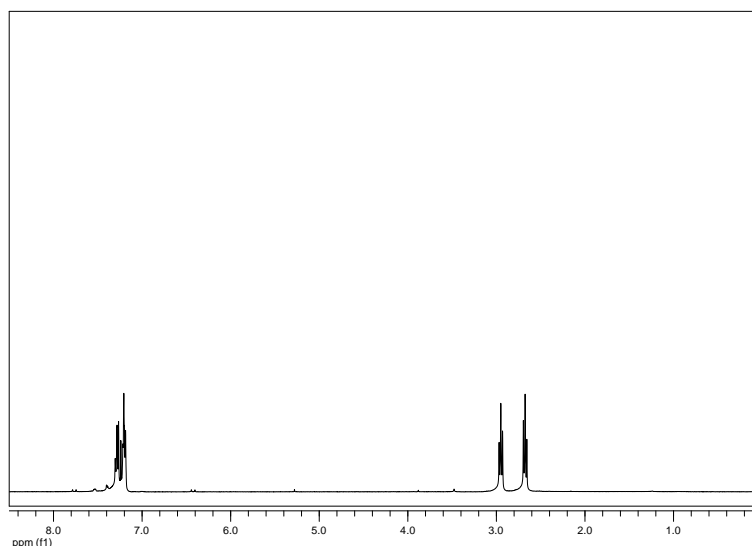
62

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **62** (Εικ. 246) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 150 και θραύσμα $[C_6H_5CH_2]^+$ σε m/z 91.



Εικόνα 246. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **62**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **62** (Εικ. 247) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν σήματα ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου (7.15 έως 7.31 ppm) και επιπλέον, δύο τριπλές κορυφές σε δ 2.68 και 2.96, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός απομονωμένου συστήματος δύο μεθυλενίων.



Εικόνα 247. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **62** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **62** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **62** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν υδροκινναμικό οξύ (hydrocinnamic acid) (Devi et al., 2010). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **62** παρατίθενται στον Πίνακα 196.

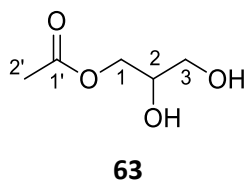
Πίνακας 196. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **62** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
2	2.96 (t, 7.8)	2.96 (t, 7.5, 7.8)
3	2.68 (t, 7.8)	2.68 (t 7.5, 7.8)
5	7.15-7.31 (m)	7.19-7.38 (m)
6	7.15-7.31 (m)	7.19-7.38 (m)
7	7.15-7.31 (m)	7.19-7.38 (m)
8	7.15-7.31 (m)	7.19-7.38 (m)
9	7.15-7.31 (m)	7.19-7.38 (m)

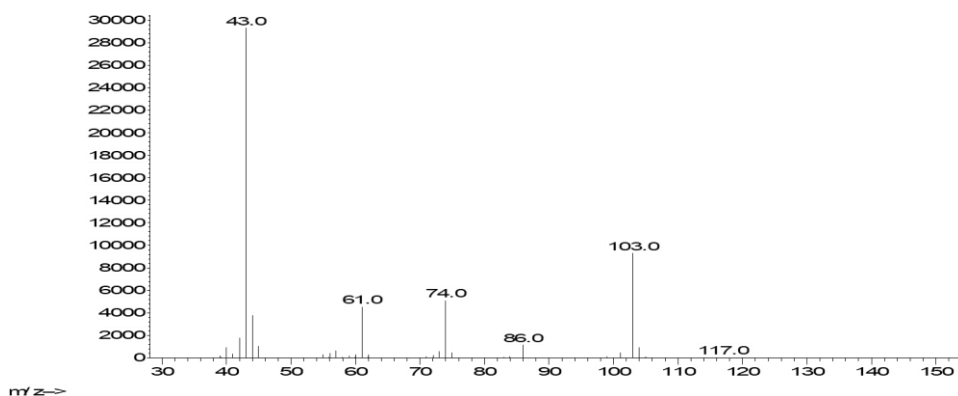
^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Devi et al. (2010).

3.63. Μεταβολίτης 63

Ο μεταβολίτης **63** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.3 mg.



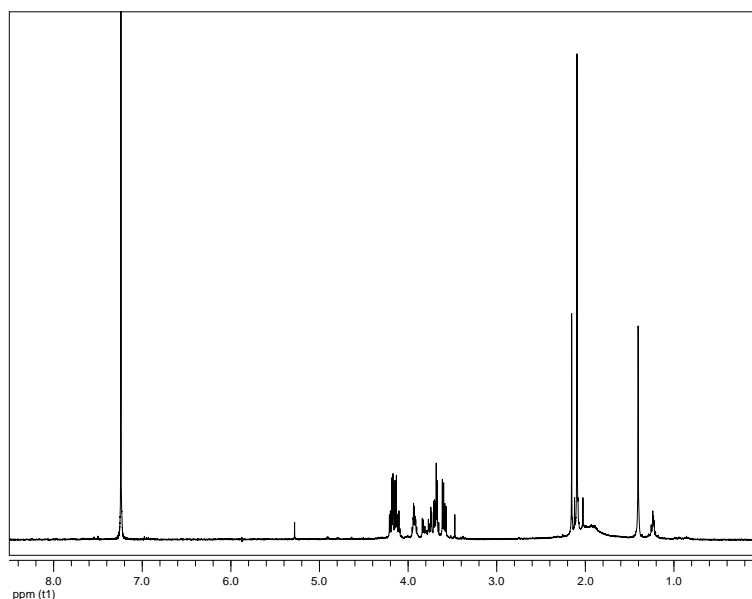
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **63** (Εικ. 248) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσματα $[M-CH_2OH]^+$ και $[CH_3CO]^+$ σε m/z 103 και 43, αντίστοιχα.



Εικόνα 248. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **63**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **63** (Εικ. 249) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Μία απλή κορυφή σε δ 2.09, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου μίας ακετοξυ-ομάδας.
- Τέσσερις κορυφές σε δ 3.59, 3.69, 4.13 και 4.19, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο αποθωρακισμένων μεθυλενίων.
- Μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.93, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο ενός οξυγονωμένου μεθινίου.



Εικόνα 249. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **63** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **63** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **63** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 1-ακετυλογλυκερόλη (1-acetylglycerol), το οποίο έχει απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές, όπως στελέχη του γένους *Streptomyces* (Wei et al., 2017a; Bafor et al., 2013). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **63** παρατίθενται στον Πίνακα 197.

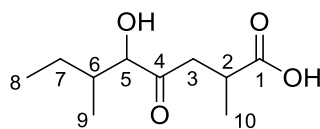
Πίνακας 197. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **63** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1	3.69 (dd, 11.5, 3.9), 3.59 (dd, 11.5, 5.8)	3.69 (dd, 12.0, 4.0), 3.59 (dd, 12.0, 4.0)
2	3.93 (m)	3.93 (m)
3	4.19 (dd, 11.7, 4.5), 4.13 (dd, 11.7, 6.2)	4.17 (dd, 12.0, 4.0), 4.12 (dd, 12.0, 4.0)
2'	2.09 (s)	2.09 (s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Wei et al. (2017a).

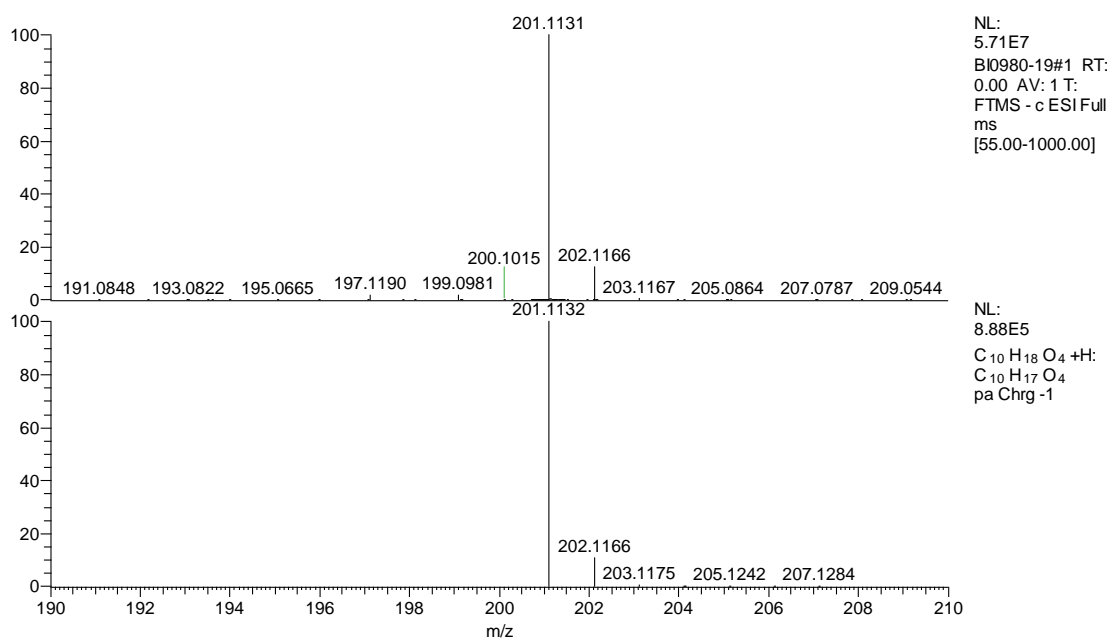
3.64. Μεταβολίτης 64

Ο μεταβολίτης **64** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.3 mg.



64

Το φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας του μεταβολίτη **64** (Εικ. 250) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^-$ σε m/z 201.1131.

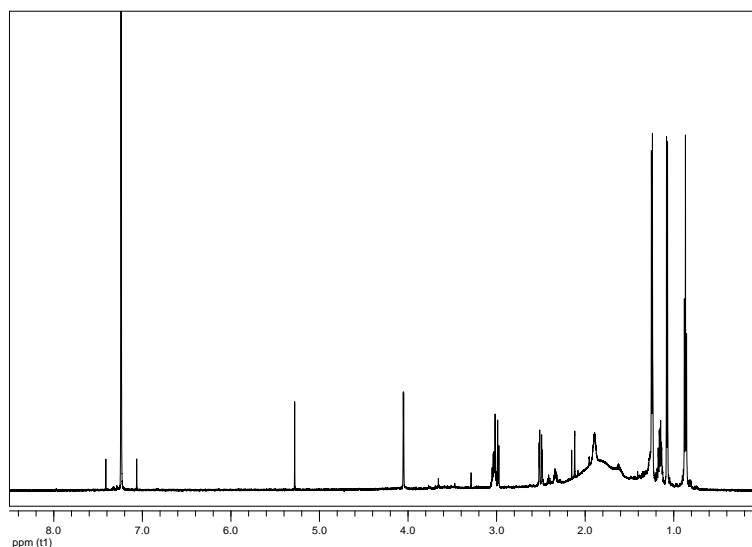


Εικόνα 250. Φάσμα μάζας (HR-ESIMS) του μεταβολίτη **64**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **64** (Εικ. 251) παρατηρήθηκαν:

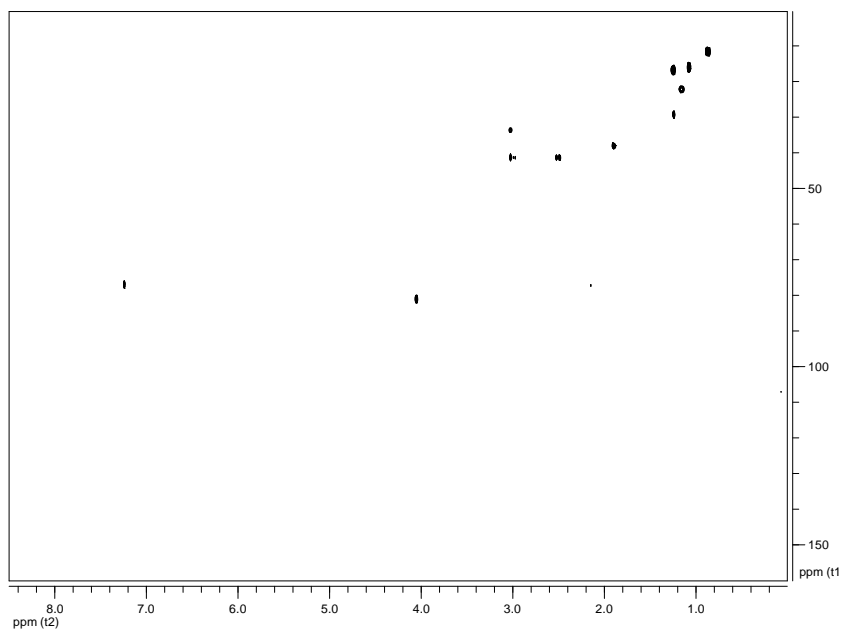
- Μία τριπλή κορυφή σε δ 0.87, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε σε πρωτόνια ενός αλειφατικού μεθυλίου σε δευτεροταγές άτομο άνθρακα.
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 1.08 και 1.25, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.

- Δύο πολλαπλές κορυφές σε δ 2.50 και 2.99, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου.
- Μία πολλαπλή και μία διπλή κορυφή σε δ 3.03 και 4.06, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν σε δύο πρωτόνια αποθωρακισμένων μεθινίων.

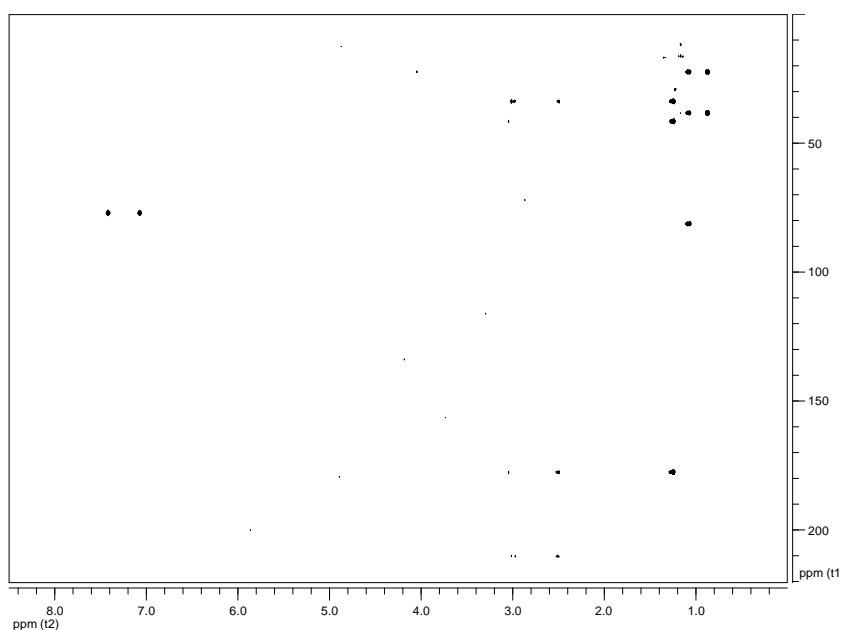


Εικόνα 251. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **64** σε CDCl_3 .

Με βάση τις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 252) και HMBC (Εικ. 253) έγινε εμφανής η παρουσία δέκα ατόμων άνθρακα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε τρία πρωτοταγή, δύο δευτεροταγή, τρία τριτοταγή και δύο τεταρτοταγή άτομα άνθρακα. Μεταξύ αυτών παρατηρήθηκαν δύο καρβονυλικά άτομα άνθρακα σε δ 177.8 και 210.6.



Εικόνα 252. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **64** σε CDCl_3 .

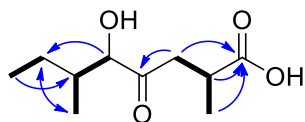


Εικόνα 253. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **64** σε CDCl_3 .

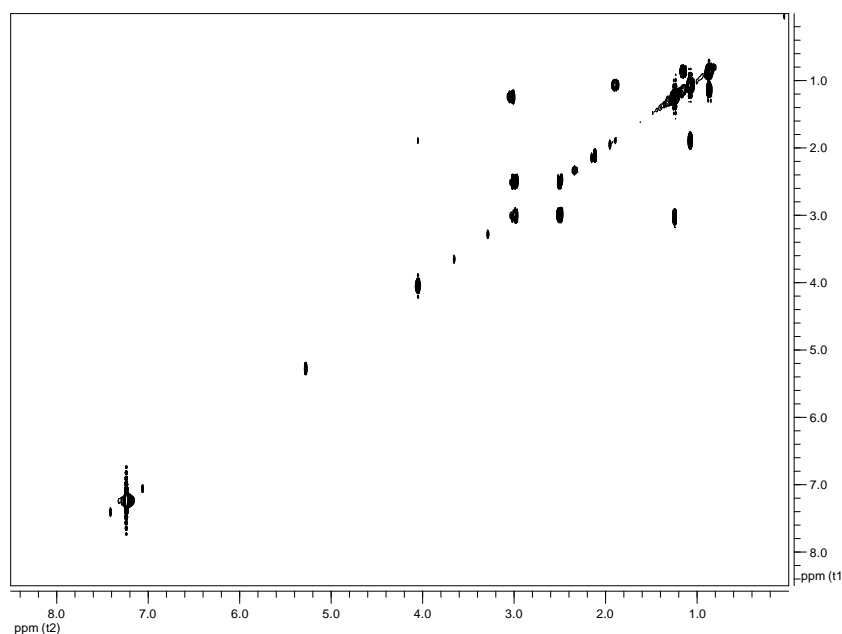
Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **64** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4$. Λαμβάνοντας υπόψη τα δύο καρβονύλια ως τους μοναδικούς βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι γραμμικό.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **64** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 254) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT, HMBC και COSY (Εικ. 255). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τα spin

συστήματα H-2 / H₃-10, H-5 / H-6 / H₃-9 και H-7 / H₃-8, ενώ οι συσχετίσεις του C-1 με τα H-2 και H₃-10 και του C-4 με το H₂-3 που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **64**, καθορίζοντας τις θέσεις των καρβονυλίων στο μόριο.



Εικόνα 254. Ομοκυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροκυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **64**.



Εικόνα 255. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **64** σε CDCl₃.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **64** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν που ανήκει στην κατηγορία των μονοτερπενίων. Η σχετική στεreoχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-2, C-5 και C-6 βρίσκεται υπό διερεύνηση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **64** παρατίθενται στον Πίνακα 198.

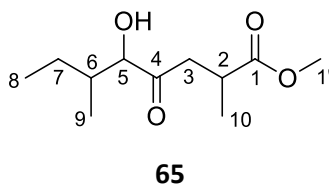
Πίνακας 198. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **64** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	177.8	-
2	33.6	3.03 (m)
3	41.4	2.99 (m), 2.50 (br d, 13.0)
4	210.6	-
5	81.0	4.06 (d, 2.7)
6	38.1	1.90 (m)
7	22.3	1.16 (m)
8	11.7	0.87 (t, 7.4)
9	16.0	1.08 (d, 6.9)
10	16.8	1.25 (d, 7.1)

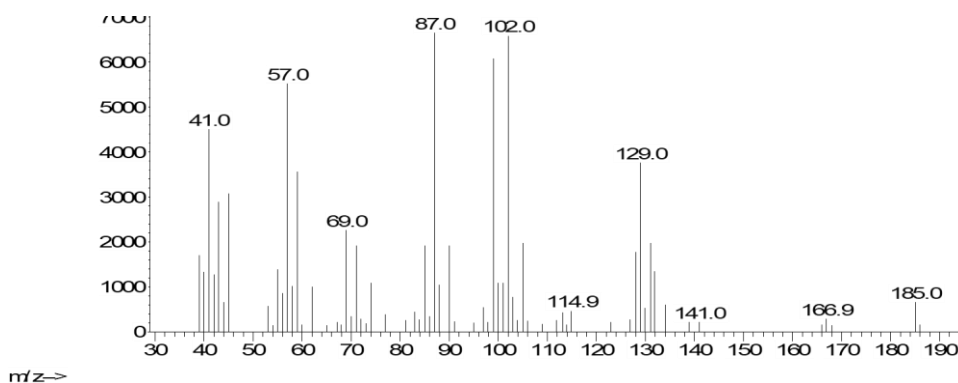
^a Σε CDCl₃.

3.65. Μεταβολίτης 65

Ο μεταβολίτης **65** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.4 mg.

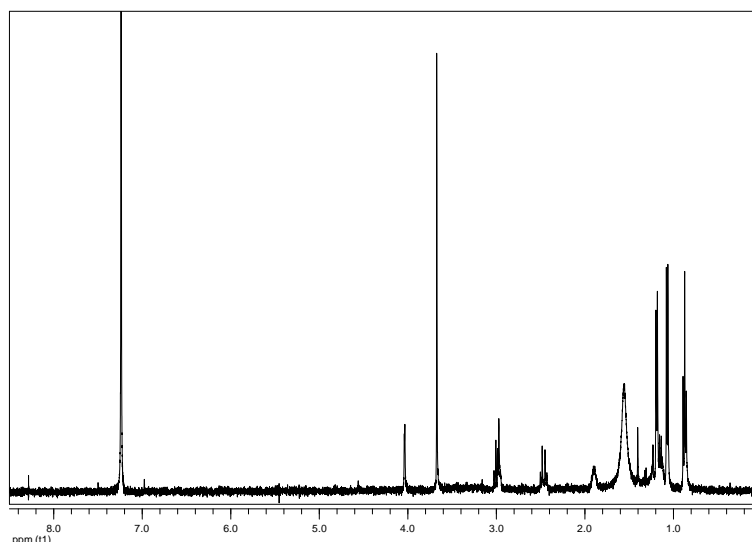


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **65** (Εικ. 256) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσμα $[M-CH_3O]^+$ σε m/z 185.



Εικόνα 256. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **65**.

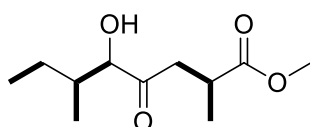
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **65** (Εικ. 257) παρατηρήθηκαν παρόμοιες κορυφές με εκείνες του μεταβολίτη **64**, με την κυριότερη διαφορά την θωράκιση του μεθυλίου στον C-2, με παράλληλη εμφάνιση μίας απλής κορυφής στα 3.67 ppm, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια μίας μεθοξυ-ομάδας.



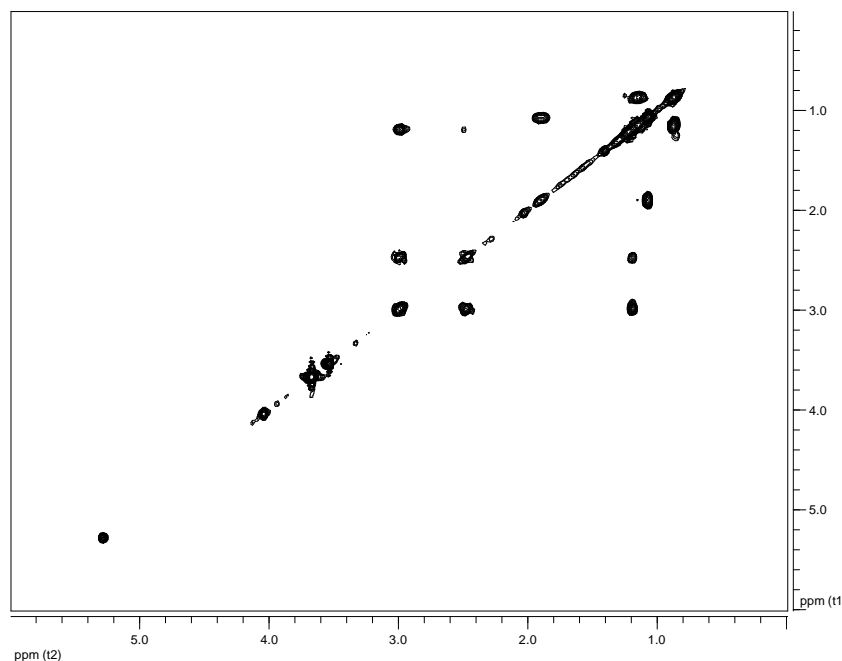
Εικόνα 257. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **65** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **65** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4$.

Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **65** προτάθηκε με βάση τις ομοπυρηνικές συσχετίσεις (Εικ. 258) που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 259). Μολονότι το μόριο ήταν ασταθές και δεν κατέστη δυνατή η λήψη φασμάτων HSQC και HMBC, η μεγάλη ομοιότητα των φασματοσκοπικών δεδομένων των **65** και **64** παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι ο μεταβολίτης **65** αποτελεί τον μεθυλεστέρα του **64**.



Εικόνα 258. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY για τον μεταβολίτη **65**.



Εικόνα 259. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **65** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **65** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν που ανήκει στην κατηγορία των μονοτερπενίων. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **65** παρατίθενται στον Πίνακα 199.

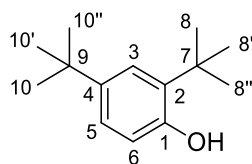
Πίνακας 199. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **65** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
2	3.00 (m)
3	3.00 (m), 2.47 (br d, 12.7)
5	4.04 (d, 2.5)
6	1.90 (m)
7	1.14 (m)
8	0.87 (t, 7.4)
9	1.07 (d, 6.9)
10	1.19 (d, 6.7)
1'	3.67 (br s)

^a Σε CDCl_3 .

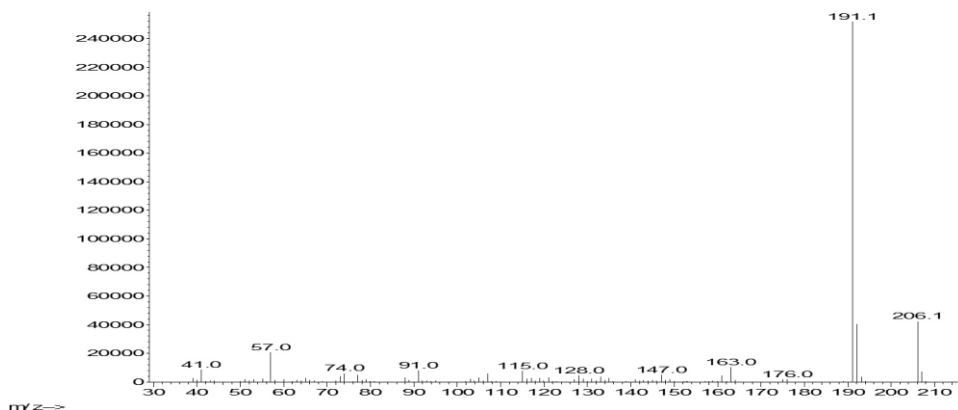
3.66. Μεταβολίτης 66

Ο μεταβολίτης **66** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.8 mg.



66

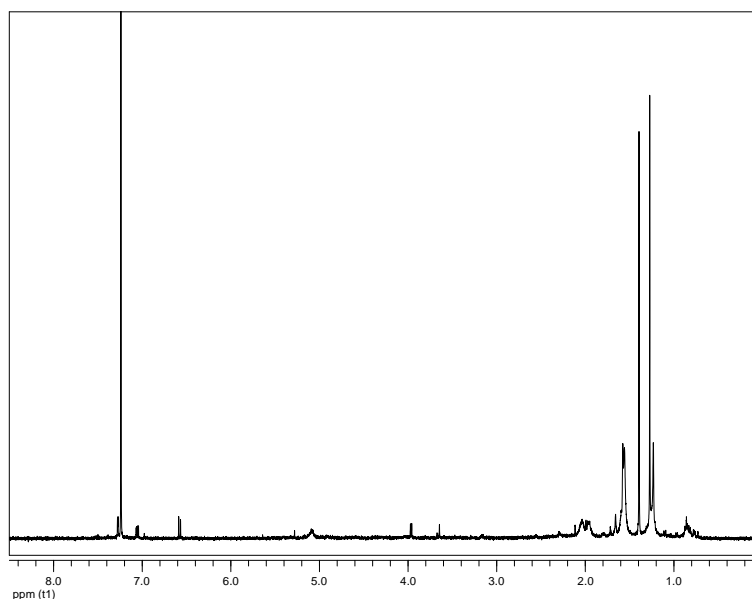
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **66** (Εικ. 260) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 206 και θραύσμα $[M-CH_3]^+$ σε m/z 191.



Εικόνα 260. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **66**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **66** (Εικ. 261) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Δύο απλές κορυφές σε δ 1.27 και 1.39, οι οποίες ολοκλήρωναν για εννέα πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια έξι μεθυλιών σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Τρεις κορυφές σε δ 6.58, 7.06 και 7.28, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός 1,2,4-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 261. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **66** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **66** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$. Λαμβάνοντας υπόψη τον αρωματικό δακτύλιο ως τους τέσσερις βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι μονοκυκλικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **66** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 2,4-δι-*t*-βουτυλοφαινόλη (2,4-di-*t*-butyl-phenol), το οποίο έχει απομονωθεί μεταξύ άλλων φυσικών πηγών και από στέλεχος του γένους *Pseudomonas* (Dharni et al., 2014). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αλκυλίωση φαινολών είναι μια αντίδραση που καταλύεται από την γέλη πυριτίου (Kamitori et al., 1984), ενώ η παρουσία του μεταβολίτη αυτού σε συσκευασμένα τρόφιμα έχει συσχετιστεί με τη χρήση γαντιών νιτριλίου (Sato et al., 2008). Παράλληλα, η 2,4-δι-*t*-βουτυλοφαινόλη αποτελεί ρύπο με αρνητικές συνέπειες τόσο στα θαλάσσια οικοσυστήματα, όσο και στον άνθρωπο (Wang et al., 2018). Λόγω της δομής της έχει μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά τη βιοδραστικότητα της σε διάφορους βιολογικούς στόχους (Kim et al., 2017a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **66** παρατίθενται στον Πίνακα 200.

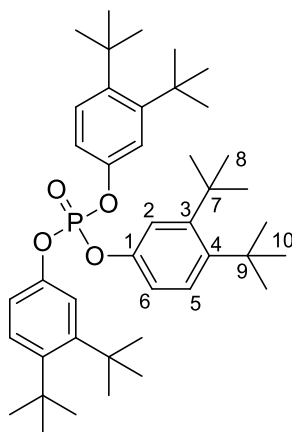
Πίνακας 200. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **66** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	7.28 (d, 2.5)	7.34 (d, 2.4)
5	7.06 (dd, 8.2, 2.5)	7.11 (dd, 8.2, 2.4)
6	6.58 (d, 8.2)	6.63 (d, 8.2)
8	1.39 (s)	1.46 (s)
10	1.27 (s)	1.34 (s)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Dharni et al. (2014).

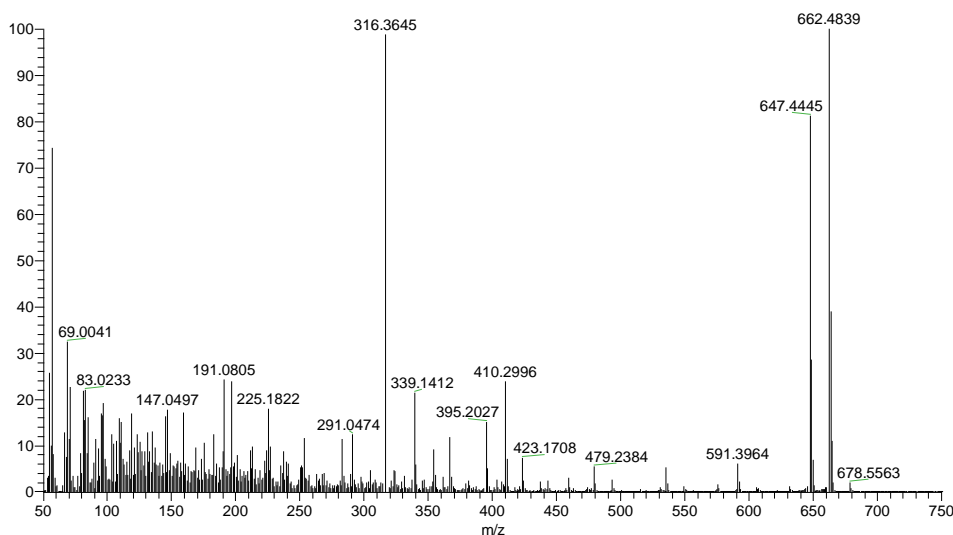
3.67. Μεταβολίτης 67

Ο μεταβολίτης **67** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.9 mg.



67

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **67** (Εικ. 262) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 662 και ισοτοπικό ιόν $[M+1]^+$ σε m/z 663 με αναλογία περίπου 2:1 που υποδεικνυε την παρουσία φωσφόρου στο μόριο.



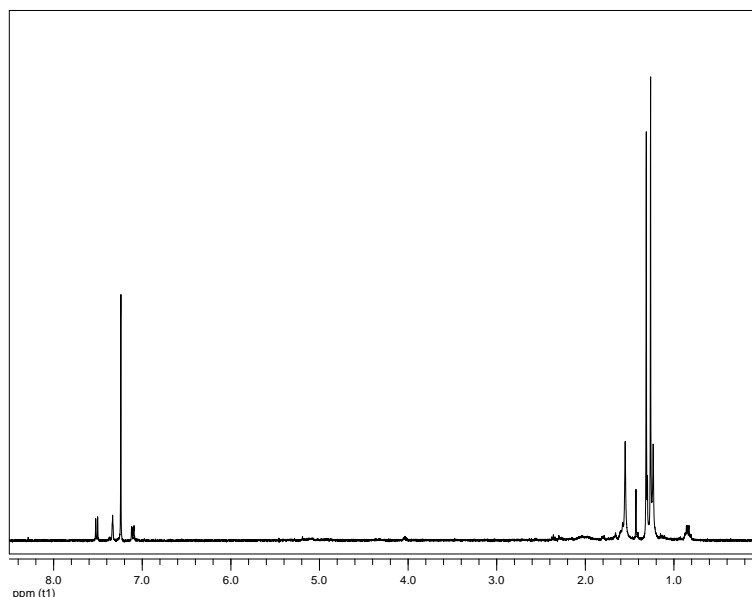
Εικόνα 262. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **67**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **67** (Εικ. 263) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Δύο απλές κορυφές σε δ 1.26 και 1.31, οι οποίες ολοκλήρωναν για εννέα πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια έξι μεθυλιών σε τεταρτοταγή άτομα

άνθρακα.

- Τρεις κορυφές σε δ 7.11, 7.33 και 7.51, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός 1,2,4-υποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 263. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **67** σε CDCl_3 .

Η παρουσία φωσφόρου στη δομή του μεταβολίτη **67** και το μοριακό του βάρος, σε συνδυασμό με την σχεδόν απόλυτη ταύτιση των χημικών μετατοπίσεων του με αυτά της 3,4-δι-*t*-βουτυλανιλίνης (Yar et al., 2015), οδήγησαν στον μοριακό τύπο $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{O}_4\text{P}$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **67** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το φωσφορικό-τρεις-3,4-δι-*t*-βουτυλοφαινύλιο [tris(3,4-di-*t*-butylphenyl)-phosphate], το οποίο πρώτη φορά απομονώνεται από φυσική πηγή και αποδίδονται τα φασματοσκοπικά του δεδομένα. Χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικός παράγοντας στη διαδικασία παραγωγής οπτικού φιλμ (Umeda, 2012). Γενικότερα, παρόμοιοι τριεστέρες του φωσφορικού οξέος χρησιμοποιούνται ως πλαστικοποιητές στα πολυμερή και έχουν βρεθεί λίγα ένζυμα που μπορούν να τους βιοαποικοδομήσουν (Mabanglo et al., 2016). Επίσης, κατηγορούνται ότι προκαλούν νευροτοξικότητα στο πλήρωμα λόγω της χρήσης τους στα μηχανικά λάδια των αεροσκαφών, αν και η συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται στον χώρο της καμπίνας δεν το υποστηρίζει (de Boer et al., 2015). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **67** παρατίθενται στον Πίνακα 201.

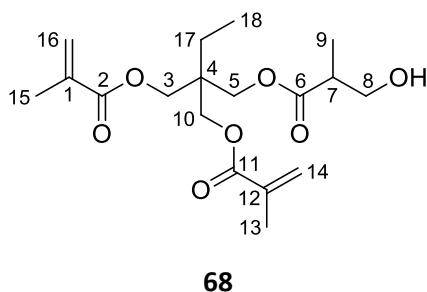
Πίνακας 201. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **67** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
2, 2', 2''	7.33 (br t, 2.3)
5, 5', 5''	7.51 (d, 8.7)
6, 6', 6''	7.11 (dd, 8.7, 2.3)
8, 8', 8''	1.26 (s)
10, 10', 10''	1.31 (s)

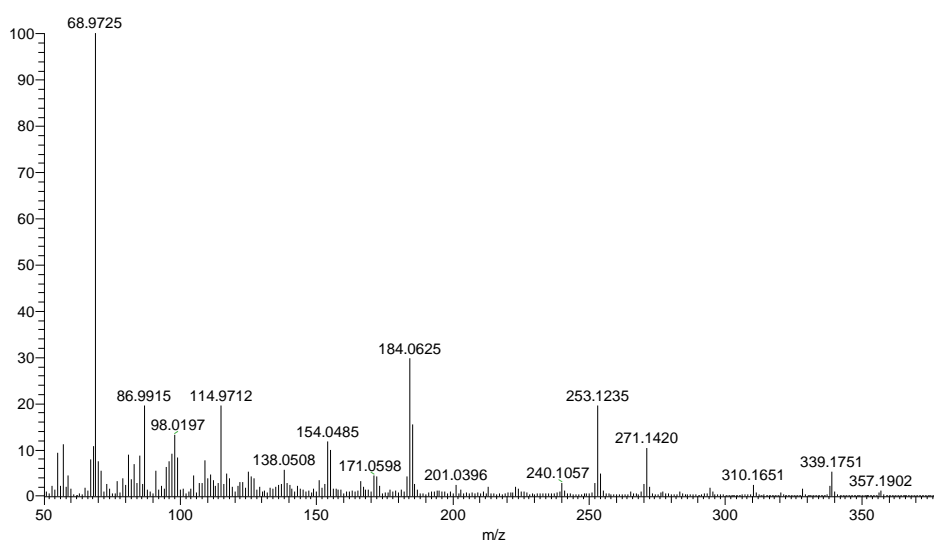
^a Σε CDCl₃.

3.68. Μεταβολίτης 68

Ο μεταβολίτης **68** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 7.5 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **68** (Εικ. 264) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 357, καθώς και θραύσμα $[M-OH]^+$ σε m/z 339.



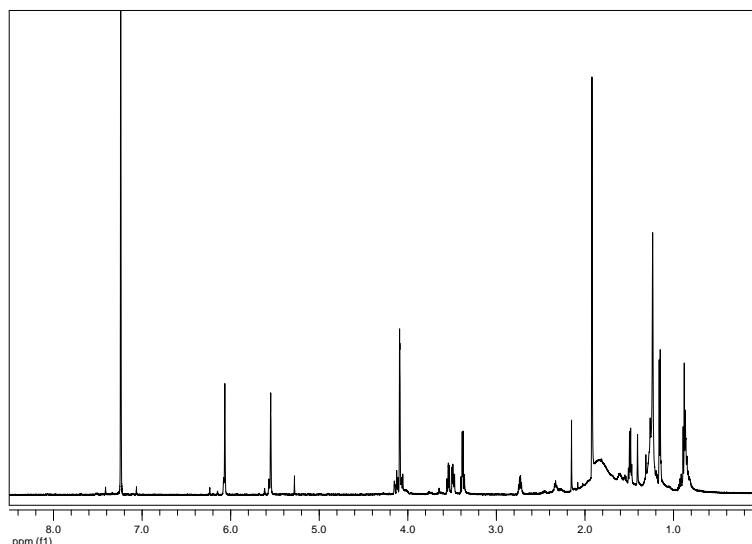
Εικόνα 264. Φάσμα μάζας (CIMS) του μεταβολίτη **68**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **68** (Εικ. 265) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Μία τριπλή και μία διπλή κορυφή σε δ 0.87 και 1.16, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο μεθυλιών σε δευτεροταγές και τριτοταγές άτομο άνθρακα, αντίστοιχα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.91, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια δύο βινυλικών μεθυλιών.
- Δύο διπλές διπλών κορυφές σε δ 3.47 και 3.56, με σύζευξη μεταξύ τους, οι οποίες

ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός αποθωρακισμένου μεθυλενίου.

- Μία απλή κορυφή σε δ 4.08, η οποία ολοκλήρωνε για τέσσερα πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια δύο απομονωμένων αποθωρακισμένων μεθυλενίων.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.54 και 6.06, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο εξωμεθυλενίων.



Εικόνα 265. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **68** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **68** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_7$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **68** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν κυανεοδιμυκίνη (cyaneodimycin), το οποίο έχει απομονωθεί από στέλεχος του *Streptomyces cyaneofuscatus* (Parrot et al., 2016). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **68** παρατίθενται στον Πίνακα 202.

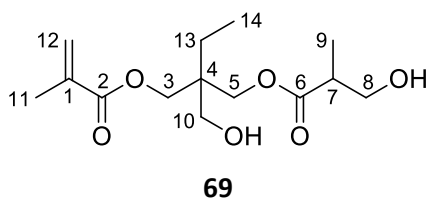
Πίνακας 202. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **68** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.08 (s)	4.06 (s)
5	3.37 (d, 2.9)	3.36-3.41 (m)
7	2.73 (dd, 13.2, 7.1)	2.69-2.73 (m)
8	3.56 (dd, 9.0, 7.1), 3.47 (dd, 9.0, 5.8)	3.46-3.56 (m)
9	1.16 (d, 7.1)	1.12 (d, 10)
10	4.08 (s)	4.06 (s)
13	1.91 (s)	1.90 (br s)
14	5.54 (br s), 6.06 (br s)	5.54 (br s), 6.04 (br s)
15	1.91 (s)	1.90 (br s)
16	5.54 (br s), 6.06 (br s)	5.54 (br s), 6.04 (br s)
17	1.48 (q, 7.6)	1.48 (q, 7.5)
18	0.87 (t, 7.6)	0.87 (t, 7.5)

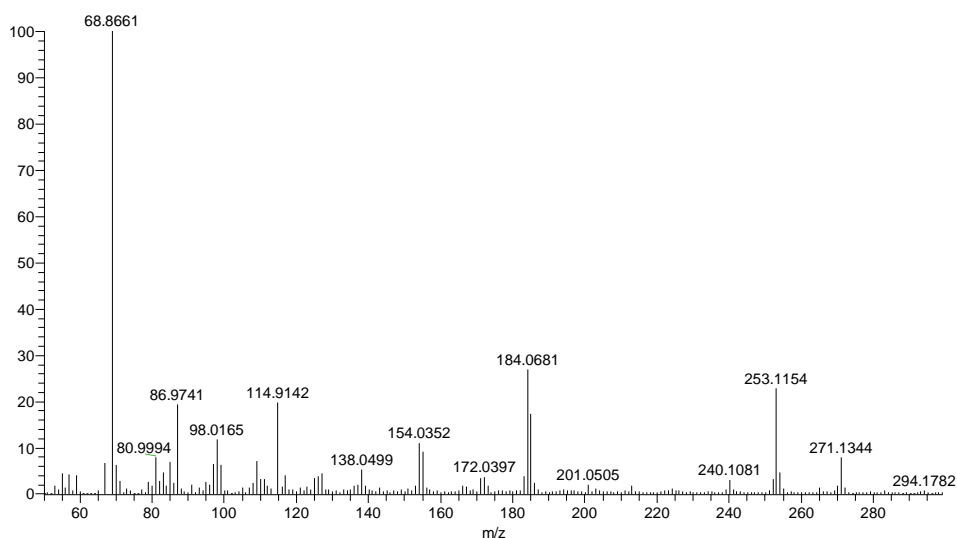
^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Parrot et al. (2016).

3.69. Μεταβολίτης 69

Ο μεταβολίτης **69** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.8 mg.



Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **69** (Εικ. 266) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσματα $[M-OH]^+$ και $[M-H_2O-OH]^+$ σε m/z 271 και 253, αντίστοιχα.



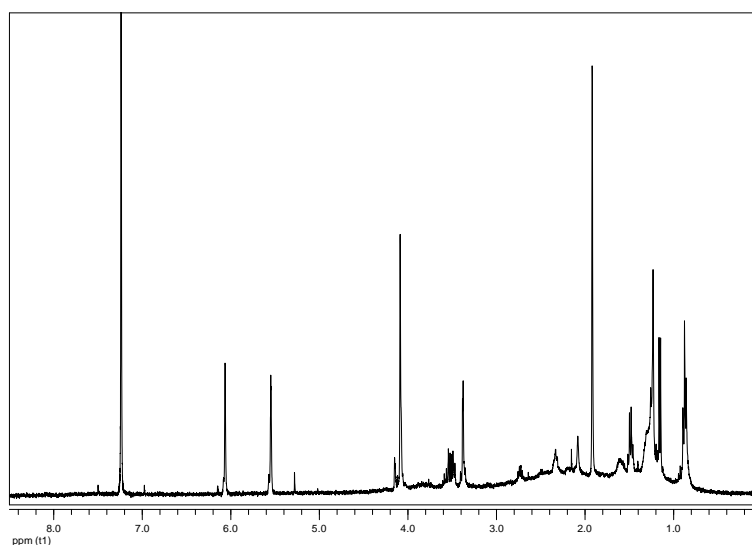
Εικόνα 266. Φάσμα μάζας (CIMS) του μεταβολίτη **69**.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **69** (Εικ. 267) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Μία τριπλή και μία διπλή κορυφή σε δ 0.88 και 1.16, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε δευτεροταγές και τριτοταγές άτομο άνθρακα, αντίστοιχα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.93, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός βινυλικού μεθυλίου.
- Μία ευρεία απλή και μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.38 και 3.51, αντίστοιχα, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο οξυγονωμένων μεθυλενίων.

- Μία απλή κορυφή σε δ 4.09, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια ενός απομονωμένου οξυγονωμένου μεθυλενίου.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.55 και 6.07, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.

Οι κυριότερες διαφορές που παρατηρήθηκαν στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **69** σε σύγκριση με το αντίστοιχο του μεταβολίτη **68** ήταν η απουσία ενός εκ των δύο βινυλικών μεθυλίων (δ 1.93) και ενός εκ των δύο εξωμεθυλενίων (σε δ 5.55 και 6.07) που παρέπεμπαν στην απόσπαση του ενός μεθακρυλικού οξέος από την δομή του μεταβολίτη **68**.



Εικόνα 267. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **69** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **69** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_6$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **69** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή του μεταβολίτη **69** έχει λανθασμένα προταθεί για το γνωστό φυσικό προϊόν κυανοομυκίνη (*cyanomycin*), το οποίο έχει απομονωθεί από στέλεχος του *S. cyaneofuscatus* (Parrot et al., 2016). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **69** παρατίθενται στον Πίνακα 203.

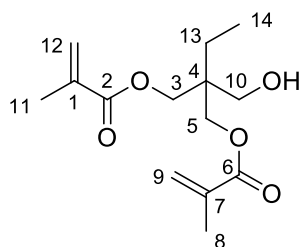
Πίνακας 203. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **69** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$
3	4.09 (br s)
5	3.78 (br s)
7	2.73 (m)
8	3.51 (m)
9	1.16 (d, 7.1)
10	3.38 (br s)
11	1.93 (s)
12	5.55 (br s), 6.07 (br s)
13	1.49 (q, 7.6)
14	0.88 (t, 7.6)

^a Σε CDCl₃.

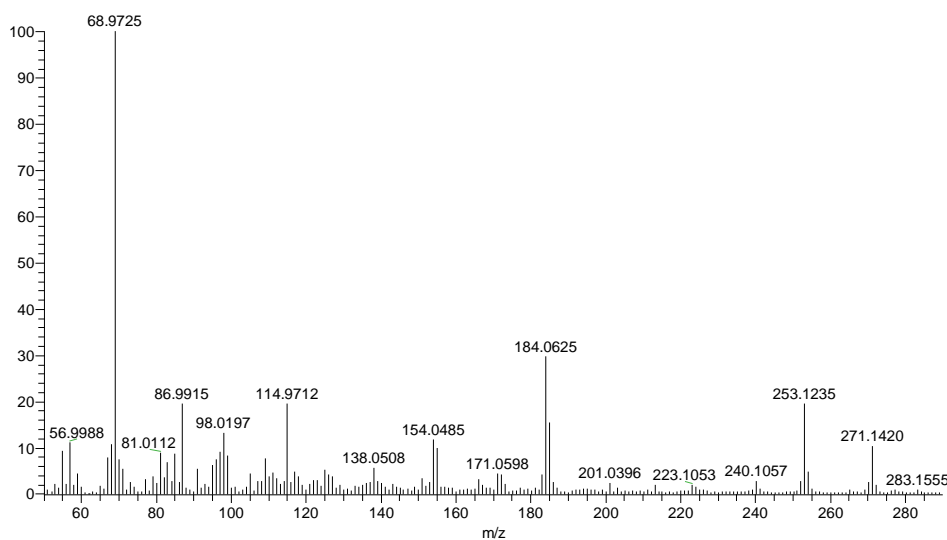
3.70. Μεταβολίτης 70

Ο μεταβολίτης **70** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 0.8 mg.



70

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **70** (Εικ. 268) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 271.



Εικόνα 268. Φάσμα μάζας (CIMS) του μεταβολίτη **70**.

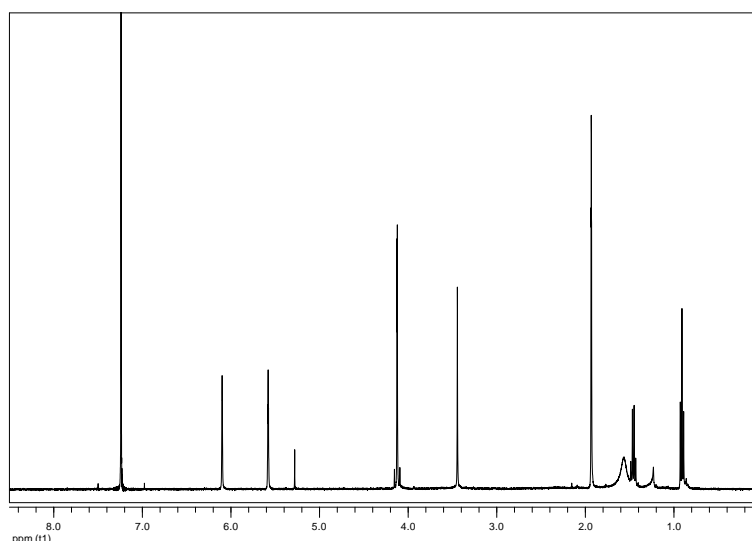
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **70** (Εικ. 269) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν:

- Μία τριπλή κορυφή σε δ 0.91, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε δευτεροταγές άτομο άνθρακα.
- Μία απλή κορυφή σε δ 1.93, η οποία ολοκλήρωνε για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια δύο βινυλικών μεθυλίων.
- Μία απλή κορυφή σε δ 3.44 και μία απλή κορυφή σε δ 4.12, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια και τέσσερα πρωτόνια, αντίστοιχα και αποδόθηκαν στα πρωτόνια

τριών οξυγονωμένων μεθυλενίων.

- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.58 και 6.10, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο εξωμεθυλενίων.

Οι κυριότερες διαφορές που παρατηρήθηκαν στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **70** σε σύγκριση με το αντίστοιχο του μεταβολίτη **68** ήταν η απουσία του υδροξυ-μεθυλενίου (σε δ 3.47 και 3.56), του τριτοταγούς μεθυλίου (σε δ 1.16) και του μοναδικού μεθινίου (σε δ 2.73) που παρέπεμπαν στην απόσπαση του 3-υδροξυ-2-μεθυλοπροπανοϊκού οξέος από την δομή του μεταβολίτη **68**.



Εικόνα 269. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **70** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **70** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5$.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **70** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για συνθετικό προϊόν, το οποίο πρώτη φορά απομονώνεται από φυσική πηγή (Inoue & Nagano, 2003). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **70** παρατίθενται στον Πίνακα 204.

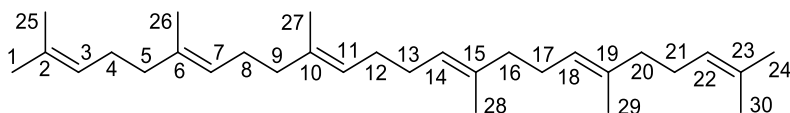
Πίνακας 204. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **70** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
3	4.12 (s)	4.14 (br s)
5	4.12 (s)	4.14 (br s)
8	1.93 (s)	1.95 (br s)
9	5.58 (br s), 6.10 (br s)	5.60 (br s), 6.11 (br s)
10	3.44 (s)	3.49 (s)
11	1.93 (s)	1.95 (br s)
12	5.58 (br s), 6.10 (br s)	5.60 (br s), 6.11 (br s)
13	1.46 (q, 7.6)	1.49 (q, 7.7)
14	0.91 (t, 7.6)	0.93 (t, 7.7)
OH	1.57 (br s)	2.64 (br s)

^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Ioue & Nagano (2003).

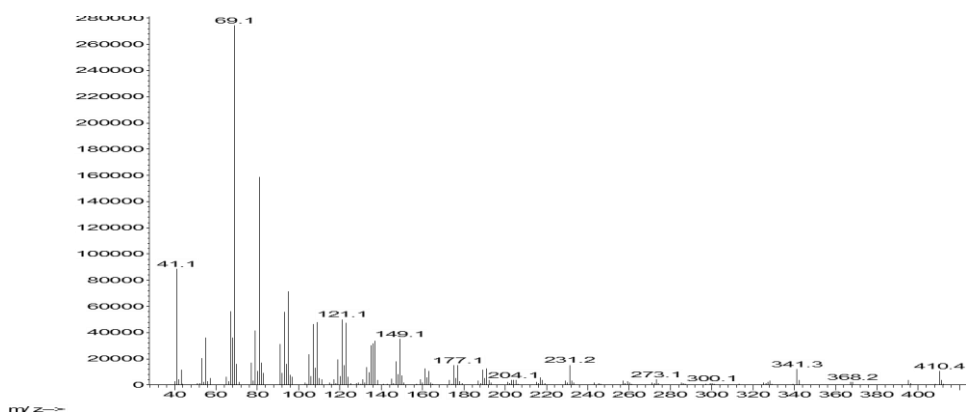
3.71. Μεταβολίτης 71

Ο μεταβολίτης **71** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 25.0 mg.



71

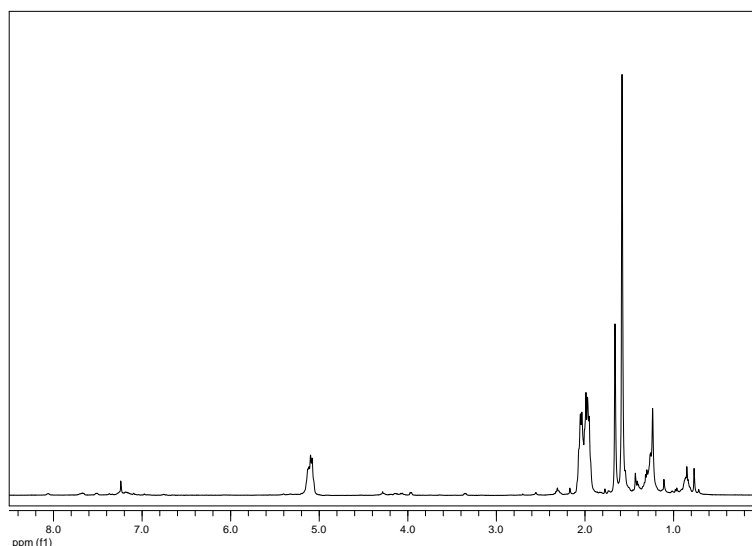
Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **71** (Εικ. 270) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 410.



Εικόνα 270. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **71**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **71** (Εικ. 271) σε CDCl_3 παρατηρήθηκαν:

- Δύο απλές κορυφές σε δ 1.58 και 1.66, οι οποίες ολοκλήρωναν για δώδεκα πρωτόνια συνολικά και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τεσσάρων βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία πολλαπλή κορυφή σε δ 5.11, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα μεθίνια τριών τριυποκατεστημένων διπλών δεσμών.



Εικόνα 271. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **71** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **71** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$. Λαμβάνοντας υπόψη τους έξι διπλούς δεσμούς ως τους βαθμούς ακορεστότητας του μορίου, το μόριο θα έπρεπε να είναι γραμμικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **71** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό τριτερπένιο σκουαλένιο (squalene), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση άλλων τριτερπενίων (Pogliani et al., 1994). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **71** παρατίθενται στον Πίνακα 205.

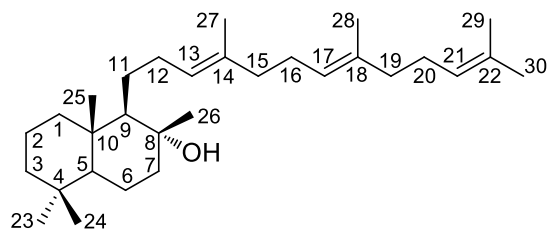
Πίνακας 205. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **71** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$
1,24	1.66 (s)	1.688 (s)
3,22	5.11 (m)	5.111 (t, 7.2)
4,21	2.05 (m)	2.079 (t, 7.6)
5,20	1.98 (m)	1.991 (m)
7,18	5.11 (m)	5.134 (t, 7.2)
8,17	2.05 (m)	2.097 (t, 8.2)
9,16	1.98 (m)	2.005 (m)
11,14	5.11 (m)	5.166 (t, 3.8)
12,13	1.98 (m)	2.032 (m)
25,30	1.58 (s)	1.612 (s)
26,29	1.58 (s)	1.610 (s)
27,30	1.58 (s)	1.618 (s)

^a Σε CDCl_3 . ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Pogliani et al. (1994).

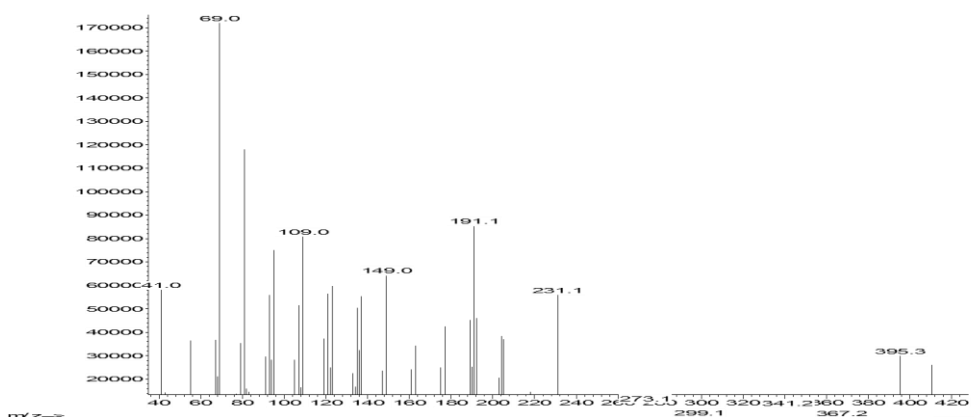
3.72. Μεταβολίτης 72

Ο μεταβολίτης **72** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο στερεό υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.3 mg.



72

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **72** (Εικ. 272) δεν εμφάνισε μοριακό ιόν, αλλά θραύσματα $[M-H_2O]^+$ και $[M-H_2O-CH_3]^+$ σε m/z 410 και 395, αντίστοιχα, που υποδήλωναν την παρουσία υδροξυλίου στο μόριο.

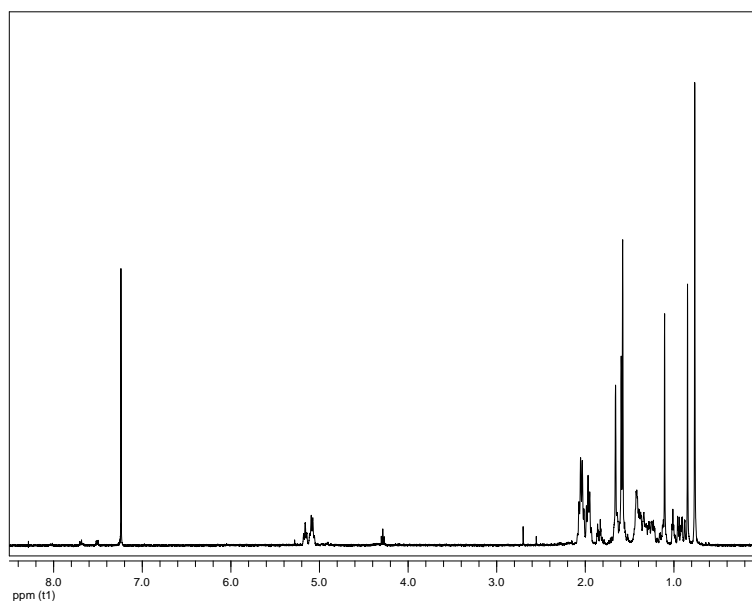


Εικόνα 272. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **72**.

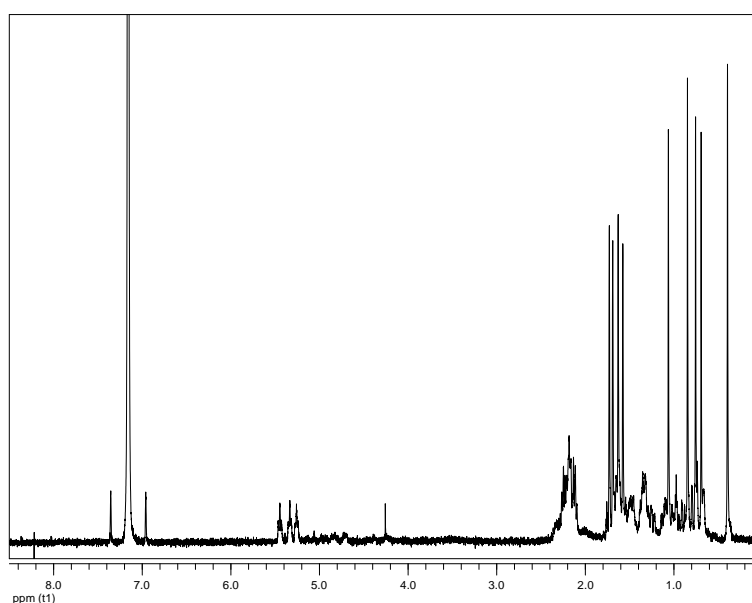
Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **72** (Εικ. 273) σε $CDCl_3$ παρατηρήθηκαν:

- Έξι απλές κορυφές σε δ 0.76, 0.85, 1.11, 1.58, 1.59 και 1.66, οι οποίες ολοκλήρωναν για εικοσιτέσσερα πρωτόνια συνολικά και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τεσσάρων θωρακισμένων και τεσσάρων βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Δύο τριπλές κορυφές σε δ 5.09 και 5.16, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα μεθίνια τριών τριυποκατεστημένων διπλών δεσμών.

Στο φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **72** (Εικ. 274) σε C_6D_6 παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα σήματα.



Εικόνα 273. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **72** σε CDCl_3 .



Εικόνα 274. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **72** σε C_6D_6 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **72** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}$. Λαμβάνοντας υπόψη τους τρεις διπλούς δεσμούς ως τους τρεις από τους πέντε βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο έπρεπε να είναι δικυκλικό.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **72** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό τριτερπένιο 8-υδροξυπολυποδα-13,17,21-τριένιο (8-hydroxyulypodol-13,17,21-triene), το οποίο απομονώθηκε πρώτη φορά από τη φτέρη *Polygodiodes formosana* (Arai et al., 1992) και

έπειτα από στέλεχος του *Bacillus megaterium* (Sato et al., 2011b). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **72** παρατίθενται στον Πίνακα 206.

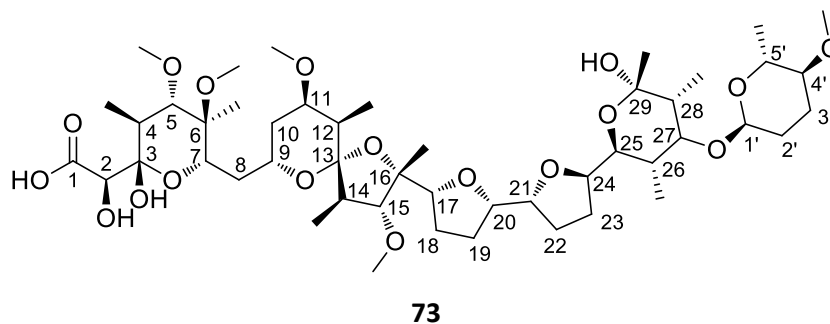
Πίνακας 206. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **72** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a	$\delta_c^{a,b}$	$\delta_H^{a,b}$	δ_H^c	$\delta_H^{c,d}$
1	40.4	1.64 (m), 0.95 (m)	39.7		1.64 (m), 0.91 (m)	1.76 (m), 1.03 (m)
2	18.1	1.41 (m)	18.5		1.52 (m), 1.35 (m)	1.64 (m), 1.47 (m)
3	42.0	1.35 (m), 1.14 (m)	42.1		1.35 (m), 1.08 (m)	1.47 (m), 1.20 (m)
4		-	33.3	-	-	-
5	56.4	0.89 (dd, 12.1, 2.0)	56.3		0.78 (m)	0.91 (dd, 12.3, 1.9)
6	21.3	1.63 (m), 1.24 (m)	20.6		1.47 (m), 1.07 (m)	1.59 (m), 1.19 (m)
7	44.8	1.85 (dt, 12.0, 2.7), 1.35 (m)	44.6		1.76 (m), 1.26 (m)	1.88 (m), 1.38 (m)
8		-	74.1	-	-	-
9	61.7	1.01 (t, 3.9)	61.6		0.98 (m)	1.10 (m)
10		-	39.2	-	-	-
11	26.7	1.41 (m), 1.28 (m)	25.6		1.62 (m), 1.32 (m)	1.74 (m), 1.44 (m)
12	31.6	2.04 (m)	31.5		2.32 (m), 2.18 (m)	2.45 (m), 2.31 (m)
13	125.1	5.16 (t, 7.1)	125.1	5.10-5.21 (br t, 6.4)	5.45 (t, 7.1)	5.56 (t, 7.0)
14		-	135.0	-	-	-
15	40.4	1.96 (m)	39.8		2.18 (m)	2.25 (m)
16	26.7	2.04 (m)	26.7		2.18 (m)	2.32 (m)
17	124.3	5.09 (t, 6.8)	124.3	5.10-5.21 (br t, 6.4)	5.33 (t, 6.7)	5.45 (t, 6.9)
18		-	135.2	-	-	-
19	40.4	1.96 (m)	39.8		2.18 (m)	2.25 (m)
20	26.7	2.04 (m)	26.8		2.18 (m)	2.32 (m)
21	124.3	5.09 (t, 6.8)	124.5	5.10-5.21 (br t, 6.4)	5.26 (t, 6.7)	5.37 (t, 6.9)
22		-	131.3	-	-	-
23	33.6	0.85 (s)	33.4	0.869 (s)	0.85 (s)	0.97 (s)
24	21.6	0.76 (s)	21.6	0.789 (s)	0.76 (s)	0.88 (s)
25	15.6	0.76 (s)	15.4	0.789 (s)	0.69 (s)	0.82 (s)
26	24.1	1.11 (s)	23.9	1.130 (s)	1.06 (s)	1.18 (s)
27	16.3	1.59 (s)	16.0	1.603 (s)	1.73 (s)	1.84 (s)
28	16.7	1.58 (s)	16.1	1.603 (s)	1.63 (s)	1.75 (s)
29	25.8	1.66 (s)	25.7	1.603 (s)	1.69 (s)	1.81 (s)
30	16.7	1.58 (s)	17.7	1.603 (s)	1.58 (s)	1.69 (s)

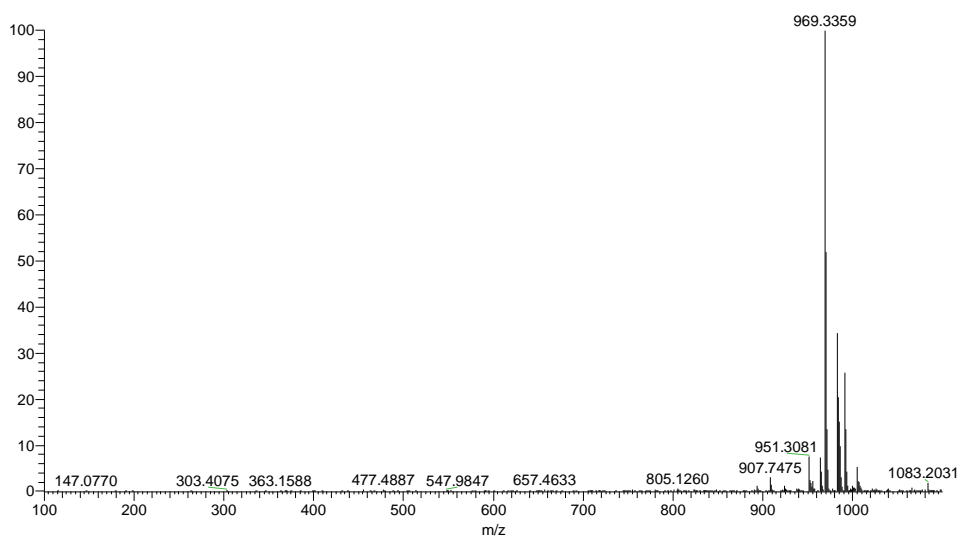
^a Σε CDCl₃. ^b Βιβλιογραφικά δεδομένα από Arai et al. (1992). ^c Σε C₆D₆. ^d Βιβλιογραφικά δεδομένα από Sato et al. (2011b).

3.73. Μεταβολίτης 73

Ο μεταβολίτης **73** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως κίτρινωπό κρυσταλλικό υπόλειμμα συνολικής μάζας 222.4 mg.

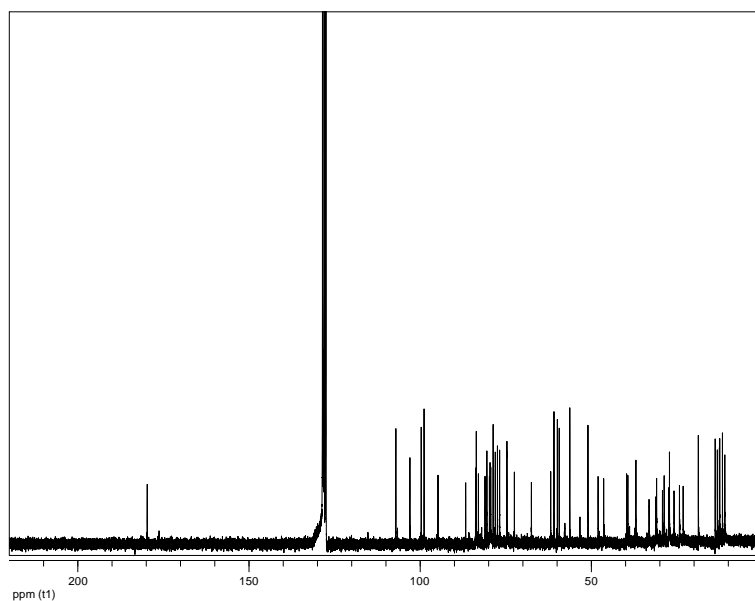


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **73** (Εικ. 275) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 969.



Εικόνα 275. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **73**.

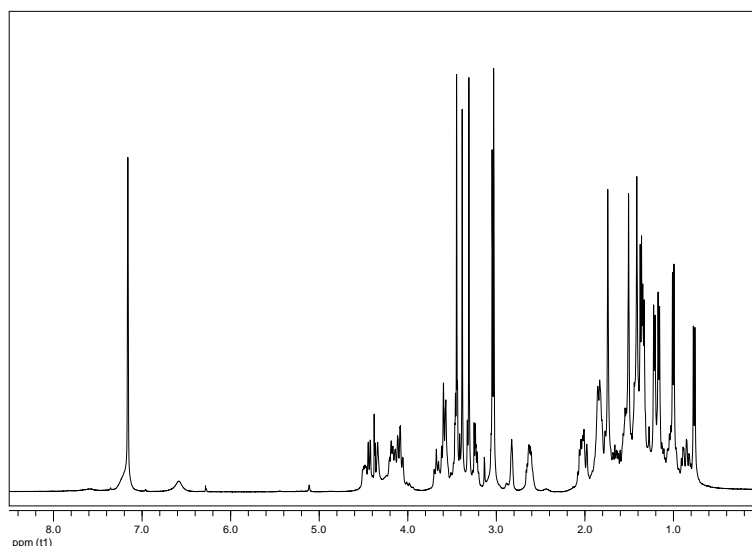
Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **73** (Εικ. 276) εμφανίσθηκαν 48 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν πολλά σήματα στην περιοχή των οξυγονωμένων ανθράκων. Επίσης, παρατηρήθηκε ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 179.7, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία ενός καρβοξυλικού οξέος στο μόριο.



Εικόνα 276. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **73** σε μίγμα CDCl_3 και C_6D_6 .

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **73** (Εικ. 277) παρατηρήθηκαν:

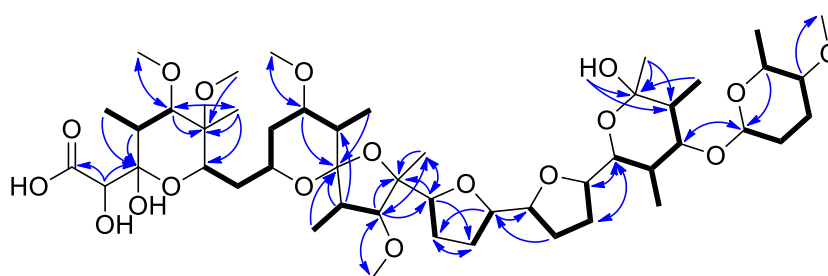
- Έξι διπλές κορυφές σε δ 0.77, 1.00, 1.17, 1.22, 1.34 και 1.37, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια έξι μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 1.41, 1.51 και 1.74, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν σε πρωτόνια τριών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Πέντε απλές κορυφές σε δ 3.03, 3.05, 3.31, 3.39 και 3.45, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια μεθυλίων πέντε μεθοξυομάδων.
- Πολλά σήματα στην περιοχή των οξυγονωμένων μεθινίων.



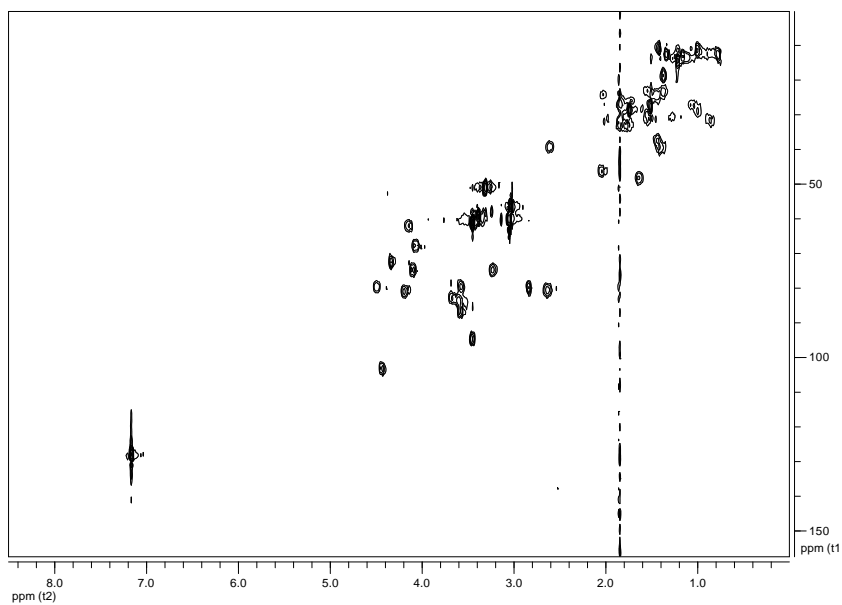
Εικόνα 277. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **73** σε μίγμα CDCl_3 και C_6D_6 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **73** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$. Λαμβάνοντας υπόψη το καρβονύλιο ως έναν από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να έχει επτά δακτυλίους.

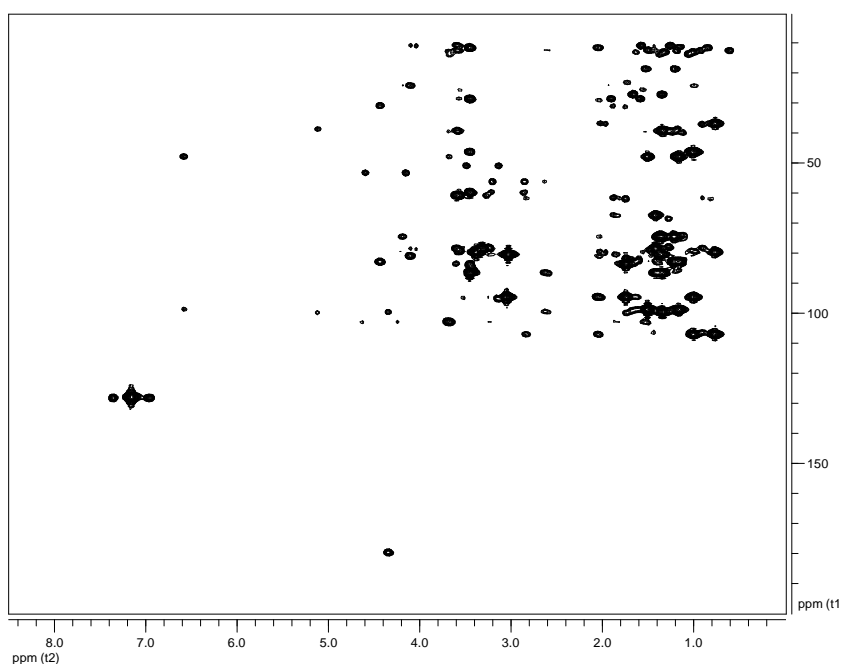
Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **73** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 278) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC (Εικ. 279), HMBC (Εικ. 280) και COSY (Εικ. 281). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τα spin συστήματα, ενώ οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **73**.



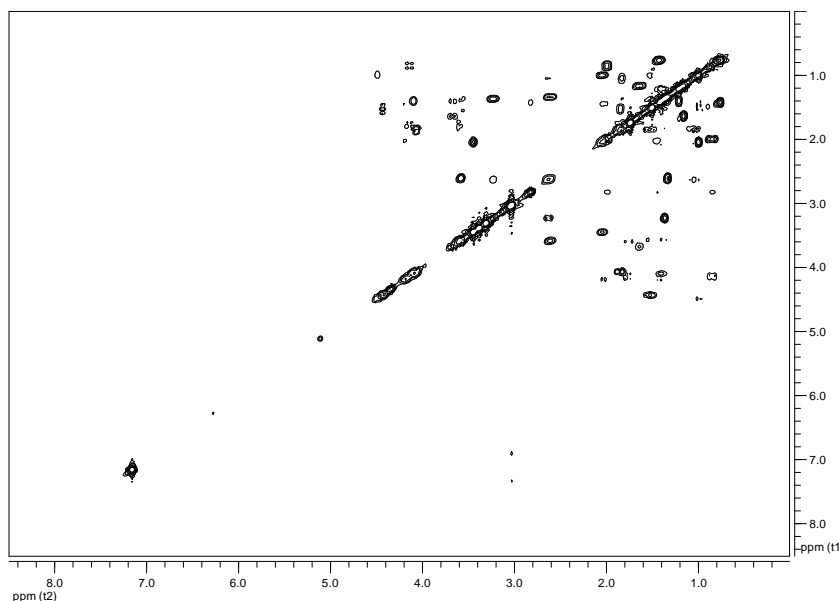
Εικόνα 278. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **73**.



Εικόνα 279. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **73** σε μίγμα CDCl_3 και C_6D_6 .



Εικόνα 280. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **73** σε μίγμα CDCl_3 και C_6D_6 .



Εικόνα 281. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **73** σε μίγμα CDCl_3 και C_6D_6 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **73** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό πολυαιθερικό μόριο K-41A, το οποίο έχει απομονωθεί από είδη του γένους *Streptomyces* (Tsuji et al., 1976; Shiro et al., 1978; Occolowitz et al., 1978; Tsuji et al., 1979) και έχει επιδείξει αντιβακτηριακή δράση έναντι διάφορων στελεχών (Hoshi et al., 1997; Hoshi et al., 2000). Ακόμη, έχει παρουσιάσει αξιοσημείωτη ανθελνοσιακή δράση *in vitro* έναντι ανθεκτικών και μη στελεχών του *Plasmodium falciparum* και *in vivo* έναντι του ευαίσθητου στη χλωροκίνη στελέχους *P. berghei* strain N και του ανθεκτικού στη χλωροκίνη στελέχους *P. yoelli* spp. strain NS (Otoguro et al., 2002). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **73**, τα οποία παρουσιάζονται για πρώτη φορά καθώς στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί τα φασματοσκοπικά δεδομένα μόνο για το μετά Na^+ άλας, παρατίθενται στον Πίνακα 207.

Πίνακας 207. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **73** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

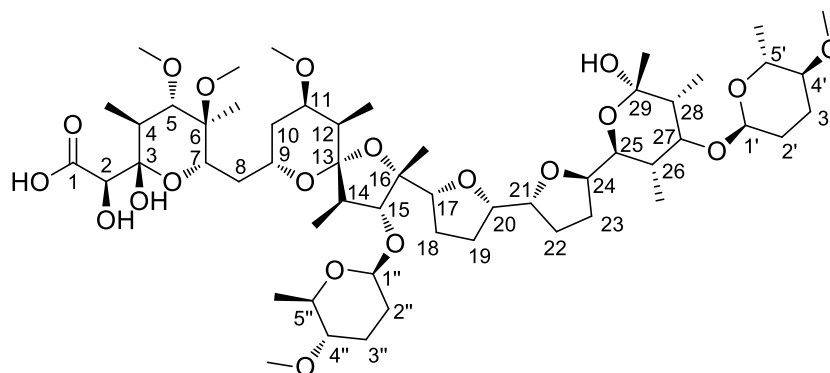
Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	179.7	-
2	72.5	4.34 (br s)
3	99.7	-
4	39.3	2.61 (m)
5	86.7	3.58 (m)
6	78.7	-
7	67.5	4.07 (m)
8	33.1	1.85 (m), 1.77 (m)
9	61.9	4.14 (m)
10	30.9	2.00 (m), 0.86 (m)

11	79.8	2.83 (br s)
12	37.0	1.46 (m)
13	107.1	-
14	46.4	2.04 (m)
15	94.8	3.44 (m)
16	83.6	-
17	83.8	3.60 (m)
18	25.8	1.79 (m), 1.71 (m)
19	23.2	1.55 (m), 1.37 (m)
20	79.4	3.58 (m)
21	79.6	4.49 (dd, 10.3, 4.8)
22	29.2	1.55 (m), 1.00 (m)
23	24.3	2.02 (m), 1.45 (m)
24	81.0	4.20 (m)
25	74.6	4.10 (m)
26	39.7	1.41 (m)
27	83.0	3.68 (t, 9.9)
28	48.0	1.65 (m)
29	98.4	-
1'	103.0	4.44 (d, 9.4)
2'	31.2	1.84 (m), 1.54 (m)
3'	27.2	1.84 (m), 1.06 (m)
4'	80.5	2.64 (m)
5'	74.7	3.24 (m)
4-Me	12.5	1.34 (d, 6.6)
5-OMe	60.9	3.45 (s)
6-Me	11.0	1.41 (s)
6-OMe	51.0	3.31 (s)
11-OMe	59.4	3.39 (s)
12-Me	12.6	0.77 (d, 7.0)
14-Me	11.7	1.00 (d, 6.6)
15-OMe	59.9	3.05 (s)
16-Me	28.7	1.74 (s)
26-Me	13.8	1.22 (d, 6.4)
28-Me	13.2	1.17 (d, 6.7)
29-Me	27.3	1.51 (s)
29-OH	-	6.59 (br s)
4'-OMe	56.3	3.03 (s)
5'-Me	18.7	1.37 (d, 6.1)

^a Σε μίγμα CDCl₃ και C₆D₆ (σε αναλογία 85:15).

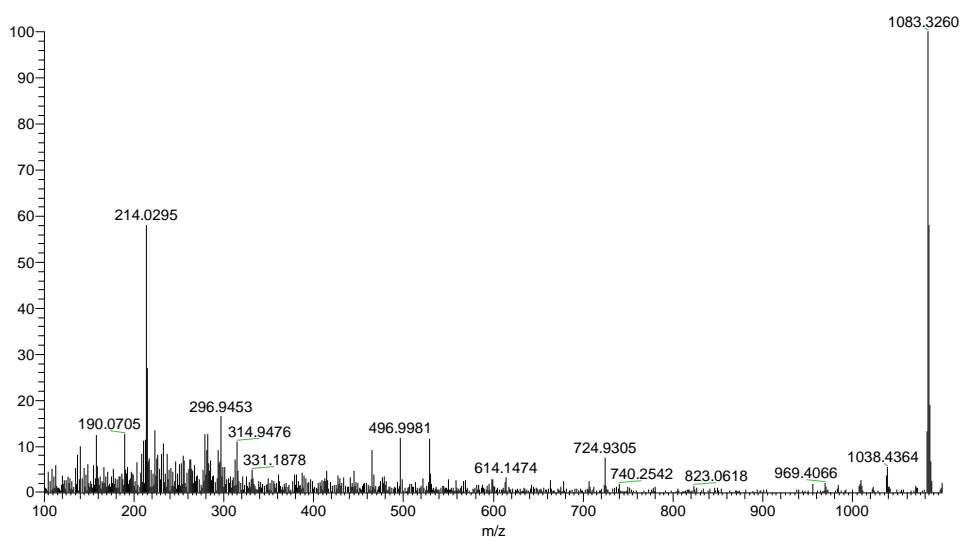
3.74. Μεταβολίτης 74

Ο μεταβολίτης **74** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 5.9 mg.



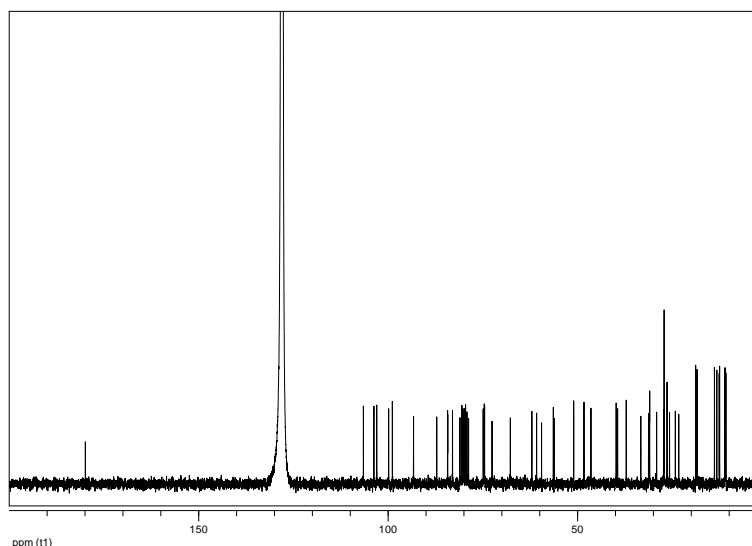
74

Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **74** (Εικ. 282) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 1083.



Εικόνα 282. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **74**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **74** (Εικ. 283) εμφανίσθηκαν 54 κορυφές, σε παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις με τον μεταβολίτη **73**.

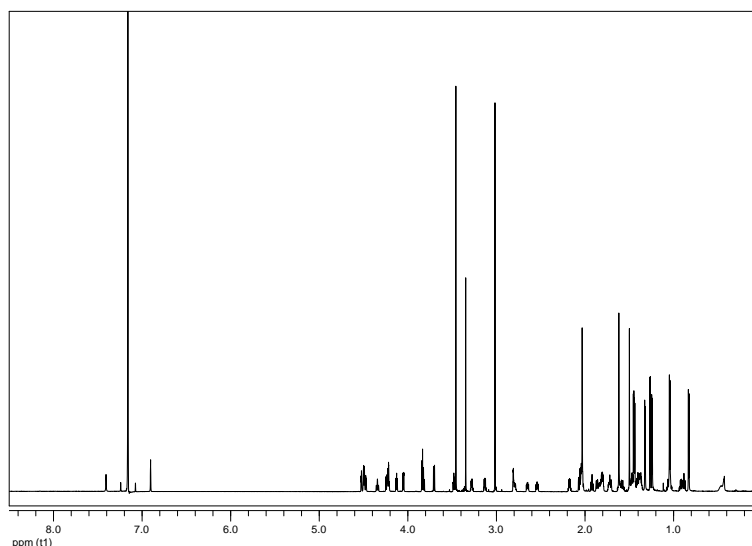


Εικόνα 283. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **74** σε C_6D_6 .

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **74** (Εικ. 284) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με εκείνα του μεταβολίτη **73** και συγκεκριμένα:

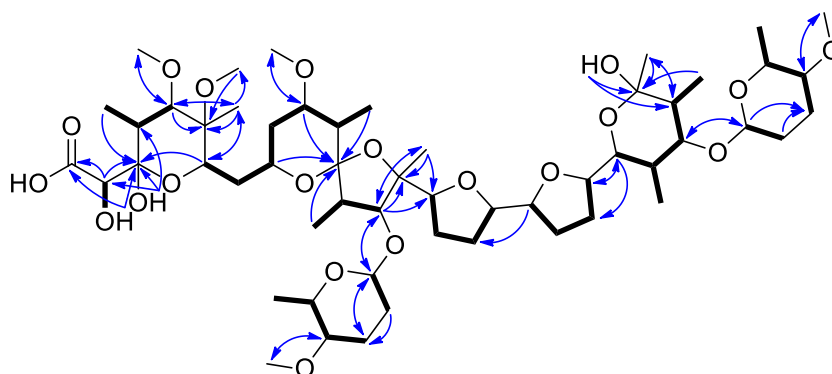
- Επτά διπλές κορυφές σε δ 0.83, 1.04, 1.24, 1.27, 1.32, 1.44 και 1.45, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια επτά μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 1.50, 1.62 και 2.03, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν σε πρωτόνια τριών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 3.02, 3.35 και 3.46, οι οποίες ολοκλήρωναν για δεκαπέντε πρωτόνια συνολικά και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια μεθυλίων πέντε μεθοξυ-ομάδων.
- Πολλά σήματα στην περιοχή των οξυγονωμένων μεθινίων.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **74** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{20}$. Λαμβάνοντας υπόψη το καρβονύλιο ως έναν από τους εννέα βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να έχει οκτώ δακτυλίους.

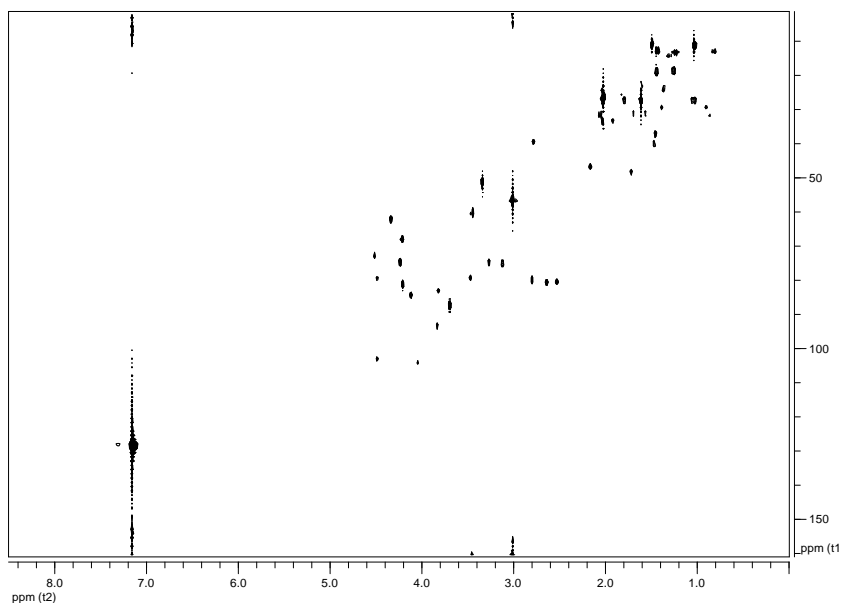


Εικόνα 284. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **74** σε C_6D_6 .

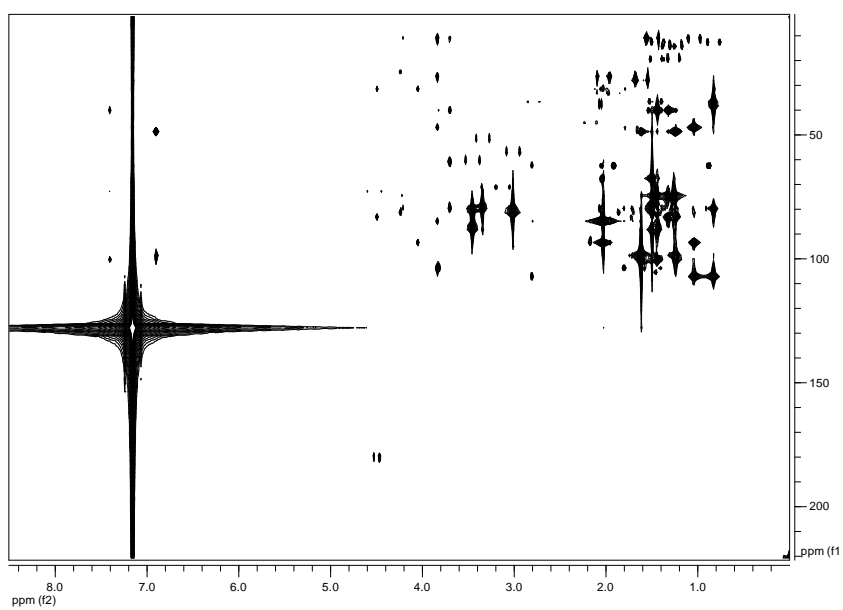
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **74** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 285) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 286), HMBC (Εικ. 287) και COSY (Εικ. 288). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τα spin συστήματα, ενώ οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **74**, κατά αντιστοιχία με τον μεταβολίτη **73**. Η θέση του επιπλέον πυρανικού δακτυλίου επιβεβαιώθηκε από τη συσχέτιση του C-15 με το H-1''.



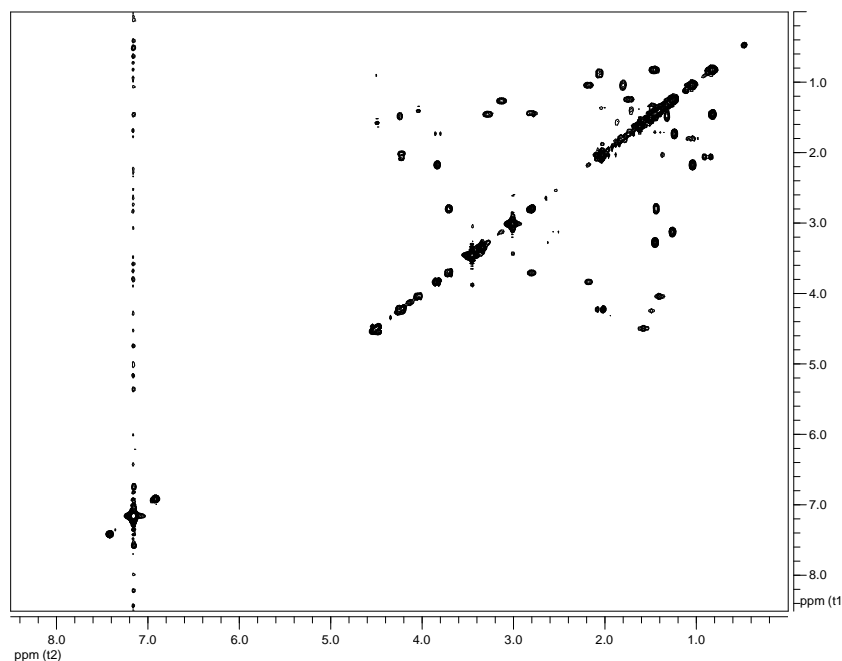
Εικόνα 285. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **74**.



Εικόνα 286. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **74** σε C₆D₆.



Εικόνα 287. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **74** σε C₆D₆.



Εικόνα 288. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **74** σε C₆D₆.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **74** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό πολυαιθερικό μόριο K-41B, το οποίο έχει απομονωθεί από το στέλεχος του *Streptomyces hygrosopicus* K-41 (Tsuji et al., 1979) και δεν υπάρχουν αναφορές ως προς την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **74**, τα οποία παρουσιάζονται για πρώτη φορά καθώς στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί τα φασματοσκοπικά δεδομένα μόνο για το μετά Na⁺ άλας, παρατίθενται στον Πίνακα 208.

Πίνακας 208. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **74** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

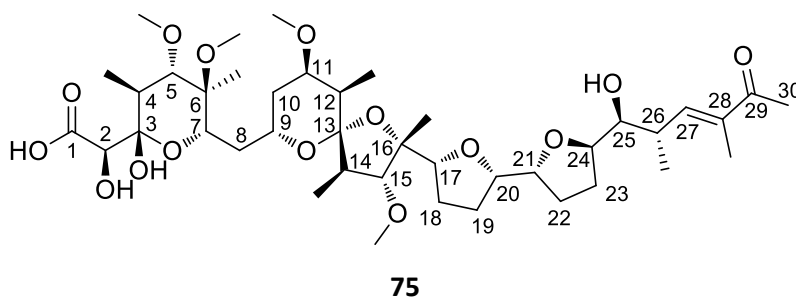
Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	179.9	-
2	72.6	4.53 (dd, 5.3, 1.4)
3	99.9	-
4	39.4	2.79 (dq, 11.1, 6.7)
5	87.2	3.70 (d, 11.1)
6	78.8	-
7	67.7	4.22 (m)
8	33.3	2.04 (m), 1.93 (t, 12.0)
9	62.1	4.34 (t, 12.0)
10	31.3	2.07 (br d, 13.9), 0.88 (ddd, 14.0, 12.0, 3.0)
11	79.8	2.81 (q, 3.0)
12	37.2	1.47 (m)
13	106.5	-
14	46.5	2.17 (dq, 9.3, 6.8)

15	93.3	3.84 (d, 9.3)
16	84.3	-
17	84.3	4.13 (dd, 8.8, 7.2)
18	25.7	2.04 (m), 1.84 (m)
19	23.3	1.61 (m), 1.38 (m)
20	79.2	3.48 (ddd, 8.9, 7.2, 1.7)
21	79.6	4.50 (m)
22	29.1	1.41 (m), 0.91 (ddd, 11.8, 8.0, 8.0)
23	24.2	2.04 (m), 1.38 (m)
24	81.0	4.22 (m)
25	74.5	4.24 (m)
26	39.8	1.48 (m)
27	83.0	3.82 (t, 9.9)
28	48.3	1.73 (m)
29	98.9	-
1'	103.0	4.50 (m)
2'	31.0	1.87 (br d, 13.7), 1.58 (dddd, 13.7, 9.5, 9.5, 4.3)
3'	27.2	1.81 (m), 1.05 (m)
4'	80.5	2.64 (ddd, 10.8, 8.9, 4.6)
5'	74.6	3.28 (dq, 8.9, 6.1)
1''	103.8	4.05 (dd, 9.4, 1.8)
2''	31.0	1.71 (br d, 14.0), 1.41 (m)
3''	27.2	1.81 (m), 1.05 (m)
4''	80.2	2.54 (ddd, 10.7, 9.0, 4.5)
5''	74.9	3.13 (dq, 9.0, 6.1)
2-OH	-	4.47 (br d, 5.3)
3-OH	-	7.41 (br s)
4-Me	12.6	1.44 (d, 6.7)
5-OMe	60.8	3.46 (s)
6-Me	10.9	1.50 (s)
6-OMe	51.0	3.35 (s)
11-OMe	59.5	3.46 (s)
12-Me	12.5	0.83 (d, 7.1)
14-Me	11.1	1.04 (d, 6.8)
16-Me	26.4	2.03 (s)
26-Me	13.9	1.32 (d, 6.4)
28-Me	13.3	1.24 (d, 6.7)
29-Me	27.3	1.62 (s)
29-OH	-	6.90 (br s)
4'-OMe	56.1	3.02 (s)
5'-Me	18.8	1.45 (d, 6.1)
4''-OMe	56.4	3.02 (s)
5''-Me	18.5	1.27 (d, 6.1)

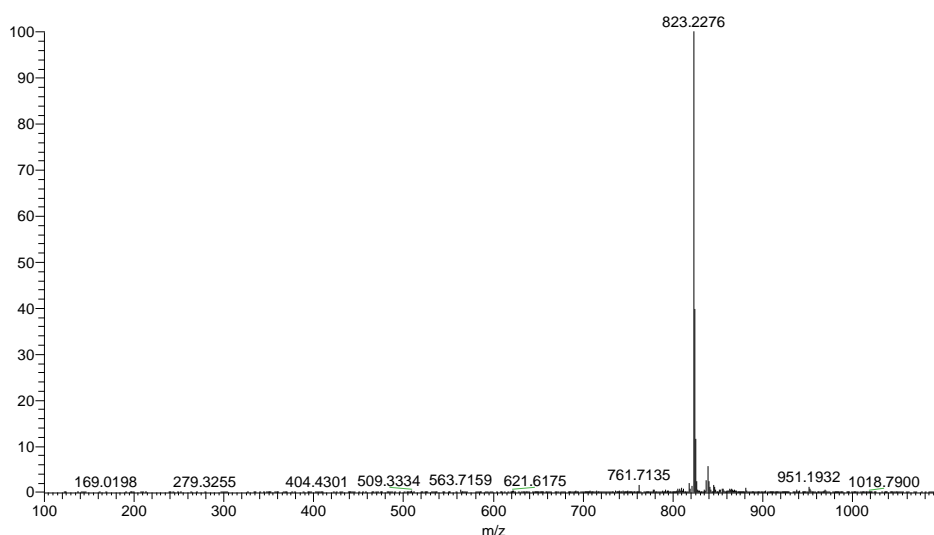
^a Σε C₆D₆.

3.75. Μεταβολίτης 75

Ο μεταβολίτης **75** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό κρυσταλλικό υπόλειμμα συνολικής μάζας 15.3 mg.

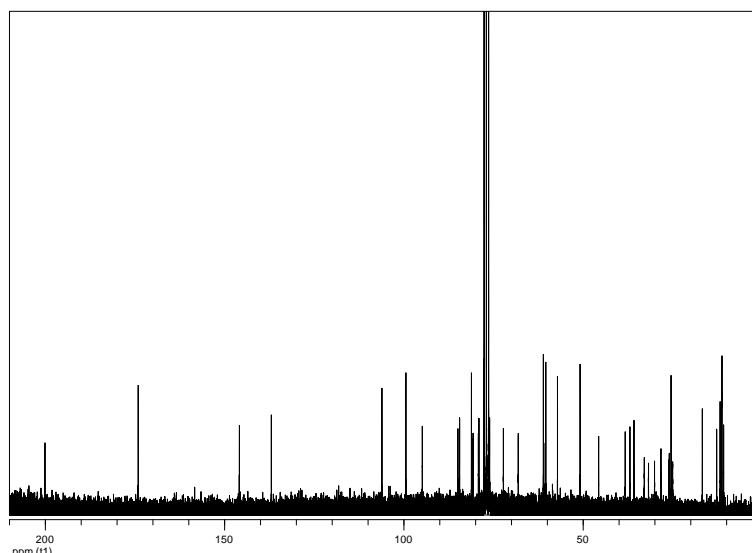


Το φάσμα μάζας του μεταβολίτη **75** (Εικ. 289) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+Na]^+$ σε m/z 823.



Εικόνα 289. Φάσμα μάζας (ESIMS) του μεταβολίτη **75**.

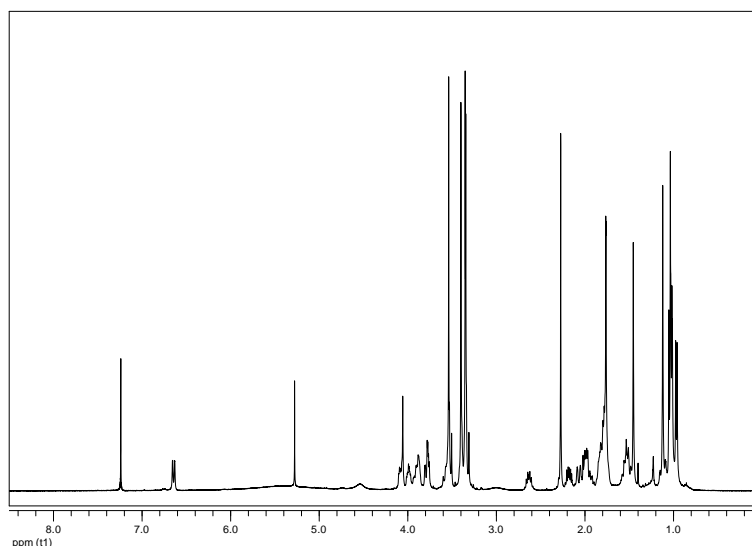
Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **75** (Εικ. 290) εμφανίσθηκαν 41 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν πολλά σήματα στην περιοχή των οξυγονωμένων ανθράκων. Επίσης, παρατηρήθηκε ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 174.1, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία ενός καρβοξυλικού οξέος στο μόριο, και ακόμη ένα σε δ 200.1, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.



Εικόνα 290. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **75** σε CDCl_3 .

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **75** (Εικ. 291) παρατηρήθηκαν παρόμοια σήματα με αυτά των μεταβολιτών **73** και **74** και συγκεκριμένα:

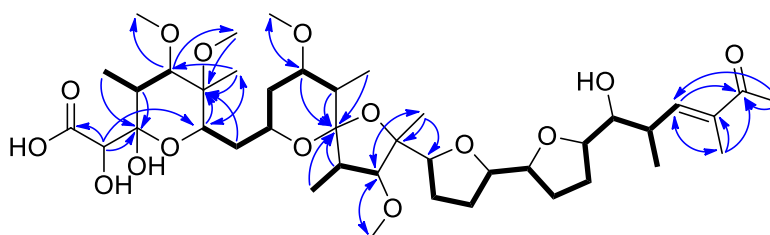
- Τέσσερις διπλές κορυφές σε δ 0.97, 1.02, 1.03 και 1.04, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τεσσάρων μεθυλίων σε τριτοταγή άτομα άνθρακα.
- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.12, 1.45, 1.76 και 2.27, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών και ενός βινυλικού μεθυλίου σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα, καθώς και ενός μεθυλίου μίας ακετοξυ-ομάδας.
- Τρεις απλές κορυφές σε δ 3.40, 3.35 και 3.54, οι οποίες ολοκλήρωναν για δώδεκα πρωτόνια συνολικά και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια μεθυλίων τεσσάρων μεθοξυ-ομάδων.
- Πολλά σήματα στην περιοχή των οξυγονωμένων μεθινίων.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 6.64, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο πρωτόνιο ενός ολεφινικού μεθινίου.



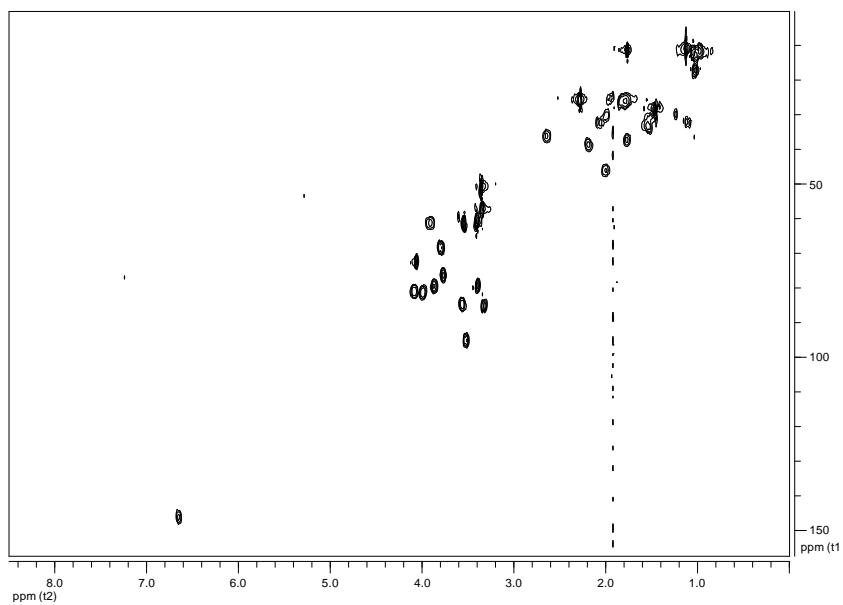
Εικόνα 291. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **75** σε CDCl_3 .

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του **75** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{15}$. Λαμβάνοντας υπόψη τον ένα διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα και τα δύο καρβονύλια ως τρεις από τους οκτώ βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να έχει πέντε δακτυλίους.

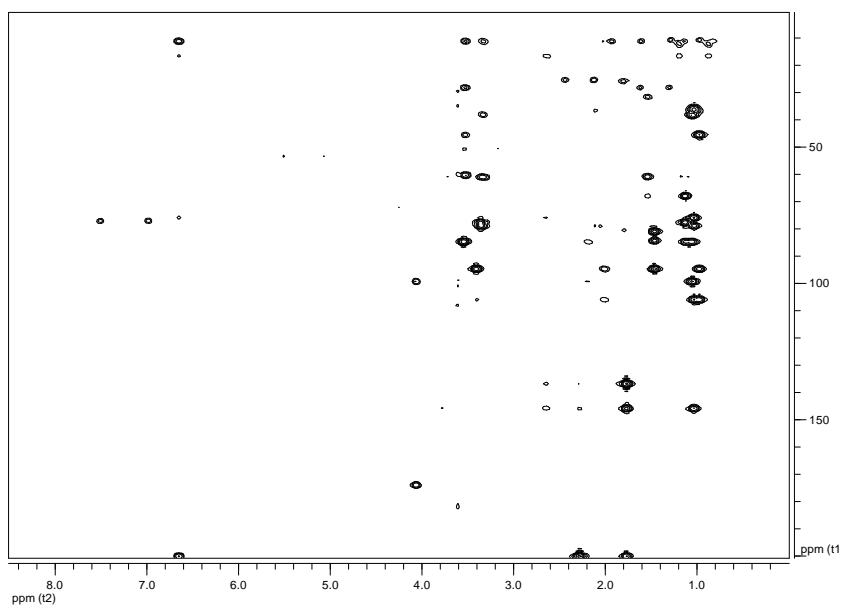
Η διδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **75** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 292) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 293), HMBC (Εικ. 294) και COSY (Εικ. 295). Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τα spin συστήματα, ενώ οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στη δομή του μεταβολίτη **75**.



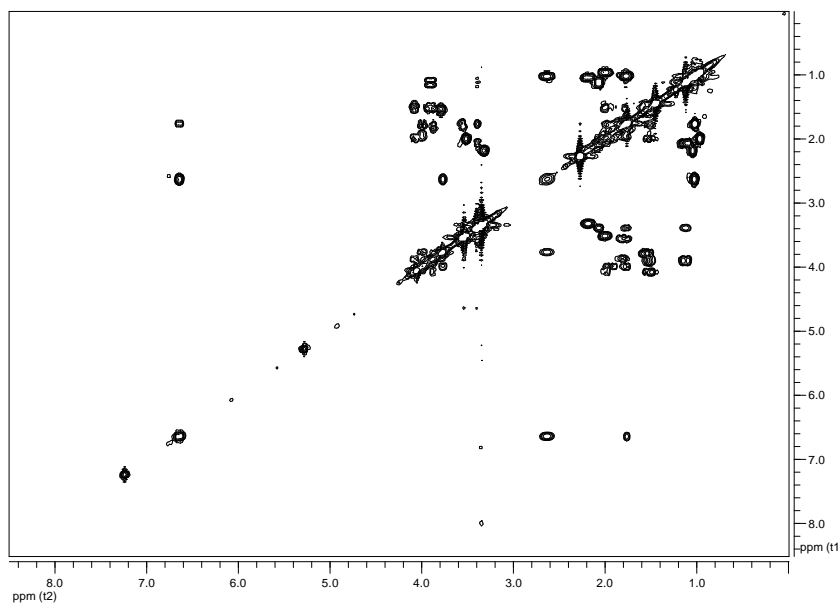
Εικόνα 292. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **75**.



Εικόνα 293. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **75** σε CDCl_3 .



Εικόνα 294. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **75** σε CDCl_3 .



Εικόνα 295. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **75** σε CDCl_3 .

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **75** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν αρεναρικό οξύ (arenaric acid), το οποίο έχει απομονωθεί από το στέλεχος *Streptomyces* sp. CNH-248 που καλλιεργήθηκε από θαλάσσιο ίζημα (Cheng et al., 1999) και έχει επιδείξει αντιβακτηριακή δράση έναντι διάφορων βακτηριακών στελεχών (Hoshi et al., 1997). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **75**, τα οποία παρουσιάζονται για πρώτη φορά καθώς στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί τα φασματοσκοπικά δεδομένα μόνο για το μετά Na^+ άλας, παρατίθενται στον Πίνακα 209.

Πίνακας 209. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **75** (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_c^a	δ_H^a
1	174.1	-
2	72.2	4.05 (s)
3	99.4	-
4	38.3	2.18 (dd, 11.4, 6.8)
5	84.9	3.32 (d, 11.4)
6	77.8	-
7	68.1	3.79 (dd, 11.2, 2.7)
8	33.0	1.53 (m)
9	61.0	3.92 (dd, 12.2, 4.5)
10	31.8	2.07 (d, 14.4), 1.10 (m)
11	79.1	3.39 (m)
12	37.0	1.77 (m)
13	106.1	-
14	45.7	1.99 (m)
15	94.9	3.51 (d, 9.9)
16	81.1	-
17	84.5	3.56 (m)
18	26.1	1.79 (m)
19	30.1	1.97 (m), 1.49 (m)
20	80.7	4.09 (m)
21	79.2	3.88 (m)
22	26.0	1.79 (m)
23	25.0	1.93 (m), 1.77 (m)
24	81.2	3.99 (m)
25	76.1	3.77 (dd, 6.6, 3.2)
26	35.9	2.63 (dp, 9.5, 6.6)
27	145.9	6.64 (dd, 9.5, 1.0)
28	137.0	-
29	200.1	-
30	25.5	2.27 (s)
4-Me	11.3	1.04 (d, 6.8)
5-OMe	61.1	3.54 (s)
6-Me	10.8	1.12 (s)
6-OMe	50.9	3.35 (s)
11-OMe	57.2	3.35 (s)
12-Me	12.8	1.02 (d, 7.3)
14-Me	11.8	0.97 (d, 7.3)
15-OMe	60.4	3.40 (s)
16-Me	28.3	1.45 (s)
26-Me	16.8	1.03 (d, 7.1)
28-Me	11.3	1.76 (s)

^a Σε CDCl₃.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, στόχος της οποίας ήταν η απομόνωση και ταυτοποίηση νέων φυσικών προϊόντων με βιολογική δράση, μελετήθηκε η χημική σύσταση των οργανικών εκχυλισμάτων τεσσάρων βακτηριακών στελεχών θαλάσσιας προέλευσης. Συγκεκριμένα, προς μελέτη επιλέχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Bacillus endophyticus* BI0327, *Streptomyces althioticus* BI0850, *Streptomyces smyrnaeus* BI0918 και *Bacillus subtilis* BI0980, τα οποία έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ιζήματα που συλλέχθηκαν στο Αιγαίο (Μήλος) και το Ιόνιο (Κεφαλονιά και Κέρκυρα) Πέλαγος, με βασικό κριτήριο επιλογής το ενδιαφέρον χημικό προφίλ τους κατά τον προκαταρκτικό έλεγχο των οργανικών εκχυλισμάτων τους σε μικρή κλίμακα με φασματοσκοπία ^1H NMR, καθώς και με υγρή χρωματογραφία (HPLC-PDA και LC-MS).

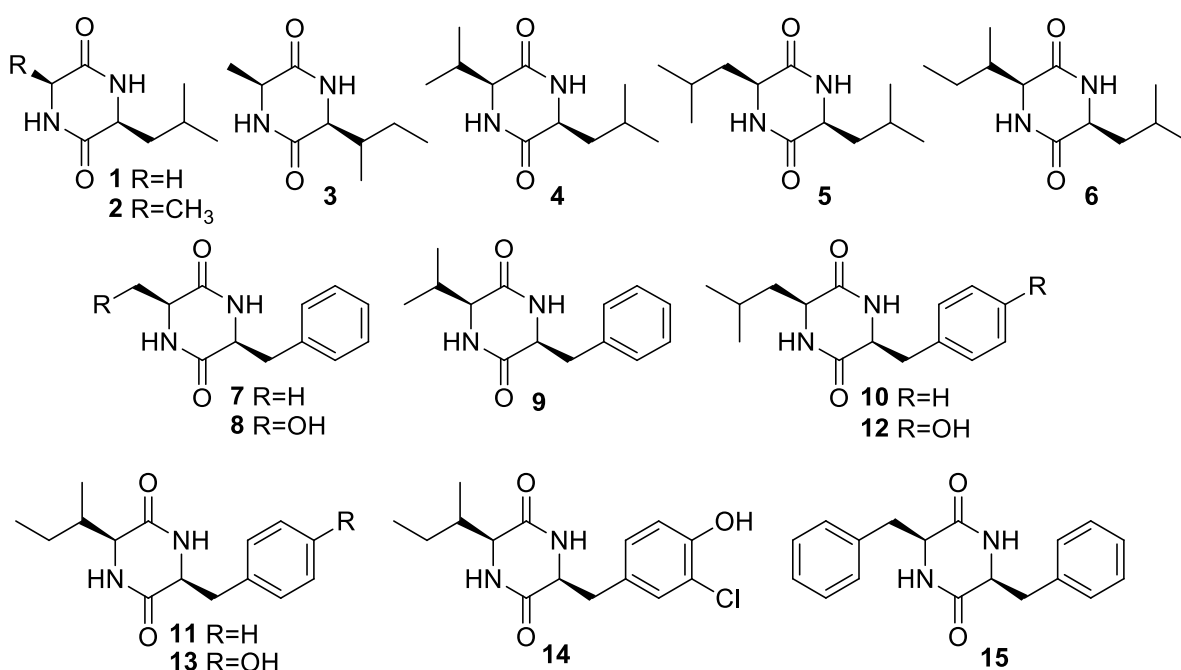
Από τα οργανικά εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν έπειτα από υγρή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα των επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών απομονώθηκαν κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών 78 διαφορετικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων μέχρι στιγμής ταυτοποιήθηκαν οι 75 (**1–75**) μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS. Εξ αυτών, 12 ήταν νέα φυσικά προϊόντα (**14, 30, 35-38, 55, 56, 64, 65** και **69**), ενώ 6 απομονώθηκαν για πρώτη φορά από φυσική πηγή (**29, 33, 34, 49, 67** και **70**). Πιο συγκεκριμένα:

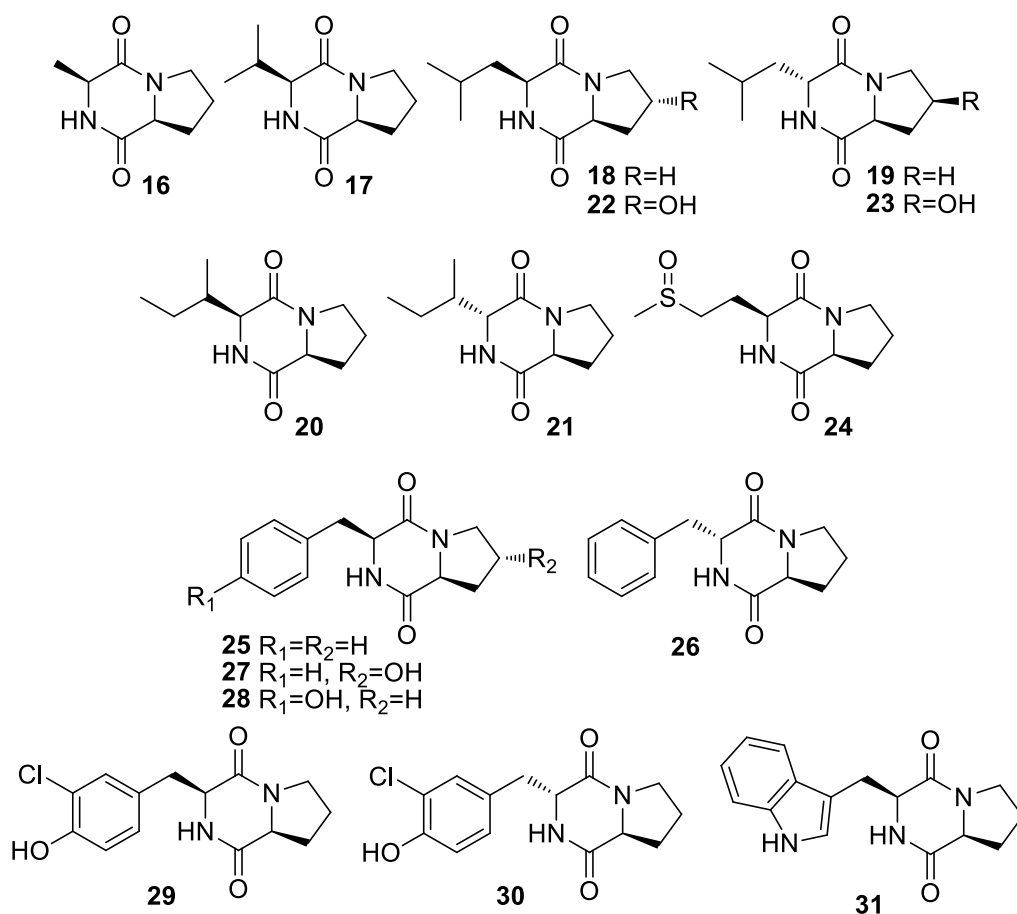
- από το βακτηριακό στέλεχος *B. endophyticus* BI0327 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 25 δευτερογενείς μεταβολίτες: (i) εννέα 2,5-δικετοπιπεραζίνες (2,5-DKPs) (**17-20, 22, 23, 25, 27** και **31**), (ii) τρία παράγωγα ινδολίου (**39, 40** και **43**), (iii) μία ναφθοκινόνη (**50**), (iv) δύο τριτερπένια (**71** και **72**), (v) οκτώ απλά αρωματικά παράγωγα (**53-58, 60** και **61**), εκ των οποίων δύο (**55** και **56**) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και (vi) δύο παράγωγα μεθακρυλικού οξέος (**68** και **70**), εκ των οποίων ένα (**70**) απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή.
- από το βακτηριακό στέλεχος *S. althioticus* BI0850 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 2 δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων μία 2,5-DKP (**18**) και μία απλή αζωτούχος ένωση (**48**).
- από το βακτηριακό στέλεχος *S. smyrnaeus* BI0918 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 44 δευτερογενείς μεταβολίτες: (i) εικοσιτέσσερις 2,5-DKPs (**1-7, 9-11, 13, 15-21, 24-26, 28, 30** και **31**), εκ των οποίων μία (**30**) αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, (ii) επτά παράγωγα βενζοδιαζεπινών (**32-38**), εκ των οποίων τέσσερα (**35, 36, 37** και **38**) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και δύο (**33** και **34**) απομονώθηκαν πρώτη φορά από φυσική πηγή, (iii)

ένα παράγωγο ινδολίου (**43**), (iv) δύο νουκλεοσιδικά παράγωγα (**45**, **46**), (v) δύο άλλες αζωτούχες ενώσεις (**47** και **49**), εκ των οποίων μία (**49**) απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή, (vi) μία απλή θειούχος ένωση (**51**), (vii) δύο παράγωγα βενζοϊκού οξέος (**58** και **59**), (viii) ένα απλό παράγωγο γλυκερόλης (**63**), (ix) ένα παράγωγο μεθακρυλικού οξέος (**69**), το οποίο αποτελεί νέο φυσικό προϊόν και (x) τρεις πολυαιθερικοί μεταβολίτες μεγάλου μοριακού βάρους (**73-75**).

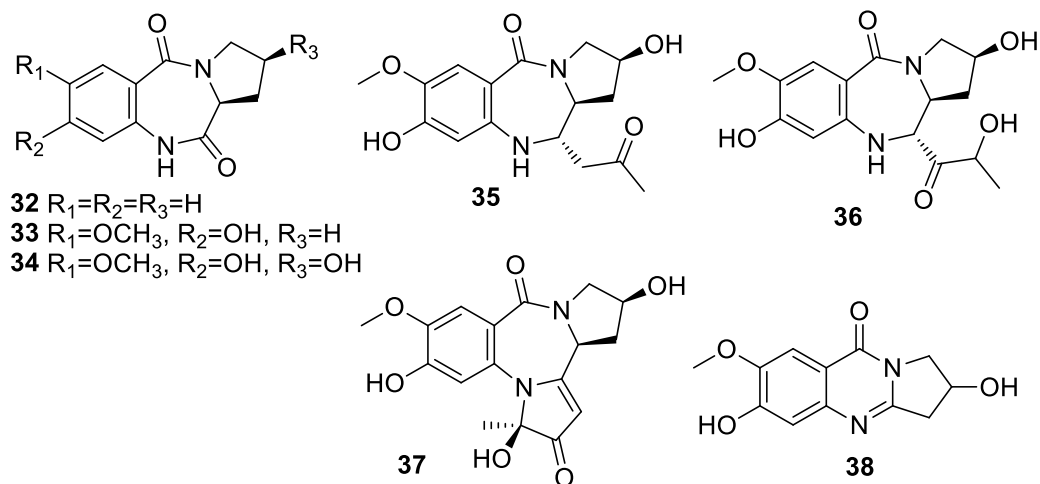
➤ από το βακτηριακό στέλεχος *B. subtilis* BI0980 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 34 δευτερογενείς μεταβολίτες: (i) δεκαεννέα 2,5-DKPs (**2-4**, **7-9**, **12**, **13**, **14**, **17-21**, **25**, **26** και **28-30**), εκ των οποίων δύο (**14** και **30**) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα και μία (**29**) απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή, (ii) τρία παράγωγα ινδολίου (**39**, **41** και **42**), (iii) ένα νουκλεοσιδικό παράγωγο (**44**), (iv) ένα φλαβονοειδές (**52**), (v) πέντε παράγωγα βενζοϊκού οξέος (**57**, **58** και **60-62**), (vi) δύο μονοτερπένια (**64** και **65**), τα οποία αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα, (vii) δύο φαινολικά παράγωγα με *tert* βουτυλομάδες (**66** και **67**), εκ των οποίων το **67** απομονώθηκε πρώτη φορά από φυσική πηγή και (viii) ένα παράγωγο μεθακρυλικού οξέος (**68**).

Οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν συνοψίζονται παρακάτω με βάση τη χημική τους δομή. Συνολικά απομονώθηκαν 31 2,5-DKPs (**1-31**), εκ των οποίων οι δεκαέξι (**16-31**) περιλαμβάνουν το αμινοξύ προλίνη που συναντάται με μεγαλύτερη συχνότητα στη φύση, ενώ οι δεκαπέντε (**7-15** και **25-31**) περιέχουν αρωματικά αμινοξέα. Ο μεταβολίτης **29** απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή και οι μεταβολίτες **14** και **30** αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

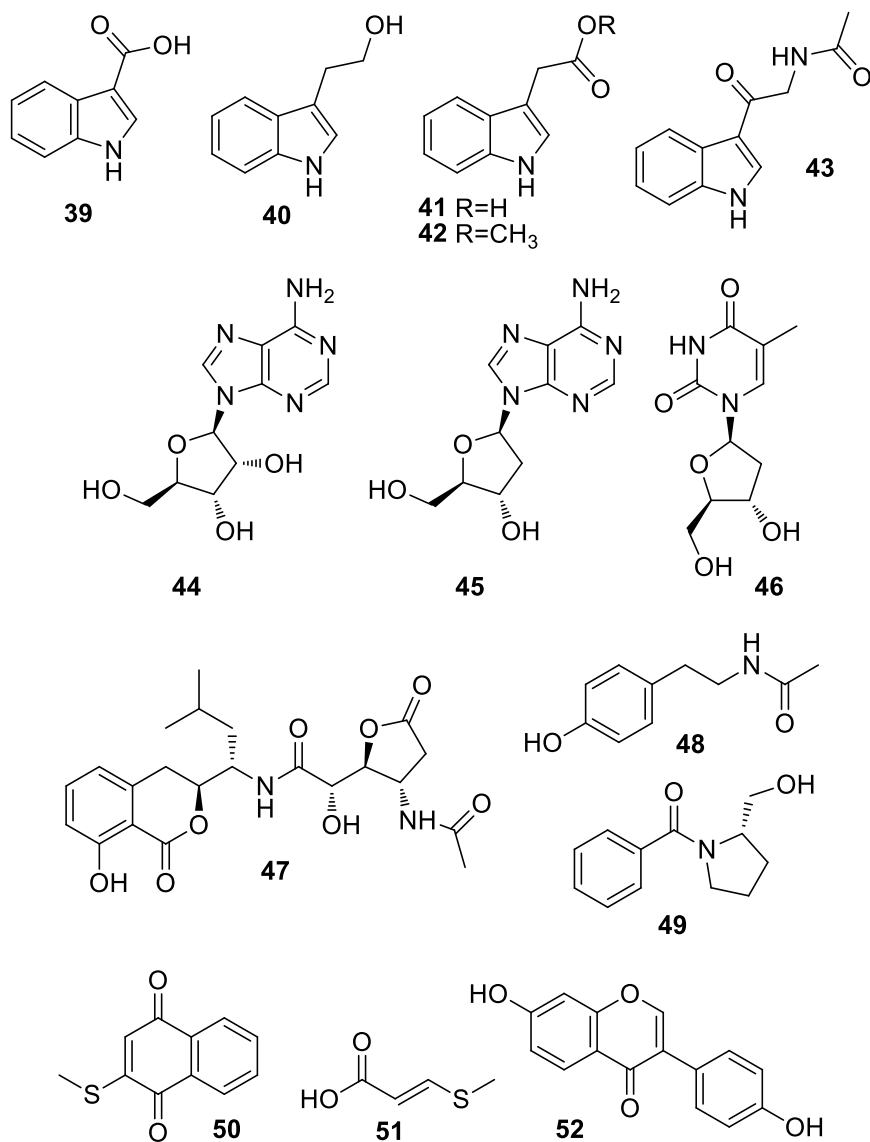




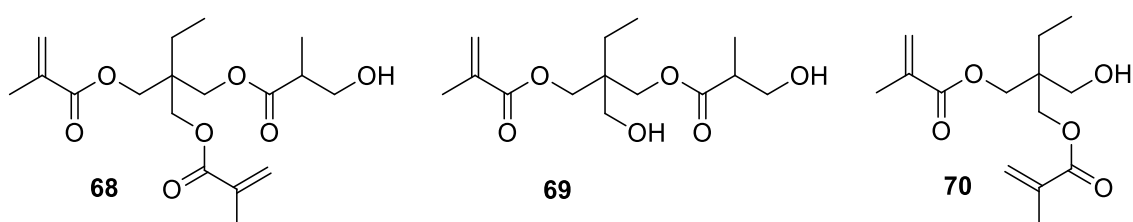
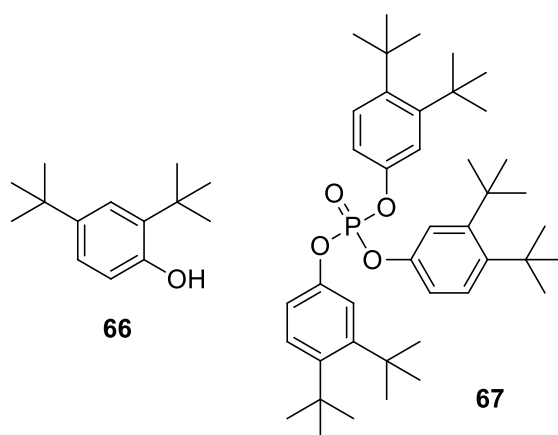
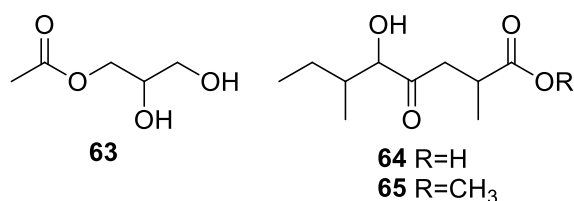
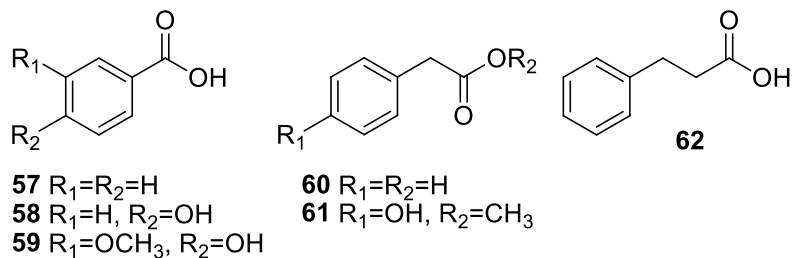
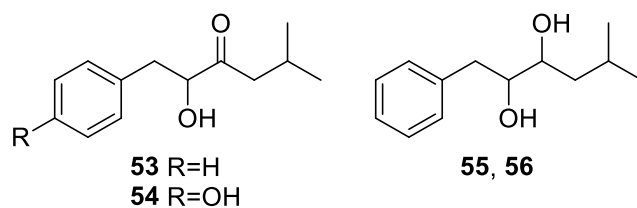
Οι μεταβολίτες **32-38** ανήκουν στην κατηγορία των βενζοδιαζεπινών που απαντώνται σε στελέχη του γένους *Streptomyces*. Δύο από αυτούς (**33** και **34**) απομονώνονται πρώτη φορά από φυσική πηγή, ενώ τέσσερις (**35-38**) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα. Εξ αυτών, ο μεταβολίτης **37** εμφανίζει πρωτότυπο ανθρακικό σκελετό.



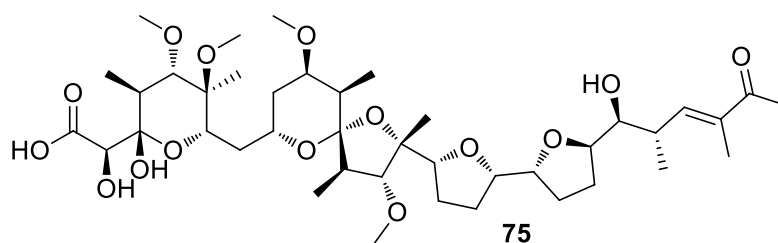
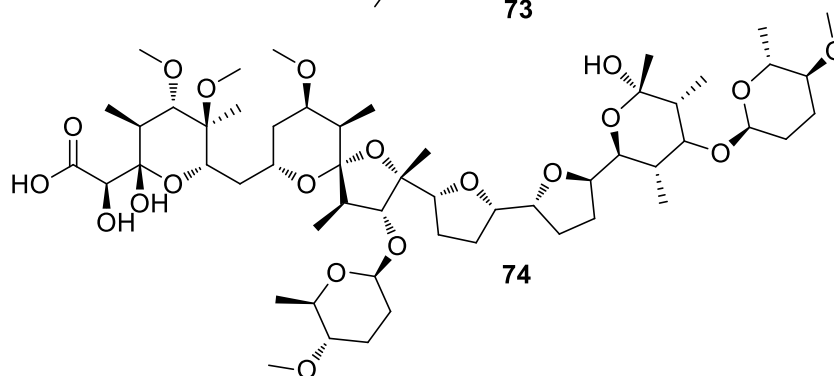
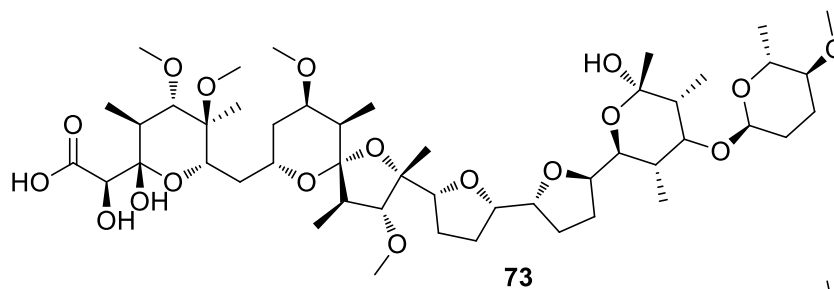
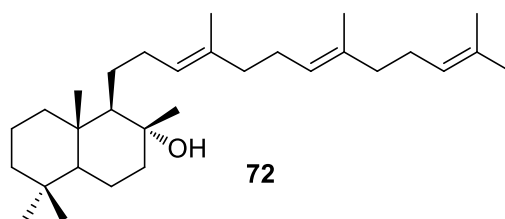
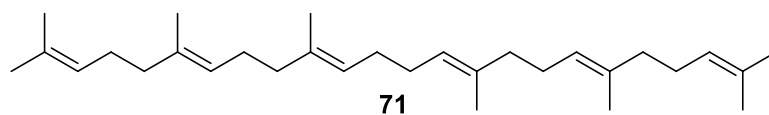
Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν πέντε παράγωγα ινδολίου (**39-43**), τρία νουκλεοσιδικά παράγωγα (**44-46**) και ακόμη τρεις αζωτούχες ενώσεις (**47-49**). Ο μεταβολίτης **49** απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν οι θειούχοι μεταβολίτες **50** και **51**, καθώς και το φλαβονοειδές **52**.



Οι μεταβολίτες **53-56** είναι απλά αρωματικά μόρια, ενώ οι δύο από αυτούς (**55** και **56**) είναι νέα φυσικά προϊόντα. Ακόμη, ταυτοποιήθηκαν έξι παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (**57-62**), ένα απλό παράγωγο γλυκερόλης (**63**) και δύο οξυγονωμένα μονοτερπένια (**64** και **65**), τα οποία είναι νέα φυσικά προϊόντα. Οι μεταβολίτες **66** και **67** είναι αρωματικές ενώσεις που περιέχουν *tert*-βουτύλομάδες, εκ των οποίων ο **67** απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή. Οι μεταβολίτες **68-70** είναι παράγωγα μεθακρυλικού οξέος, εκ των οποίων ο **69** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν και ο **70** απομονώνεται πρώτη φορά από φυσική πηγή.



Ακόμη, απομονώθηκαν δύο τριτερπένια, ένα γραμμικό (**71**) και ένα δικυκλικό (**72**). Τέλος, απομονώθηκαν τρεις πολυαιθερικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (**73-75**), των οποίων τα φασματοσκοπικά δεδομένα παρουσιάζονται για πρώτη φορά καθώς στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μόνο για τα μετά νατρίου άλατα τους.



Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί σε ικανές ποσότητες βρίσκεται επί του παρόντος σε εξέλιξη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adamczeski M., Quiñoà E., Crews P. Novel sponge-derived amino acids. 5. Structures, stereochemistry and synthesis of several new heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 647-654.
- Adamczeski M., Reed A.R., Crews P. New and known diketopiperazines from the caribbean sponge *Calyx* cf. *podatypa*. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 201-208.
- Arai Y., Hirohara M., Ageta H., Hsü H.Y. Fern constituents: two new triterpenoid alcohols with mono- and bi-cyclic skeletons, isolated from *Polypodiodes formosana*. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 1325-1328.
- Aronoff M.R., Bourjaily N.A., Miller K.A. Concise, protecting group free total syntheses of (+)-sattabacin and (+)-4-hydroxysattabacin. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 6375-6377.
- Bafor E.E., Lim C.V., Rowan E.G., Edrada-Ebel R. The leaves of *Ficus exasperata* Vahl (Moraceae) generates uterine active chemical constituents. *J. Ethnopharmacol.*, **2013**, 145, 803-812.
- Bai J., Liu D., Yu S., Proksch P., Lin W. Amicoumacins from the marine-derived bacterium *Bacillus* sp. with the inhibition of NO production. *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 55, 6286-6291.
- Barsby T., Kelly M.T., Andersen R.J. Tupuseleiamides and basiliskamides, new acyldipeptides and antifungal polyketides produced in culture by a *Bacillus laterosporus* isolate obtained from a tropical marine habitat. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1447-1451.
- Bister B., Bischoff D., Ströbele M., Riedlinger J., Reicke A., Wolter F., Bull A.T., Zähner H., Fiedler H.-P., Süßmuth R.D. Abyssomicin C - A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucospora* strain as an inhibitor of the *p*-aminobenzoic acid / tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 2574-2576.
- Bobylev M.M., Bobyleva L.I., Strobel G.A. Synthesis and bioactivity of analogs of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*). *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 3960-3964.
- de Boer J., Antelo A., van der Veen I., Brandsma S., Lammertse N. Tricresyl phosphate and the aerotoxic syndrome of flight crew members - Current gaps in knowledge. *Chemosphere*, **2015**, 119, S58-S61.
- Brandstatter M., Freis M., Huwyler N., Carreira E.M. Total synthesis of (-)-merochlorin A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58, 2490-2494.
- Brenner D.J., Staley J.T., Krieg N.R. Classification of procaryotic organisms and the concept

- of bacterial speciation. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, **2001**.
- Buchanan G.O., Williams P.G., Feling R.H., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2731-2734.
- Bugni T.S., Woolery M., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Bohemamines from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 1626-1628.
- Caballero E., Avendaño C., Menéndez J.C. Brief total synthesis of the cell cycle inhibitor tryptostatin B and related preparation of its alanine analogue. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 6944-6951.
- Cabrera G.M., Butler M., Rodriguez M.A., Godeas A., Haddad R., Eberlin M.N. A sorbicillinoid urea from an intertidal *Paecilomyces marquandii*. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 1806-1808.
- Cañedo L.M., Fernández Puentes J.L., Pérez Baz J. PM-94128, a new isocoumarin agent produced by a marine bacterium. *J. Antibiot.*, **1997**, 20, 175-176.
- Carlson J.C., Li S., Burr D.A., Sherman D.H. Isolation and characterization of tirandamycins from a marine-derived *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 2076-2079.
- Carroll A.R., Copp B.R., Davis R.A., Keyzers R.A., Prinsep M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2019**, 36, 122-173.
- Cerezo A.B., Hornedo-Ortega R., Álvarez-Fernández M.A., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. Inhibition of VEGF-induced VEGFR-2 activation and HUVEC migration by melatonin and other bioactive indolic compounds. *Nutrients*, **2017**, 9, 249.
- Chen H.C., Kao C.L., Chen C.T., Li H.T., Chen C.Y. Chemical constituents of the leaves of *Michelia figo*. *Chem. Nat. Comp.*, **2018**, 54, 407-410.
- Chen J.-H., Lan X.-P., Liu Y., Jia A.-Q. The effects of diketopiperazines from *Callyspongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A.1 macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012a**, 22, 3177-3180.
- Chen Y.-H., Lu M.-C., Chang Y.-C., Hwang T.-L., Wang W.-H., Weng C.-F., Kuo J., Sung P.-J. Pseudoalteromone A: a novel bioactive ubiquinone from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. CGH2XX (Pseudoalteromonaceae). *Tetrahedron Lett.*, **2012b**, 53, 1675-1677.
- Cheng X.C., Jensen P.R., Fenical W. Arenaric acid, a new pentacyclic polyether produced by a marine bacterium (Actinomycetales). *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 605-607.
- Cho J.Y., Kang J.Y., Hong Y.K., Baek H.H., Shin H.W., Kim M.S. Isolation and structural determination of the antifouling diketopiperazines from marine-derived *Streptomyces*

- praecox 291-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2012a**, 76, 1116-1121.
- Cho J.Y., Kim M.S. Induction of antifouling diterpene production by *Streptomyces cinnabarinus* PK209 in co-culture with marine-derived *Alteromonas* sp. KNS-16. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2012b**, 76, 1849-1854.
- Choi Y.-H., Inoue T., Fujioka S., Saimoto H., Sakurai A. Identification of brassinosteroid-like active substances in plant-cell cultures. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1993**, 57, 860-861.
- Ciuffreda P., Casati S., Manzocchi A. Complete ¹H and ¹³C spectral assignment of α - and β -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, 45, 781-784.
- Clark R.L., Carter K.C., Mullen A.B., Coxon G.D., Owusu-Dapaah G., McFarlane E., Thi M.D.D., Grant M.H., Tettey J.N.A., Mackay S.P. Identification of the benzodiazepines as a new class of antileishmanial agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 624-627.
- Cordell G.A., Shin Y.G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. *Pure. Appl. Chem.*, **1999**, 71, 1089-1094.
- Cronan J.M.Jr., Davidson T.R., Singleton F.L., Colwell R.R., Cardellina J.H.II. Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp. *Nat. Prod. Lett.*, **1998**, 11, 271-278.
- Dalisay D.S., Molinski T.F. Structure elucidation at the nanomole scale. 3. Phorbasides G-I from *Phorbasp* sp. *J. Nat. Prod.*, 2010, 73, 679-682.
- Dančik 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. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 9259-9261.
- Devi P., Wahidullah S., Rodrigues C., Souza L.D. The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 1203-1212.
- Dharni S., Sanchita, Maurya A., Samad A., Srivastava S.K., Sharma A., Patra D.D. Purification, characterization and *in vitro* activity of 2,4-di-*tert*-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PSF84: conformational and molecular docking studies. *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62, 6138-6146.
- D'Incalci M., Galmarini C.M. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.*, **2010**, 9, 2157-2163.
- Dias D.A., Urban S., Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2012**, 2, 303-336.
- Ding H., Zhang D., Zhou B., Ma Z. Inhibitors of BRD4 protein from a marine-derived fungus *Alternaria* sp. NH-F6. *Mar. Drugs*, **2017**, 15, 76.

- Ding L., Pfoh R., Rühl S., Qin S., Laatsch H. T-muurolol sesquiterpenes from the marine *Streptomyces* sp. M491 and revision of the configuration of previously reported amorphanes. *J. Nat. Prod.*, **2009a**, 72, 99-101.
- Ding Z.-G., Zhao J.-Y., Yang P.-W., Li M.-G., Huang R., Cui X.-L., Wen M.-L. ¹H and ¹³C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp. nov (YIM 30243^T). *Magn. Reson. Chem.*, **2009b**, 366-370.
- Donlan R.M. Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, **2001**, 7, 277-281.
- Evidente A., Andolfi A., Maddau L., Franceschini A., Marras F. Biscoppyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 568-571.
- Faulkner D.J. Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **2000**, 77, 135-145.
- Fdhila F., Vásquez V., Sánchez J.L., Riguera R. DD-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1299-1301.
- 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). *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 2175-2180.
- Furukawa T., Akutagawa T., Funatani H., Uchida T., Hotta Y., Niwa M., Takaya Y. Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 20, 2002-2009.
- Gerwick W.H., Fenner A.M. Drug discovery from marine microbes. *Microb Ecol.*, **2013**, 65, 800-806.
- 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.
- Ghosh S.C., Li C.C., Zeng H.C., Ngiam J.S.Y., Seayad A.M., Chen A. Mesoporous niobium oxide spheres as an effective catalyst for the transamidation of primary amides with amines. *Adv. Synth. Catal.*, **2014**, 356, 475-484.
- Gorajana A., Kurada B.V.V.S.N., Peela S., Jangam P., Vinjamuri S., Poluri E., Zeck A. 1-hydroxy-1-norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN₁/7. *J. Antibiot.*, **2005**, 58, 526-529.
- Guo C.-J., Yeh H.-H., Chiang Y.-M., Sanchez J.F., Chang S.-L., Bruno K.S., Wang C.C.C. Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 7205-7213.

- Guo J., Jing X., Peng W.-L., Nie Q., Zhai Y., Shao Z., Zheng L., Cai M., Li G., Zuo H., Zhang Z., Wang R.-R., Huang D., Cheng W., Yu Z., Chen L.-L., Zhang J. Comparative genomic and functional analyses: unearthing the diversity and specificity of nematocidal factors in *Pseudomonas putida* strain 1A00316. *Scientific Rep.*, **2016**, 6, 29211.
- Han X., Hu L., Hou J., Zhang Y., Li H., Li W. Heterologous expression of a VioA variant activates cryptic compounds in a marine-derived *Brevibacterium* strain. *Mar. Drugs*, **2018**, 16, 191.
- Hawas U.W., Shaaban M., Shaaban K.A., Speitling M., Maier A., Kelter G., Fiebig H.H., Meiners M., Helmke E., Laatsch H. Mansouramycins A-D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine streptomycete. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 2120-2124.
- Hayakawa Y., Shirasaki S., Shiba S., Kawasaki T., Matsuo Y., Adachi K., Shizuri Y. Piericidins C₇ and C₈, new cytotoxic antibiotics produced by a marine *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, **2007a**, 60, 196-200.
- Hayakawa Y., Shirasaki S., Kawasaki T., Matsuo Y., Adachi K., Shizuri Y. Structures of new cytotoxic antibiotics, piericidins C₇ and C₈. *J. Antibiot.*, **2007b**, 60, 201-203.
- He J., Fan P., Feng S., Shao P., Sun P. Isolation and purification of two isoflavones from *Heracium erinaceum* mycelium by high-speed counter-current chromatography. *Molecules*, **2018**, 23, 560.
- He R., Wang B., Wakimoto T., Wang M., Zhu L., Abe I. Cyclodipeptides from metagenomic library of a japanese marine sponge. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2013**, 24, 1926-1932.
- Hochlowski J.E., Andres W.W., Theriault R.J., Jackson M., McAlpine J.B. Abbeymycin, a new anthramycin-type antibiotic produced by a streptomycete. *J. Antibiot.*, **1987**, 40, 145-148.
- Hoshi M., Endo T. Microbial and chemical conversion of antibiotic K41. II. Preparation of K41-DA1, -DA2 and -DA3, deamicetosyl derivatives of antibiotic K41. *J. Antibiot.*, **2000**, 53, 1154-1157.
- Hoshi M., Shimotohno K.W., Endo T., Furihata K., Seto H. Microbial and chemical conversion of antibiotic K41. I. Isolation and identification of conversion product. *J. Antibiot.*, **1997**, 50, 631-634.
- 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.
- Hu Y., MacMillan J. B. Erythrazoles A-B, cytotoxic benzothiazoles from a marine-derived *Erythrobacter* sp. *Org. Lett.*, **2011**, 13, 6580-6583.
- Huang R., Yan T., Peng Y., Zhou X., Yang X., Liu Y. Diketopiperazines from the marine

- sponge *Axinella* sp. *Chem. Nat. Comp.*, **2014**, 50, 191-193.
- Huang R., Zhou X., Peng Y., Yang X., Xu T., Liu Y. Nucleosides from the marine sponge *Callyspongia* sp. *Chem. Nat. Comp.*, **2011**, 46, 1010-1011.
- Huang S.-X., Powell E., Rajski S.R., Zhao L.-X., Jiang C.L., Duan Y., Xu W., Shen B. Discovery and total synthesis of a new estrogen receptor heterodimerizing actinopolymorphol A from *Actinopolymorpha rutilus*. *Org. Lett.*, **2010**, 12, 3525-3527.
- Hughes C.C., Prieto-Davo A., Jensen P.R., Fenical W. The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. *Org. Lett.*, **2008**, 10, 629-631.
- Hughes C.C., MacMillan J.B., Gaudêncio S.P., Jensen P.R., Fenical W. The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine-derived *Streptomyces* species. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009a**, 48, 725-727.
- Hughes C.C., MacMillan J.B., Gaudêncio S.P., Fenical W., La Clair J.J. Ammosamides A and B target myosin. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009b**, 48, 728-732.
- Iakovou K., Varvaresou A., Kourounakis A.P., Stead K., Sugden D., Tsoininis A. Design, synthesis and biological evaluation of novel β -substituted indol-3-yl ethylamido melatoninergic analogues. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2002**, 54, 147-156.
- Iimura K., Furukawa T., Yamamoto T., Negishi L., Suzuki M., Sakuda S. The mode of action of cyclo(L-Ala-L-Pro) in inhibiting aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Toxins*, **2017**, 9, 219.
- Imamura N., Nishijima M., Takadera T., Adachi K., Sakai M., Sano H. New anticancer antibiotics pelagiomicins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*. *J. Antibiot.*, **1997**, 50, 8-12.
- Inagaki S., Morimura S., Gondo K., Tang Y., Akutagawa H., Kida K. Isolation of tryptophol as an apoptosis-inducing component of vinegar produced from boiled extract of black soybean in human monoblastic leukemia U937 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2007**, 71, 371-379.
- Inoue K., Nagano S. **2003**. Adamantane derivatives and processes for the preparation thereof. US Patent 6,670,499 B1.
- Isaka M., Palasarn S., Rachtawee P., Vimuttipong S., Kongsaree P. Unique diketopiperazine dimers from the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2257-2260.
- Itoh T., Kinoshita M., Aoki S., Kobayashi M. Komodoquinone A, a novel neuritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J. Nat. Prod.*, **2003a**, 66, 1373-1377.
- Itoh T., Kinoshita M., Wei H., Kobayashi M. Stereostructure of komodoquinone A, a

- neuritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *Chem. Pharm. Bull.*, **2003b**, 51, 1402-1404.
- 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.
- Jiménez C. Marine natural products in medicinal chemistry. *Med. Chem. Lett.*, **2018**, 9, 959-961.
- Jin X., Sun J., Yu B., Wang Y., Sun W.J., Yang J., Huang S.H., Xie W.L. Daidzein stimulates osteogenesis facilitating proliferation, differentiation and antiapoptosis in human osteoblast-like MG-63 cells via estrogen receptor-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation. *Nutrition Res.*, **2017**, 42, 20-30.
- Jones L.H., Abdalla D.S.P., Freitas J.C. Effects of indole-3-acetic acid on croton oil- and arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Inflamm. Res.*, **1995**, 44, 372-375.
- Kamal A., Markandeya N., Shankaraiah N., Reddy C.R., Prabhakar S., Reddy C.S., Eberlin M.N., Santos L.S. Chemoselective aromatic azido reduction with concomitant aliphatic azide employing Al/Gd triflates/Nal and ESI-MS mechanistic studies. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 7215-7224.
- Kamal A., Narayan Reddy B.S., Suresh Kumar Reddy G. Microwave assisted synthesis of pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-5,11-diones. *Synlett*, **1999**, 8, 1251-1252.
- Kamal A., Shankaraiah N., Laxma Reddy K., Devaiah V. Selective reduction of aromatic azides in solution/solid-phase and resin cleavage by employing BF₃·OEt₂SH. Preparation of DC-81. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 4253-4257.
- Kamitori Y., Hojo M., Masuda R., Izumi T., Tsukamoto S. Silica gel as an effective catalyst for the alkylation of phenols and some heterocyclic aromatic compounds. *J. Org. Chem.*, **1984**, 49, 4161-4165.
- Kaneko T., Wong H., Doyle T.W., Rose W.C., Brander W.T. Bicyclic and tricyclic analogues of antramycin. *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 388-392.
- Kang H., Ku S.-K., Choi H., Bae J.-S. Three diketopiperazines from marine-derived bacteria inhibit LPS-induced endothelial inflammatory responses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26, 1873-1876.
- Kang H.K., Choi M.-C., Seo C.H., Park Y. Therapeutic properties and biological benefits of marine-derived anticancer peptides. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018a**, 19, 919.
- Kang U., Ryu S.M., Lee D., Seo E.K. Chemical constituents of the leaves of *Brassica oleracea* var. acephala. *Chem. Nat. Comp.*, **2018b**, 54, 1023-1026.
- Kang Y.-F., Liu C.-M., Kao C.-L., Chen C.-Y. Antioxidant and anticancer constituents from the

- leaves of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules*, **2014**, *19*, 4235-4245.
- Kaysser L., Bernhart P., Nam S.-J., Loesgen S., Ruby J.G., Skewes-Cox P., Jensen P.R., Fenical W., Moore B.S. Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 11988-11991.
- Khan R., Basha A., Ragavendra G., Rao P.C., Tanemura Y., Fujimoto Y., Begum A.S. Attenuation of TNF- α secretion by L-proline-based cyclic dipeptides produced by culture broth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *24*, 5756-5761.
- Kim C.R., Choi S.J., Kim J.K., Park C.K., Gim M.C., Kim Y.-J., Park G.G., Shin D.-H. 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol from *Cinnamomum loureirii* improves cognitive deficit, cholinergic dysfunction and oxidative damage in TMT-treated mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **2017a**, *40*, 932-935.
- Kim K., Leutou A.S., Jeong H., Kim D., Seong C.N., Nam S.-J., Lim K.-M. Anti-pigmentary effect of (-)-4-hydroxysattabacin from the marine-derived bacterium *Bacillus* sp. *Mar. Drugs*, **2017b**, *15*, 138.
- Kong D.-X., Jiang Y.-Y., Zhang H.-Y. Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. *Drug Discovery Today*, **2010**, *15*, 884-886.
- Kosalec I., Šafranić A., Pepelnjank S., Bačun-Družina V., Ramic S., Kopjar N. Genotoxicity of tryptophol in a battery of short-term assays on human white blood cells *in vitro*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2008**, *102*, 443-452.
- Kumar N., Mohandas C., Nambisan B., Kumar D.R.S., Lankalapalli R.S. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, *29*, 355-364.
- Kumar N., Mohandas C., Nambisan B. Purification, structural elucidation and bioactivity of tryptophan containing diketopiperazines, from *Comamonas testosteroni* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major-human-pathogenic bacteria. *Peptides*, **2014a**, *53*, 48-58.
- Kumar S.N., Mohandas C., Siji J.V., Rajasekharan K.N., Nambisan B. Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi. *J. Appl. Microbiol.*, **2012**, *113*, 914-924.
- Kumar S.N., Nambisan B., Mohandas C. Purification and identification of two antifungal cyclic dipeptides from *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with a rhabditid

- entomopathogenic nematode especially against *Fusarium oxysporum*. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **2014b**, 29, 190-197.
- Kumiko M.-S., Furukawa T., Akutagawa T., Hasada K., Mizutani H., Sugimoto Y., Yamada J., Niwa M., Hotta Y., Takaya Y. Protective effects of cyclo(L-Leu-L-Tyr) against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. *Biol. Pharm. Bull.*, **2011**, 34, 335-342.
- Lampis G., Deidda D., Maullu C., Madeddu M.A., Pompei R. Monache F.D., Satta G. Sattabacins and sattazolins: new biologically active compounds with antiviral properties extracted from a *Bacillus* sp. *J. Antibiot.*, **1995**, 48, 967-972.
- Lapage S.P., Sneath P.H.A., Lessel E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R., Clark W.A. Revision of: *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990*. ASM Press, Washington (DC), **1992**.
- Laville R., Nguyen T.B., Moriou C., Petek S., Debitus C., Al-Mourabit A. Marine natural occurring 2,5-diketopiperazines: isolation, synthesis and optical properties. *Heterocycles*, **2015**, 90, 1351-1366.
- Lee K., Cho S.H., Lee J.H., Goo J., Lee S.Y., Boovanahalli S.K., Yeo S.K., Lee S.-J., Kim Y.K., Kim D.H., Choi Y., Song G.-Y. Synthesis of a novel series of 2-alkylthio substituted naphthoquinones as a potent acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 62, 515-525.
- Lee W., Kim M.-A., Park I., Hwang J.S., Na M., Bae J.-S. Novel direct factor Xa inhibitory compounds from *Tenebrio molitor* with anti-platelet aggregation activity. *Food Chem. Toxic.*, **2017**, 109, 19-27.
- Li S.-Q., Yang Y.-B., Yang X.-Q., Jiang Y., Li Z.-J., Li X.-Z., Chen X., Li Q.-L., Qin S.-H., Ding Z.-T. Two new cyclic tetrapeptides of *Streptomyces rutgersensis* T009 isolated from *Elaphodus davidianus* excrement. *Helv. Chim. Acta*, **2016a**, 99, 210-214.
- Li X., Dobretsov S., Xu Y., Xiao X., Hung O.S., Qian P.-Y. Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*. *Biofouling*, **2006**, 22, 187-194.
- Li X., Yu T.-K., Kwak J.H., Son B.-Y., Seo Y., Zee O.-P., Ahn J.-W. Soraphinol C, a new free-radical scavenger from *Sorangium cellulosum*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, 18, 520-522.
- Li Y., Yan L., Liu K., Wang J., Wang A., Bai S., Yan X. Solvothermally mediated self-assembly of ultralong peptide nanobelts capable of optical waveguiding. *Small*, **2016b**, 12, 2575-2579.
- Lin C.-K., Wang Y.-T., Hung E.M., Yang Y.-L., Lee J.-C., Sheu J.-H., Liaw C.-C. Butyrolactones

- and diketopiperazines from marine microbes: inhibition effects on dengue virus type 2 replication. *Planta Med.*, **2017**, 83, 158-163.
- Lin Z., Antemano R.R., Huguen R.W., Tianero Ma.D.B., Peraud O., Haygood M.G., Concepcion G.P., Olivera B.M., Light A., Schmidt E.W. Pulicatins A-E, neuroactive thiazoline metabolites from cone snail-associated bacteria. *J. Nat. Prod.*, **2010**, 73, 1922-1926.
- Lin Z., Marett L., Huguen R.W., Flores M., Forteza I., Ammon M.A., Concepcion G.P., Espino S., Olivera B.M., Rosenberg G., Haygood M.G., Light A.R., Schmidt E.W. Neuroactive diol and acylolin metabolites from cone snail-associated bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 4867-4869.
- Lindequist U. Marine-derived pharmaceuticals - challenges and opportunities. *Biomol. Ther.*, **2016**, 24, 561-571.
- Ludwig W., Klenk H.-P. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, **2001**.
- Mabanglo M.F., Xiang D.F., Bigley A.N., Raushel F.M. Structure of a novel phosphotriesterase from *Sphingobium* sp. TCM1: a familiar binuclear metal center embedded in a seven-bladed β -propeller protein fold. *Biochemistry*, **2016**, 55, 3963-3974.
- Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock: Βιολογία των Μικροοργανισμών (Τόμος I), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, **2010**.
- Maity A., Hyun S.-M., Wortman A.K., Powers D.C. Oxidation catalysis by an aerobically generated Dess-Martin periodinane analogue. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 7205-7209.
- Manam R.R., Teisan S., White D.J., Nicholson B., Grodberg J., Neuteboom S.T.C., Lam K.S., Mosca D.A., Lloyd G.K., Potts B.C.M. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro- β -lactone- γ -lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 240-243.
- Mancha S.R., Regnery C.M., Dahkle J.R., Miller K.A., Blake D.J. Antiviral activity of (+)-sattabacin against varicella zoster. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 562-564.
- Mangamuri U.K., Muvva V., Poda S., Chitturi B., Yenamandra V. Bioactive natural products from *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. *J. Gen. Engineer. Biotechnol.*, **2016a**, 14, 261-267.
- Mangamuri U.K., Vijayalakshmi M., Poda S., Manavathi B., Chitturi B., Yenamandra V. Isolation and biological evaluation of *N*-(4-aminocyclooctyl)-3,5-dinitrobenzamide, a

- new semisynthetic derivative from the mangrove-associated actinomycete *Pseudonocardia endophytica* VUK-10. *Biotech*, **2016b**, 6, 158.
- MarinLit. A database of the marine natural products literature. Available online: <http://pubs.rsc.org/marinlit/> (πρόσβαση 1/9/2019)
- Martínez-Luis S., Gómez J.F., Spadafora C., Guzmán H.M., Gutiérrez M. Antitrypanosomal alkaloids from the marine bacterium *Bacillus pumilus*. *Molecules*, **2012**, 117, 11146-11155.
- 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.
- Mayer A.M.S., Rodríguez A.D., Tagliatalata-Scafati O., Fusetani N. Marine pharmacology in 2012-2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. Drugs*, **2017**, 15, 273.
- Mukku V.J.R.V., Speitling M., Laatsch H., Helmke E. New butenolides from two marine Streptomycetes. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1570-1572.
- Munro M.H.G., Blunt J.W., Dumdei E.J., Hickford S.J.H., Lill R.E., Li S., Battershill C.N., Duckworth A.R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.*, **1999**, 70, 15-25.
- Nagai K., Kamigiri K., Arao N., Suzumura K.-I., Kawano Y., Yamaoka M., Zhang H., Watanabe M., Suzuki K. YM-266183 and YM-266184, novel thiopeptide antibiotics produced by *Bacillus cereus* isolated from a marine sponge. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological properties. *J. Antibiot.*, **2003**, 56, 123-128.
- Nalli Y., Gupta S., Khajuria V., Singh V.P., Sajgotra M., Ahmed Z., Thakur N.L., Ali A. TNF- α and IL-6 inhibitory effects of cyclic dipeptides isolated from marine bacteria *Streptomyces* sp. *Med. Chem. Res.*, **2017**, 26, 93-100.
- Natakani S., Yamamoto Y., Hayashi M., Komiyama K., Ishibashi M. Cycloanthranilylproline-derived constituents from a myxomycete *Fuligo candida*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52, 368-370.
- Newman D.J., Gragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 629-661.
- Noël A., Ferron S., Rouaud I., Gouault N., Hurvois J.-P., Tomasi S. Isolation and structure identification of novel brominated diketopiperazines from *Nocardia ignorata* - a lichen-associated actinobacterium. *Molecules*, **2017**, 22, 371.

- Obata H., Kawahara H., Sugiyama A. Microbial transformation of carbazole to indole-3-acetic acid by *Flavobacterium* sp. OCM-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1997**, 61, 525-526.
- Occolowitz J.L., Dorman D.E., Hamill R.L. Structure of the polyether antibiotic K-41 by mass and nuclear magnetic resonance spectrometry. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1978**, 683-684.
- Oliveira C.M., Silva G.H., Regasini L.O., Zanardi L.M., Evangelista A.H., Young M.C.M., Bolzani V.S., Araujo A.R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). *Z. Naturforsch.*, **2009**, 64c, 824-830.
- Ómarsdóttir S., Wang X., Liu H.-B., Duggan B.M., Molinski T.F. Lepadins I-K, 3-O-(3'-methylthio)acryloyloxy-decahydroquinoline esters from a bahamian ascidian *Didemnum* sp. Assignment of absolute stereostructures. *J. Org. Chem.*, **2018**, 83, 13670-13677.
- Otoguro K., Ishiyama A., Ui H., Kobayashi M., Manabe C., Yan G., Takahashi Y., Tanaka H., Yamada H., Ōmura S. *In Vitro* and *in vivo* antimalarial activities of the monoglycoside polyether antibiotic K-41 against drug resistant strains of *Plasmodia*. *J. Antibiot.*, **2002**, 55, 832-834.
- Pangestuti R., Kim S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. Function. Food*, **2011**, 3, 255-266.
- Park H.B., Perez C.E., Perry E.K., Crawford J.M. Activating and attenuating the aminocoumarin antibiotics. *Molecules*, **2016**, 21, 824.
- Park J.-S., Kagaya N., Hashimoto J., Izumikawa M., Yabe S., Shin-ya K., Nishiyama M., Kuzuyama T. Identification and biosynthesis of new acylolins from the thermophilic bacterium *Thermosporothrix hazakensis* SK20-1^T. *Chem. Bio. Chem.*, **2014**, 15, 527-532.
- Parrot D., Legrave N., Intertaglia L., Rouaud I., Legembre P., Grube M., Suzuki M.T., Tomasi S. Cyaneodimycin, a bioactive compound isolated from the culture of *Streptomyces cyaneofuscatus* associated with *Lichina confinis*. *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 3977-3982.
- Penesyan A., Kjelleberg S., Egan S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 438-459.
- Pérez-Picaso L., Olivo H.F., Argotte-Ramos R., Rodríguez-Gutiérrez M., Rios M.Y. Linear and cyclic dipeptides with antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 7048-7051.
- Pieters L.A.C., van Zoelen A.M., Vrieling K., Vlietinck A.J. Determination of the pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, **1989**, 27, 754-759.

- Pogliani L., Ceruti M., Ricchiardi G., Viterbo D. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chem. Phys. Lip.*, **1994**, 70, 21-34.
- Pratt A.J., Rendle P.M., Steel P.J. Anticancer prodrug studies: Diels-Alder chemistry of 1-methylthio-1-(*p*-tolylsulfonyl)ethene. *Aust. J. Chem.*, **2011**, 64, 945-950.
- Riedlinger J., Reicke A., Zähler H., Krismer B., Bull A.T., Maldonado L.A., Ward A.C., Goodfellow M., Bister B., Bischoff D., Süßmuth R.S., Fiedler H.-P. Abyssomicins, inhibitors of the *para*-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.*, **2004**, 57, 271-279.
- Romano G., Costantini M., Sansone C., Lauritano C., Ruocco N., Ianora A. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res.*, **2017**, 128, 58-69.
- Rupesh K.R., Moushumi Priya A., Prashanth K., Jayachandran S. Inhibitory effects of bioactive leads isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PS3 and *Pseudomonas fluorescens* PS7 on MAP kinases and down regulation of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) and mediators (NO, iNOS and COX). *Toxicol InVitro*, **2012**, 26, 571-578.
- Saha M., Jaisankar P., Das S., Sarkar K.K., Roy S., Besra S.E., Vedasiromani J.R., Ghosh D., Sana B., Mukherjee J. Production and purification of a bioactive substance inhibiting multiple drug resistant bacteria and human leukemia cells from a salt-tolerant marine *Actinobacterium* sp. isolated from the Bay of Bengal. *Biotechnol. Lett.*, **2006**, 28, 1083-1088.
- Satheesh S., Ba-akdah M.A., Al-Sofyani A.A. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms—A review. *Electron. J. Biotechnol.*, **2016**, 21, 26-35.
- Sato S., Iwata F., Yamada S., Kawahara H., Katayama M. Usabamycins A-C: new anthramycin-type analogues from a marine-derived actinomycete. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011a**, 21, 7099-7101.
- Sato T., Hoshino H., Yoshida S., Nakajima M., Hoshino T. Bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase: tetraprenyl- β -curcumene cyclase is also squalene cyclase in *Bacillus megaterium*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011b**, 133, 17540-17543.
- Satoh K., Nonaka R., Ohyama K.-I., Nagai F., Ogata A., Iida M. Endocrine disruptive effects of chemicals eluted from nitrile-butadiene rubber gloves using reporter gene assay systems. *Biol. Pharm. Bull.*, **2008**, 31, 375-379.
- Shaaban K.A., Saunders M.A., Zhang Y., Tran T., Elshahawi S.I., Ponomareva L.V., Wang X., Zhang J., Copley G.C., Sunkara M., Kharel M.K., Morris A.J., Hower J.C., Trembley M.S., Prendergast M.A., Thorson J.S. Spoxazomicin D and oxachelin C, potent

- neuroprotective carboxamides from the appalachian coal fire-associated isolate *Streptomyces* sp. RM-14-6. *J. Nat. Prod.*, **2017**, 80, 2-11.
- Shigemori H., Tenma M., Shimazaki K., Kobayashi J. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 696-698.
- Shilabin A.G., Hamman M.T. *In vitro* and *in vivo* evaluation of selected kahalalide F analogues with antitumor and antifungal activities. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 6628-6632.
- Shimada A., Takeuchi S., Nakajima A., Tanaka S., Kawano T., Kimura Y. Phytotoxicity of indole-3-acetic acid produced by the fungus *Pythium aphanidermatum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1999**, 63, 187-189.
- Shimajima Y., Hayashi H., Ooka T., Shibukawa M. Production, isolation and pharmacological studies of AI-77s. *Agric. Biol. Chem.*, **1982**, 46, 1823-1829.
- Shiro M., Nakai H., Nagashima K., Tsuji N. X-ray determination of the structure of the polyether antibiotic K-41. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1978**, 682-683.
- Sijtsma L. de Swaaf M.E. Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2004**, 64, 146-153.
- Simmons T.L., Coates R.C., Clark B.R., Engene N., Gonzalez D., Esquenazi E., Dorrestein P.C., Gerwick W.H. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. *PNAS*, **2008**, 105, 4587-4594.
- Sobik P., Grunenberg J., Böröczky K., Laatsch H., Wagner-Döbler I., Schulz S. Identification, synthesis and conformation of tri- and tetrathiacycloalkanes from marine bacteria. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 3776-3782.
- Spyere A., Rowley D.C., Jensen P.R., Fenical W. New neoverrucosane diterpenoids produced by the marine gliding bacterium *Saprospira grandis*. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 818-822.
- Stark T., Hofmann T. Structures, sensory activity and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 7222-7231.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, **2002**, 56, 187-209.
- Sudek S., Lopanik N.B., Waggoner L.E., Hildebrand M., Anderson C., Liu H., Patel A., Sherman D.H., Haygood M.G. Identification of putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus* Endobugula sertula", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 67-74.

- Suguwara F., Strobel G.A. Tryptophol, a phytotoxin produced by *Drechslera nodulosum*. *Phytochemistry*, **1987**, 26, 1349-1351.
- Suleria H.A.R., Osborne S., Masci P., Gobe G. Marine-based nutraceuticals: an innovative trend in the food and supplement industries. *Mar. Drugs*, **2015**, 13, 6336-6351.
- Sun J.F., Wu Y., Yang B., Liu Y. Chemical constituents of marine sponge *Halichondria* sp. from south China Sea. *Chem. Nat. Comp.*, **2015**, 51, 975-977.
- Takahashi H., Kawabata A., Higashiyama K. Enantioselective carbon-carbon bond formation by chiral organotitanium compounds; methyltitanium (*S*)-*N*-acylpyrrolidinyl-methoxide diisopropoxides. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 1604-1607.
- Tan J., Bednarek P, Liu J., Schneider B., Svatoš A., Hahlbrock K. Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites i infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 691-699.
- Tezuka Y., Huang Q., Kikuchi T., Nishi A., Tubaki K. Studies on the metabolites of *Cladobotryum varium*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, 42, 2612-2617.
- Tsuji N., Nagashima K., Kobayashi M., Wakisaka Y., Kawamura Y., Kozuki S., Mayama M. Two new antibiotics, A-218 and K-41 isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **1976**, 24, 10-14.
- Tsuji N., Nagashima K., Terui Y., Tori K. Structure of K-14B, a new diglycoside polyether antibiotic. *J. Antibiot.*, **1979**, 27, 169-172.
- Tsuruoka N., Beppu Y., Koda H., Doe N., Watanabe H., Abe K. A DKP cyclo(L-Phe-L-Phe) found in chicken essence is a dual inhibitor of the serotonin transporter and acetylcholinesterase. *PlosONE*, **2012**, 7, e50824.
- Tullberg M., Grøtli M., Luthman K. Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 7484-7491.
- Tziveleka L.-A., Ioannou E., Tsiourvas D., Berillis P., Foufa E., Roussis V. Collagen from the marine sponges *Axinella cannabina* and *Suberites carnosus*: isolation and morphological, biochemical and biophysical characterization. *Mar. Drugs*, **2017**, 15, 152.
- Umeda H. **2012**. Manufacturing method for optical film. US Patent 8,273,273 B2.
- Visser J., Meyer H.F. *Trans*-3-(methylthio)-acrylic acid, a new metabolic product from *Streptomyces lincolnensis*. *J. Antibiot.*, **1969**, 510.
- Wang G., Dai S., Chen M., Wu H., Xie L., Luo X., Li X. Two diketopiperazine cyclo(Pro-Phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. *Chem. Nat. Comp.*, **2010**, 46, 583-585.
- Wang J., Wang J., Liu J., Li J., Zhou L., Zhang H., Sun J., Zhuang S. The evaluation of

- endocrine disrupting effects of *tert*-butylphenols towards estrogenic receptor α , androgen receptor and thyroid hormone receptor β and aquatic toxicities towards freshwater organisms. *Environ. Pollut.*, **2018**, 240, 396-402.
- Wang P., Xi L., Liu P., Wang Y., Wang W., Huang Y., Zhu W. Diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. FXJ7.328. *Mar. Drugs*, **2013**, 11, 1035-1049.
- Waters A.L., Hill R.T., Place A.R., Hamann M.T. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2010**, 21, 780-786.
- Wei H.-X., Fang X.-W., Xie X.-S., Zhang S.-P., Jiang Y., Wu S.-H. Secondary metabolites of a soil-derived *Streptomyces kunmingensis*. *Chem. Nat. Comp.*, **2017a**, 53, 794-796.
- Wei J., Zhang X.-Y., Deng S., Cao L., Xue Q.-H., Gao J.-M. α -glucosidase inhibitors and phytotoxins from *Streptomyces xanthophaeus*. *Nat. Prod. Res.*, **2017b**, 31, 2062-2066.
- Wu P.-L., Lin F.-W., Wu T.S., Kuoh C.-S., Lee K.-H., Lee S.-J. Cytotoxic and antiviral-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52, 345-349.
- Wu T.-S., Leu Y.-L., Chan Y.-Y. Aristolochic acids as a defensive substance for the aristolochiaceae plant-feeding swallowtail butterfly, *Pachliopta aristolochiae interpositus*. *J. Chin. Chem. Soc.*, **2000**, 47, 221-226.
- Xie C.-L., Liu Q., Xia J.-M., Gao Y., Yang Q., Shao Z.-Z., Liu G., Yang X.-W. Anti-allergic compounds from the deep-sea-derived actinomycete *Nesterenkonia flava* MCCC 1K00610. *Mar. Drugs*, **2017**, 15, 71.
- Xu L.-Y., Quan X.-S., Wang C., Sheng H.-F., Zhou G.-X., Lin B.-R., Jiang R.-W., Yao X.-S. Antimycins A₁₉ kai A₂₀, two new antimycins produced by marine actinomycete *Streptomyces antibioticus* H74-18. *J. Antibiot.*, **2011**, 64, 661-665.
- Yang H.H., Oh K.-E., Jo Y.H., Ahn J.H., Liu Q., Turk A., Jang J.Y., Hwang B.Y., Lee K.Y., Lee M.K. Characterization of tyrosinase inhibitory constituents from the aerial parts of *Humulus japonicus* using LC-MS/MS coupled online assay. *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 509-515.
- Yang L.H., Miao L., Lee O.O., Li X., Xiong H., Pang K.-L., Vrijmoed L., Qian P.-Y. Effect of culture conditions on antifouling compound production of a sponge-associated fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 74, 1221-1231.
- Yang X.-Q., Yang Y.-B., Zhou H., He G.-W., Zhao L.-X., Xu L.-H., Ding Z.-T. New megastigmane glycoside and alkaloids from *Streptomyces* sp. YIM 63342. *Nat. Prod. Res.*, **2013**, 27, 1191-1196.
- Yap A.-C., Teoh W.-Y., Chan K.-G., Sim K.-S., Choo Y.-M. A new oxathiolane from

- Enterobacter cloacae*. *Nat. Prod. Res.*, **2015**, 29, 722-726.
- Ye X., Chai W., Lian X.-Y., Zhang Z. Novel propanamide analogue and antiproliferative diketopiperazines from mangrove *Streptomyces* sp. Q24. *Nat. Prod. Res.*, **2017**, 31, 1390-1396.
- Ying Y.-M., Shan W.-G., Liu W.-H., Zhan Z.-J. Alkaloids and nucleoside derivatives from a fungal endophyte of *Hyperzia serrata*. *Chem. Nat. Comp.*, **2013**, 49, 184-186.
- Yotsu M., Yamazaki T., Meguro Y., Endo A., Murata M., Naoki H., Yasumoto T. Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish. *Toxicon*, **1987**, 25, 225-228.
- Yue Q., Miller C.J., White J.F.Jr., Richardson M.D. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 4687-4692.
- Zhang Y., Adnani N., Braun D.R., Ellis G.A., Barns K.J., Parker-Nance S., Guzei I.A. Bugni T.S. Micromonohalimanes A and B: antibacterial halimane-type diterpenoids from a marine *Micromonospora* species. *J. Nat. Prod.*, **2016**, 79, 2968-2972.
- Zin W.W.M., Buttachon S., Dethoup T., Fernandes C., Cravo S., Pinto M.M.M., Gales L., Pereira J.A., Silva A.M.S., Sekeroglu N., Kijjoa A. New cyclotetrapeptides and a new diketopiperazine derivative from the marine sponge-associated fungus *Neosartorya glabra* KUFA 0702. *Mar. Drugs*, **2016**, 14, 136.
- Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π., Κατσαρός Χ. Εισαγωγή στη Βοτανική. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, **1998**.
- Γιαννίτσαρος Α., Τζάκου Ο. Σημειώσεις για το μάθημα: Φαρμακευτική Βοτανική (Μαθήματα Συστηματικής Βοτανικής για τους φοιτητές του Φαρμακευτικού Τμήματος). ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2003**.
- Ρούσσης Β., Βάγιας Κ. Σημειώσεις για το μάθημα: Χημική οικολογία-Θαλάσσια Φαρμακογνωσία. ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2008**.
- Τζάκου Ο., Κωνσταντινίδης Θ. Σημειώσεις για το μάθημα: Συστηματική χερσαίων και θαλάσσιων φυτικών οργανισμών-μεθοδολογία προδιορισμού τους. ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2009**.