الخصائص الكيميائية والبيولوجية للمنتجات الطبيعية البحرية من كائنات البحر الأحمر

المستخلص العربى

إعداد الطالب / فكري مرشد عبدالله شاهر

إشراف / أ.د أسامة وحيد عبدالعاطي حواس

فى هذا البحث تمت دراسة نواتج الأيض الثانوية لأربعة أنواع من الكائنات البحرية من ساحل البحر الأحمر وهى خيار البحر من النوع هولوثوريا أترا والنبات الشاطئي من النوع : ساركوكورنيا فروتيكوسا والطحلب من النوع أفرينفيلا أماديلفا وأخيرا الفطريات من النوع إيميرسيلا نيديولانس حيث تمت عملية إستخلاص وتجزئة المحتوى العضوى لهذه الكائنات وفصل المركبات النقية باستخدام طرق الفصل الكروماتوجرافية ثم تحليل هذه المكونات بإستخدام الكروماتوجرافيا الغازية المتصلة بمطياف قياس الكتله (GC-MS) وأيضا أستخدمت مطيافية قياس الأشعه فوق البنفسجية (UV spectrometry) وأخيرا تقنية الرنين المغناطيسى النووى (NMR) الخاصه بتحليل المركبات النقية.

نتج عن هذه الدراسة فصل وتعريف ستة وعشرين مركبا، أربعة مركبات ستيرولية: سيتوستينون ، بيتا-سيتوستيرول ، بيتا-سيتوستيرول سلفيت ، بيتا-سيتوستيرول جلوكوساید ومركب جليكوليبيد سلفونى تم فصلها وتعريفها من الطحلب، ثلاثة أحماض دهنية: حمض البالميتيك ، ٩-هيدروكسى حمض البالميتيك ، ٩-حمض البالميتيوليك وأربعة مركبات نيوكليوسيدية: ثايمين ، ثايمين دى أوكسى ريبوز ، يوراسيل دى أوكسى ريبوز ، يوراسيل بيتا ريبو فيورانوسيد و مركبين استيرولات بيتا-سيتوستيرول و بيتا-سيتوستيرول جلوكوساید إضافة إلى مركبين من مجموعة الصابونين: إيكونوساید بى و إيكونوساید بى ميثيل إيثر تم فصلها وتعريفها من خيار البحر، مركب الأيزورامنتين مع خمسة مركبات فلافونويدية سكرية: أيزورامنتين رامنوز جالاكتوز ، أيزورامنتين ثنائي رامنوز جالاكتوز ، رامزين رامنوز جالاكتوز ، رامزين روتينوساید ، رامزين ثنائى رامنوز جلوكوز وهو مركب جديد يفصل لأول مرة إضافة إلى مركب نيتروجينى هو ألانتوين تمت تنقيتهم وتوصيفهم من النبات الشاطئى ، وأخيرا ثلاثة مركبات زانثونية : إيمرسلين وشميكسانثون و أرجوسين سي تمت تنقيتهم وإثباتهم من الفطر. المركبين سيتوستينون والجليكوليبيد السلفوني أثبتا فاعلية فى مقاومة الفطر من النوع أسبيرجيلاس نيجر حيث معدل قطر التثبيط 17.97، ١٢,٠٣ ملم على التوالى. كلا المركبين أظهرا فعالية ضد خلايا الثدى السرطانية MCF-7 بنسبة تثبيط نصفية ٥,٤٢ ، ٦,٧٢ ميكرومولرعلى التوالى فى حين ان مركب الجليكوليبيد السلفوني قاوم خلايا السرطان القولونى (HCT116) بنسبة تثبيط نصفية ٣,٦١ ميكرومولر. المركب بيتا سيتوستيرول جلوكوساید أعطى معدل قطر تثبيط 11.03 ملم ضد الفطر المرضى سينسيفالاسترم راسيموسيم.

المستخلص الكلي للنبات الشاطئى والمركب الفلافونويدي الجديد رامزين ثنائي رامنوز جلوكوز أظهرا قدرة على تثبيط البروتيز لفيروس الكبد الوبائى من النوع سى حيث قيمة التثبط النصفية كانت 10.5 ميكروجرام/مل و 8.9 ميكرومولرعلى التوالي ، من ناحية أخرى المركبين أيزورامنتين رامنوز جالاكتوز وأيزورامنتين داي رامنوز جالاكتوز أظهرا نشاط مضاد للأكسدة حيث قاومت الجذور الحرة DPPH عند قيم تثبط نصفية تساوى ٣,٨ ، ٤,٣ ميكرومولر على التوالى.

المستخلص الكلي للفطر والمركب أرجوسين سي أظهرا نشاط مضاد للبكتيريا الموجبة ستافيلوكوكس أوريوس بمعدل قطر التثبيط ١٤ ، ١٥ ملم على التوالى عند تركيز ٥٠ ميكروجرام/ ديسك فى حين أن المركب شاميكسانثون أثبت قدرة عالية فى مقاومة من البكتيريا من النوع باسيلاس سيريوس بمعدل قطر التثبيط مقداره ١٣ ملم والمركب إيمرسلين بدوره أظهر نشاطا فى مقاومة البكتيريا السالبة من النوع إسكيريشيا كولاي بمعدل قطر تثبيط مقداره ١٢ملم.

تم تعيين محتوى الليبيدات لخيار البحر والنبات الشاطئى والطحلب حيث أظهرت نتائج تحليل الكروماتوجرافيا الغاز المتصلة بمطياف قياس الكتلة أن حمض البالميتك كان الحمض الدهنى الرئيسى للطحلب بنسبة ٢٦,٧٦ % مع وجود نسبة عالية الأوليك وحمض الأراشيدونيك بنسبة ٩,٤٧ و ٦,٦٦ % على التوالى. نسبة الأحماض الدهنية غير المشبعه (٥٨,٨٦%) فى خيار البحر كانت اعلى من الأحماض المشبعه (٣٥,٠٢ %) حيث أن حمض البالميتوليك وحمض الأراشيدونيك يمثلان النسبة الأعلى ١٧,٣٣ و ١٣,٦ % على التوالى. النتائج أثبتت أن حمض اللينوليك وحمض الفا لينولينيك هما المكون الرئيسى للأحماض الدهنية فى النبات الشاطئي بنسبة متقاربة وإجمالى ٣٣,٦٥ %.

المحتوى الغير قابل للتصبن للطحلب وللنبات الشاطئي اشتمل على الهيدروكربونات والكحولات والكيتونات والإسترات والتربينات والإسترويدات بينما الألكانات كانت المكون الرئيسى فى خيار البحر. المستخلصات الخام وأجزاء الليبيدات أظهرت فعالية جيدة فى تثبيط ثلاثة أنواع من البكتيريا المسببة للحشف البحرى.

مستخلص خيار البحر والنبات الشاطئى أظهرا خلال هذه الدراسة القدرة على تثبيط نمو خلايا ايرلش السرطانية فى التجارب المختبرية بمقدار ٨٦ % و ٥٢ % على التوالى عند ٢,٥ ملج/مليلتر وأيضا التأثير علي الفئران الحاملة لورم استسقاء ايرلش حيث تضاءل حجم الورم فى حالة خيار البحر ليصل الى ٧١% (عن طريق الحقن البريتونى)، وإلى ٥٤ % (التعاطى الفموى) مقارنة بحجم الورم الغير معالج بينما فى حالة النبات الشاطئي تضاءل الورم إلى ٧١% (عن طريق الحقن البروتونى)، ٧٨% (التعاطى الفموى). من ناحية أخرى أظهر المستخلصان لخيار البحر والنبات الشاطئى تأثير قاتل على يرقات البعوض إيديس إيجيبيتاي الناقل لفيروس حمى الضنك حيث كانت قيمة التثبيط النصفى تساوى ١٨٨,٦ و ٥٨,٩٨ جزء بالمليون للمستخلصان على التوالى.

Marine Natural Products from Red Sea Organisms: Chemical and Biological Characterization

Prepared by / Fekri Murshed Abdullah Shaher

Supervised by / Prof. Dr. Usama Wahid Abd El-Atty Hawas

Abstract

In this study, Four Red Sea organisms *Avrainvillea amadelpha* (algae), *Holothuria atra* (sea cucumber), *Sarcocornia fruticosa* (coastal plant), and *Emericella nidulans* (fungi) were chemically and biologically investigated. A total of 26 metabolites were isolated and identified from the crude extracts of these organisms, using chromatographic techniques and spectral analyses. The compounds were identified as four steroidal compounds sitostenone, β-sitosterol, β-sitosterol 3-*O*-sulfate, sitosterol 3-*O*-β-glucoside, and sulfonyglycolipid from *A. amadelpha*; three fatty acids palmitic acid, 9-hydroxypalmitic acid, 9-palmitoleic acid; nucleobase thymine, nucleosides thymine 2'-deoxyriboside, uracil 2'-deoxyriboside, uracil β-ribofuranoside, two steroids β-sitosterol and sitosterol 3-*O*-β-glucoside, and two triterpene glycosides echinoside B and echinoside B 12-*O*-methyl ether from *H. atra*; six flavonoids isorhamnetin, isorhamnetin 3-*O*-(6"-*O*-α-rhamnosyl)-β-galactoside, isorhamnetin 3-*O*-(2",6"-*O*-α-di-rhamnosyl)-β-galactoside, rhamnazin 3-*O*-(6"-*O*-α-rhamnosyl)-β-galactoside, rhamnazin 3-*O*-rutinoside, and rhamnazin 3-*O*-(2",6"-*O*-α-di-rhamnosyl)-β-glucoside as a new natural compound, along with known nitrogenous compound allantoin from *S. fruticosa*; and known fungal metabolites emericellin, shamixanthone and arugosin C from *E. nidulans.*

The biological activities of the compounds compared to their total extracts were evaluated as antimicrobial, anticancer, antioxidant and antiviral. The antifungal screening displayed that sitostenone and sulfonoglycolipid at 50 µg/disc have strong ability to inhibit *Aspergillus niger* with inhibition zone diameter 17.97 and 12.03 mm, respectively,

as well as significant cytotoxic activity against MCF-7 cancer cells with IC_{50} values 5.42 and 6.72 µM, respectively. Sulfonoglycolipid displayed the highest cell line activity against colorectal cancer (HCT116) cells with IC_{50} 3.61 µM. The results showed that the crude extract of *S. fruticosa* and the new rhamnazin tri-glycoside have HCV protease inhibitory with IC_{50} 10.5 µg/ml and IC_{50} 8.9 µM, respectively. Isorhamnetin di- and tri-glycosides effectively scavenged DPPH radicals with IC_{50} values 3.8 and 4.3 µM, respectively. *E. nidulans* extract at 100 µg/disc and arugosin C at 50 µg/disc had selective antimicrobial activity against Gram-positive strain *Staphylococcus aureus* with inhibition zone diameters 14 and 15 mm, respectively. Shamixanthone was a potent antibacterial metabolite against *Bacillus cereus* (13 mm inhibition) at 50 µg/disc. Moreover, emericellin exhibited a good antibacterial activity against Gram-negative bacterial strain *Escherichia coli* with inhibition zone ١٢ mm compared to the inhibition of antibiotic reference.

Chloroform (as non-polar) fractions of *A. amadelpha*, *H. atra*, *S. fruticosa* were investigated for their lipoidal constituents (using GC-MS analyses) and antifouling activity (using antibiofilm bacterial test). The GC-MS analysis of fatty acids (FAs) content of *A. amadelpha* revealed the dominance of palmitic acid (26.76%) with considerable amounts of oleic acid (C18:1, n-9) and arachidonic acid (C20:4, n-6) at 9.74 and 6.66%, respectively. Quantities of unsaturated FAs (58.86%) of *H. atra* were detected where palmitoleic acid (C16:1, n-7) and arachidonic acid (20:4, n-6) were the major components represented by 17.33 and 13.6%, respectively. Costal plant *S. fruticosa* was dominated by conjugated C18 FAs (linoleic acid, n-6 and α-linolenic acid, n-3) at approximately same ratio with a total amount of 33.65%. The unsaponifiable matter (USM) of both *A. amadelpha* and *H. atra* comprised of five chemical classes of hydrocarbons, ketones, esters, terpenes and steroidal compounds while *n*-Alkanes were the main grouped components of the unsaponifiable fraction of *H. atra*. The crude extracts and their lipoidal fractions were found to exhibit antifouling activity against three biofilm-bacterial strains isolated from the Red Sea, where alga *A. amadelpha* extracts displayed highest percentage of biofilm inhibition. *S. fruticosa* and *A. amadelpha* showed growth inhibitory activity against the biofilm-forming bacterial strains where USM, FAs

and FAs-methyl ester fractions exhibited a strong activity at 100 µg ml^{-1} against *Planomicrobium* sp.

Total extract of *H. atra* and *S. fruticosa* proved to have cytotoxic activity against *in vitro* Ehrlich ascites carcinoma cells with inhibition of 86 and 52%, respectively at concentration 2.5 mg/ml. The animal model assay indicated that intraperitoneally injection and orally treatment decreased the tumor volume of the tested rats to 71 and 54%, respectively, for *H. atra* extract, and to 71 and 78%, respectively, for *S. fruticosa* extract compared to the untreated control animals (45%). Moreover, *H. atra* and *S. fruticosa* extracts exhibited larvicidal effects on *Aedes aegypti* mosquito vector of dengue fever virus by LC_{50} 188 and 58 ppm, respectively. These findings showed that *S. fruticosa* proved to be a potent larvicidal which is more effective than reported results on *S. brachiata*.