



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

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ
ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΑ
*HYPOXYLON FRAGIFORME***

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος
Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

ΤΣΑΓΚΛΗ ANNA

ΑΘΗΝΑ 2013

Επιβλέπων

Τζάκου Όλγα

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Τζάκου Όλγα

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ρούσσης Βασίλειος

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιωάννου Ευσταθία

Λέκτορας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου και τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη συμβολή τους και τη συνεχή καθοδήγησή τους κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου και Λέκτορα Ιωάννου Ευσταθία για το χρόνο που διέθεσαν να μελετήσουν και να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Θα ήθελα επίσης ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Ευσταθία Ιωάννου για την πολύτιμη βοήθεια, επίβλεψη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ τον καθηγητή Marc Stadler (Helmholtz – Centre for Infection Research, Braunschweig) για τη συλλογή του οργανισμού και και τη λήψη ορισμένων φασμάτων.

Ευχαριστώ τη λέκτορα Ζαχαρούλα Γκόνου - Ζάγκου (Συστηματική και Οικολογία Μυκήτων, Βιολογικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Αθηνών) για την παροχή σχετικής βιβλιογραφίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου καθώς και όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου για τη φιλία τους, το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογενειά μου και όλους τους δικούς μου ανθρώπους για τη στήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση του οργανικού εκχυλίσματος του ασκομύκητα *Hypoxylon fragiforme*, ώριμα και νεαρά στρώματα του οποίου συλλέχθηκαν από δασύλλια της περιοχής Braunschweig στη Γερμανία.

Έπειτα από εξαντλητική εκχύλιση του οργανισμού με οργανικούς διαλύτες, το εκχύλισμα υποβλήθηκε σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών, οπότε και απομονώθηκαν δεκαέξι μεταβολίτες, έντεκα εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS.

Συγκεκριμένα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δύο κυτοχαλασίνες [κυτοχαλασίνη H, 18-δεϋδροξυ-κυτοχαλασίνη H], πέντε παράγωγα μιτορουμπρίνης [μιτορουμπρίνη, μιτορουμπρινόλη, οξική μιτορουμπρινόλη] και τέσσερα στεροειδή [(22*E*)-εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη, εργοστ-7-εν-3-όλη, εργοστ-7,24(28)-διεν-3-όλη,(3β,5α), (22*E*,24*S*)-5α,8α-επιδιοξυ-24-μεθυλ-χολεστα-6,22-διεν-3β-όλη]. Δύο εκ των πέντε παραγώγων μιτορουμπρίνης αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

ABSTRACT

In the present study, the ascomycetes *Hypoxylon fragiforme* was studied so as to examine the chemical composition of its secondary metabolites. Mature and young stromata were collected off groves in the area of Braunschweig, Germany.

Extraction of the air-dried specimens with mixtures of CH₂Cl₂/MeOH, followed by a series of chromatographic separations led to the isolation of 16 metabolites and structure elucidation of 11 of them.

The structures and relative configurations of the isolated natural products were established by means of spectral analysis, including 1D and 2D NMR experiments, as well as MS data.

Specifically, the isolated metabolites include two cytochalasins [cytochalasin H, 18-dehydroxy- cytochalasin H], five mitorubrin-type derivatives [mitorubrin, mitorubrinol, mitorubrinol acetate] and four steroids [(22*E*)-ergost-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, ergost-7-en-3-ol, ergost-7,24(28)-dien-3-ol,(3β,5α), (22*E*,24*S*)-5α,8α-epidioxy-24-methyl-cholest-6,22-dien-3β-ol]. Among the mitorubrin-type derivatives two are new natural products.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ	3
ΔΙΑΦΟΡΑ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΩΝ – ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΩΝ	7
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΧΡΗΣΕΙΣ	8
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ <i>XYLARIACEAE</i>	21
ΓΕΝΟΣ <i>HYPOXYLON</i>	24
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ <i>HYPOXYLON</i> SPP.	28
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ <i>H. FRAGIFORME</i> (PERS.: FR.) J. KICKX FIL.	28
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	30
ΑΝΑΠΤΥΞΗ	31
ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ	33
1. ΑΖΑΦΙΛΟΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ	33
2. ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΝΑΦΘΑΛΕΝΙΟΥ	35
3. ΚΥΤΟΧΑΛΑΣΙΝΕΣ	36
4. ΤΕΡΠΕΝΙΑ	37
5. ΧΡΩΜΟΝΕΣ	38
6. ΠΟΛΥΚΕΤΙΔΙΑ	38
7. ΠΟΛΥΕΣΤΕΡΕΣ	38
8. ΑΛΛΑ	39
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	42
I. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ	42
II. ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ NO ΣΕ RAW ΚΥΤΤΑΡΑ (ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ)	45
III. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	46
IV. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	47
V. ΦΥΤΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	48

VI. ENTOMOKTONΟΣ ΔΡΑΣΗ	49
VII. ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	49
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΓΕΝΟΥΣ <i>HYPOXYLON</i>	51
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	63
ΟΡΓΑΝΑ	63
ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	63
ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	64
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΑ <i>HYPOXYLON FRAGIFORME</i>	65
A. ΩΡΙΜΑ ΣΤΡΩΜΑΤΑ	65
B. ΝΕΑΡΑ ΣΤΡΩΜΑΤΑ	88
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
ΑΠΟΔΟΣΗ ΔΟΜΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΑ <i>HYPOXYLON FRAGIFORME</i>	107
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 1	107
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 2	111
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 3	116
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 4	121
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 5	124
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 6	127
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 7	135
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 8	142
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 9	147
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 10	150
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ 11	153
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	159
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	163

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ασκομύκητες

Οι Ασκομύκητες αποτελούν το μεγαλύτερο φύλο των Μυκήτων. Περιλαμβάνουν πάνω από 64.163 είδη τα οποία έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τη δημιουργία ασκών ως αναπαραγωγικό όργανο. Το μεγάλο μέγεθος του φύλου καθιστά δύσκολη την αναγνώριση κοινών μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η ταξινόμηση τους σε υποομάδες βασίζεται σε μια σειρά φυλογενετικών μελετών και έχουν αναγνωριστεί 3 υποφύλα. Ωστόσο, πολλές οικογένειες Ασκομυκήτων δεν εντάσσονται σε συγκεκριμένες κλάσεις ή τάξεις και πάνω από 3.200 είδη δεν εντάσσονται με βεβαιότητα σε κάποια οικογένεια. Τα 3 υποφύλα των Ασκομυκήτων με τις οικογένειες που περιλαμβάνουν είναι:

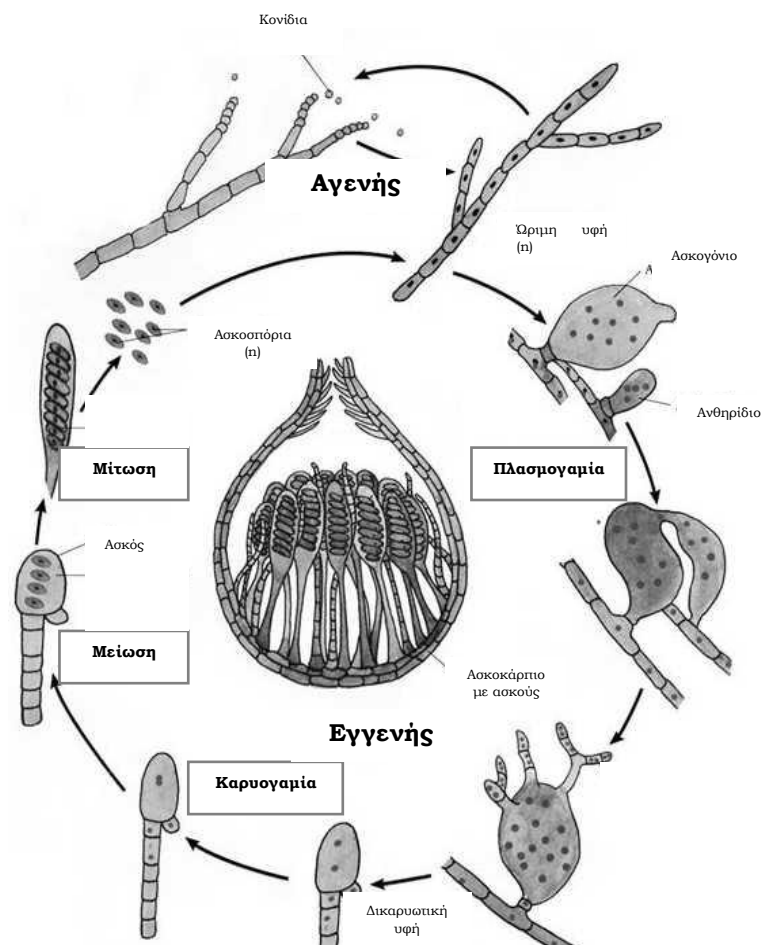
1. ***Pezizomycotina*:** *Ascobolaceae*, *Ascodesmidaceae*, *Caloscyphaceae*, *Carbomycetaceae*, *Chorioactidaceae*, *Discinaceae*, *Glaziellaceae*, *Helvellaceae*, *Karstenellaceae*, *Morchellaceae*, *Pezizaceae*, *Pyronemataceae*, *Rhizinaceae*, *Sarcoscyphaceae*, *Sarcosomataceae*, *Tuberaceae*
2. ***Saccharomycotina*:** *Ascoideaceae*, *Cephaloascaceae*, *Dipodascaceae*, *Endomycetaceae*, *Eremotheciaceae*, *Lipomycetaceae*, *Metschnikowiaceae*, *Phaffomycetaceae*, *Pichiaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycodaceae*, *Saccharomycopsidaceae*, *Trichomonascaceae*
3. ***Taphrinomycotina*:** *Protomycetaceae*, *Taphrinaceae* (Kirk *et al.* 2008).

Οι περισσότεροι Ασκομύκητες σχηματίζουν μυκήλια, αλλά ορισμένοι όπως οι ζυμομύκητες, έχουν μονοκυτταρικό ή ψευδομυκηλιακό θαλλό. Τα μυκήλια αποτελούνται από υφές οι οποίες φέρουν εγκάρσια διαφράγματα (septa) τα οποία έχουν έναν κεντρικό πόρο για επικοινωνία του κυτταροπλάσματος. Στους Ασκομύκητες δεν παρατηρούνται κανενός είδους κινητά κυττάρια (Talbot 1971).

Όπως και οι υπόλοιποι μύκητες, οι Ασκομύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί οι οποίοι βασίζονται σε εξωτερικές πηγές άνθρακα. Πολλοί χρησιμοποιούν ως τροφή νεκρή οργανική ύλη από φυτά ή ζώα. Άλλοι παρασιτούν

σε ζωντανά φυτά ή ζώα, ενώ κάποια είδη Ασκομυκήτων συμβιώνουν με φύκη σχηματίζοντας τους λειχήνες (Talbot 1971). Είναι οργανισμοί με κοσμοπολίτικη εξάπλωση καθώς ευδοκιμούν σε κάθε κλίμα. Ζουν τόσο στο νερό και σε υγρό περιβάλλον όσο και σε σχετικά ξηρό (Müller & Loeffler 1976).

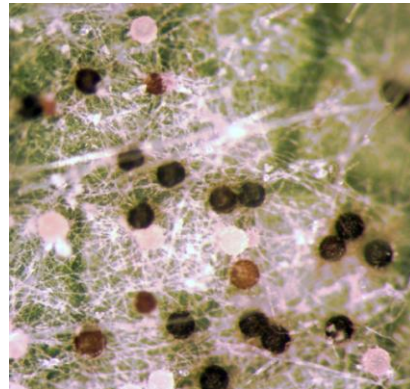
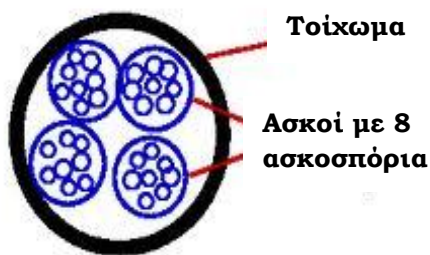
Η αναπαραγωγή των Ασκομυκήτων γίνεται είτε αγενώς, είτε εγγενώς. Η αγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει εκβλάστηση, τεμαχισμό ή τη δημιουργία αγενών σπορίων. Η εγγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει την πλασμογαμία, την καρυογαμία και τη μειωτική διαίρεση. Η πλασμογαμία γίνεται με διάφορους τρόπους, όπως με γαμεταγγειακή σύζευξη, γαμεταγγειακή επαφή, σωματογαμία, σπερματογαμία. Η πρώτη περίπτωση συναντάται σε Ασκομύκητες με “γυμνούς” ασκούς οι οποίοι δεν σχηματίζονται σε ασκοκάρπια. Δύο παρόμοια γαμετάγγεια, τα οποία μπορεί να είναι και μονοκυτταρικά, έρχονται σε επαφή και δημιουργείται ένα κοινό κύτταρο το οποίο εξελίσσεται σε ασκό (Talbot 1971).



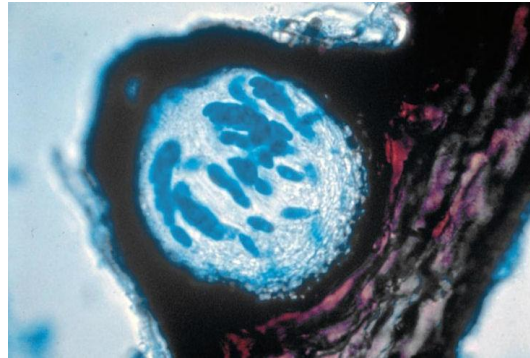
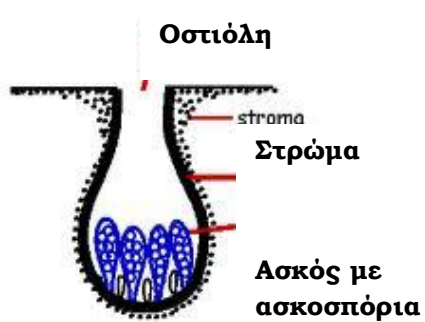
Η γαμεταγγειακή επαφή συμβαίνει σε ένα μεγάλο αριθμό Ασκομυκήτων. Τα αρσενικά και τα θηλυκά γαμετάγγεια είναι πολυπύρρηνα, ανόμοια και ονομάζονται αντίστοιχα ανθηρίδια και ασκογόνια. Μέσω ενός πόρου στο σημείο επαφής γίνεται η μεταφορά του αρσενικού πυρήνα στο ασκογόνιο. Η μεταφορά μπορεί να γίνει και μέσω μίας εξειδικευμένης δομής στο ασκογόνιο, του τριχογυνίου, το οποίο έρχεται σε επαφή με το ανθηρίδιο. Σε είδη τα οποία στερούνται ανθηριδίων, τα σπερμάτια συμφύονται με το τριχογύνιο ή με το ασκογόνιο (σπερματογαμία). Η σωματογαμία συναντάται σε είδη τα οποία στερούνται αναπαραγωγικών οργάνων. Σε αυτή την περίπτωση, η πλασμογαμία γίνεται ανάμεσα σε συμβατές σωματικές υφές, ακολουθούμενη από τη δημιουργία διπύρηνων ιστών (Talbot 1971).

Αποτέλεσμα της πλασμογαμίας είναι η δημιουργία ασκών. Είναι τα αναπαραγωγικά όργανα τα οποία περιέχουν τα ασκοσπόρια. Αυτά είναι σπόρια τα οποία προέρχονται από εγγενή αναπαραγωγή. Οι ασκοί συνήθως σχηματίζονται μέσα σε ένα χαρακτηριστικό όργανο που ονομάζεται ασκοκάρπιο. Τα ασκοκάρπια διακρίνονται σε 4 τύπους:

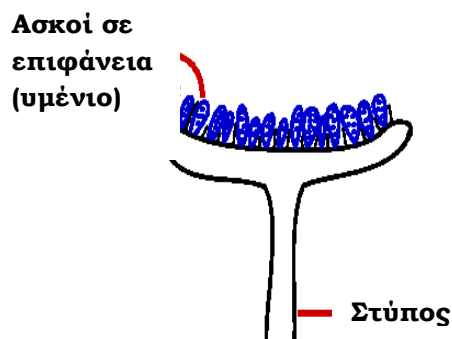
1. **Κλειστοθήκιο.** Εντελώς κλειστό ασκοκάρπιο. Οι ασκοί με τα ασκοσπόρια που σχηματίζονται μέσα σε αυτό απελευθερώνονται με τη θραύση ή την αποσύνθεση του τοιχώματός του.



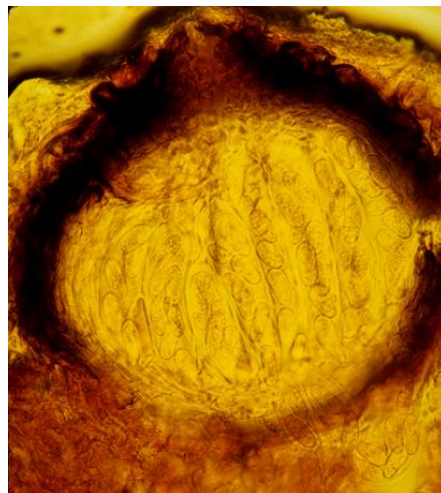
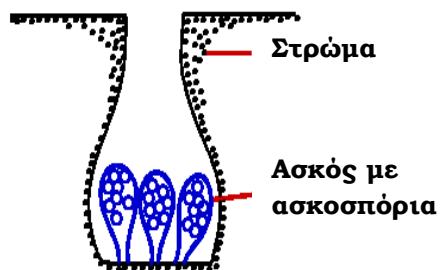
2. **Περιθήκιο.** Φιαλόμορφο ασκοκάρπιο το οποίο στην κορυφή του έχει οπή που καλείται οστιόλη από όπου απελευθερώνονται τα ασκοσπόρια.



3. **Αποθήκιο.** Είναι συνήθως δισκοειδές ή κυπελλοειδές ανοικτό ασκοκάρπιο και φέρει τους ασκούς εκτεθειμένους στον αέρα από την αρχή του σχηματισμού τους.

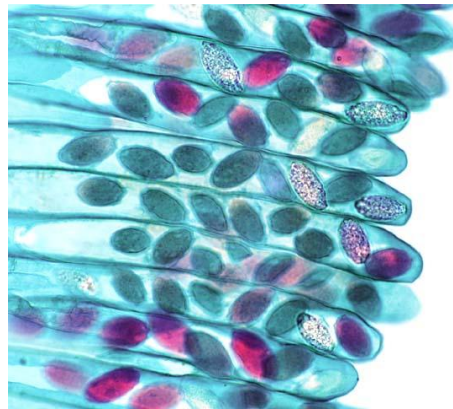
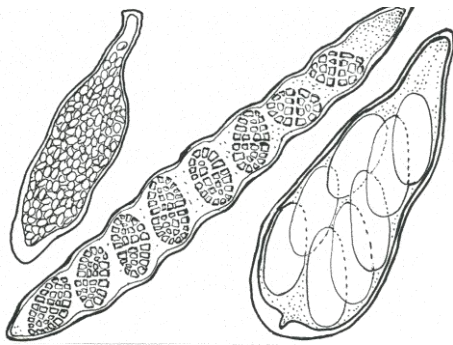


4. **Ασκόστρωμα.** Σε αυτό οι ασκοί αναπτύσσονται μέσα σε κοιλότητες που βρίσκονται σε ενιαίο στρώμα (Γιαννίσαρος & Τζάκου 2003).

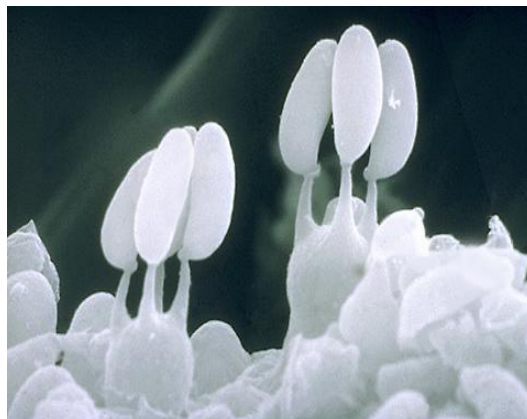
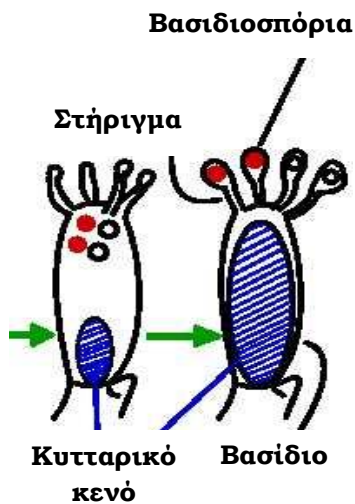


Διαφορά Ασκομυκήτων – Βασιδιομυκήτων

Μία βασική διαφορά ανάμεσα στους Ασκομυκήτες και στους Βασιδιομυκήτες είναι ο τρόπος με τον οποίο παράγουν τα σπόρια τους κατά την εγγενή αναπαραγωγή. Οι Βασιδιομυκήτες χαρακτηρίζονται από τα βασίδια στα οποία μετά από μειωτική διαίρεση σχηματίζονται τα απλοειδή βασιδιοσπόρια για την εγγενή αναπαραγωγή. Η ανάπτυξη των βασιδίων και των βασιδιοσπορίων είναι παρόμοια με την ανάπτυξη των ασκών και των ασκοσπορίων των Ασκομυκήτων με τη διαφορά ότι τα ασκοσπόρια σχηματίζονται ενδογενώς, ενώ τα βασιδιοσπόρια εξωγενώς. Τα σπόρια που σχηματίζονται σε κάθε βασίδιο είναι συνήθως 4 (σπανίως 2 ή 8). Αντίθετα σε κάθε ασκό σχηματίζονται συνήθως 8 ασκοσπόρια (Γιαννίταρος & Τζάκου 2003).



Ασκοσπόρια



Βασιδιοσπόρια

Δευτερογενείς Μεταβολίτες Ασκομυκήτων και Χρήσεις

Από διάφορα είδη Ασκομυκήτων έχει απομονωθεί μία μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική και στη βιομηχανία. Επιπλέον, για πολλούς νέους μεταβολίτες μελετάται η δυνατότητα εφαρμογής τους στη θεραπευτική.

Σημαντικά αντιβιοτικά έχουν ως κύριες πηγές ορισμένα είδη του γένους *Penicillium*. Η πενικιλίνη (Εικόνα 1) απομονώθηκε αρχικά από το είδος *Penicillium notatum* (Εικόνα 1) το 1929 από τον Alexander Fleming, ενώ σήμερα παράγεται κυρίως από το είδος *P. chrysogenum* το οποίο δίνει μεγαλύτερες ποσότητες πενικιλίνης (Γιαννίσαρος & Τζάκου 2003). Από καλλιέργειες των ίδιων μυκήτων σε θρεπτικό υλικό με κατάλληλη πρόδρομη ουσία λαμβάνονται η βενζυλοπενικιλίνη ή πενικιλίνη G (Εικόνα 1) και η φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη ή πενικιλίνη V (Εικόνα 1). Η πρώτη χρησιμοποιείται παρεντερικώς εναντίον Gram (+) μικροοργανισμών. Η πενικιλίνη V έχει το ίδιο αντιμικροβιακό φάσμα και μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα επειδή είναι οξεάντοχη (Λουκής, Κουλάδη & Τζάκου 2008).

Η αντιβιοτική ουσία γκριζεοφουλβίνη (Εικόνα 2) παράγεται από τα είδη *P. patulum* και *P. griseofulvum* (Εικόνα 2) και είναι αποτελεσματική έναντι δερματομυκητιάσεων που προκαλούνται από είδη των γενών *Trichophyton*, *Microsporon* και άλλων (Γιαννίσαρος & Τζάκου 2003).

Τα αλκαλοειδή της Ερυσσιβόδους ολύρας (*Secale cornutum*) έχουν απομονωθεί από τα σκληρώτια του μύκητα *Claviceps purpurea* (Εικόνα 3) ο οποίος μολύνει τα άνθη της σικάλεως. Οι ουσίες αυτές και τα παράγωγά τους είναι πολύ χρήσιμες στη φαρμακευτική, καθώς βρίσκουν εφαρμογή σε πολλές περιπτώσεις. Η εργομετρίνη (Mitroton®, Εικόνα 3) χρησιμοποιείται στη γυναικολογία. Η μεθυλ εργομετρίνη (Methergin®, Εικόνα 3) χρησιμοποιείται σε μητρορραγίες. Η εργοταμίνη (Cafergot®, Εικόνα 3) και η διϋδροεργοταμίνη (Dihydergot®, Εικόνα 3) σε ημικρανίες. Τα αλκαλοειδή της ομάδας της εργοτοξίνης και κυρίως τα διϋδρογονωμένα παράγωγά τους σε κυκλοφοριακές διαταραχές και σε υπέρταση (Λουκής, Κουλάδη & Τζάκου 2008). Η διϋδροεργοκρίστίνη (Diertina®, Εικόνα 3) ενδείκνυται για την θεραπευτική

αντιμετώπιση των συμπτωμάτων χρόνιων αγγειακών εγκεφαλικών διαταραχών και καταστάσεων έκπτωσης των νοητικών λειτουργιών της γεροντικής ηλικίας (www.galinos.gr).

Το παπυρακιλλικό οξύ (Εικόνα 4), ένας μεταβολίτης ανάλογος του πενικιλινικού οξέος, παράγεται από τον Ασκομύκητα *Lachnum papyraceum* (Εικόνα 4). Η ουσία αυτή έχει δείξει νηματοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση (Shan *et al.* 1996). Πάνω από 30 μεταβολίτες, κυρίως χλωριωμένοι, απομονώθηκαν από καλλιέργειες του ίδιου είδους και έδειξαν την ίδια φαρμακολογική δράση με το παπυρακιλλικό οξύ (Anke *et al.* 1995).

Τα σαραγοσικά οξέα A-F ή σκουαλεστατίνες (Εικόνα 5) είναι μεταβολίτες οι οποίοι αναστέλλουν τη συνθετάση του σκουαλενίου, παρεμβαίνοντας κατ' αυτό τον τρόπο στη σύνθεση της χοληστερόλης. Συνεπώς μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Οι μεταβολίτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αντιμετώπιση της υπερχοληστεριναιμίας και κατ' επέκταση της αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών παθήσεων (Bills *et al.* 1994).

Οι χρυσανθόνες B (Εικόνα 6) και C (Εικόνα 6) έχουν απομονωθεί από το είδος *Ascochyta chrysanthemi* (Εικόνα 6). Πρόκειται για φυτοτοξικές ουσίες οι οποίες προκαλούν νέκρωση στα φύλλα των χρυσανθέμων. Επιπλέον διαθέτουν βακτηριοστατικές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες (Arnone *et al.* 1990).

Ένζυμα τα οποία έχουν την ικανότητα διάσπασης της κυτταρίνης παράγονται από το είδος *Trichoderma reesei* (Εικόνα 7). Τα ένζυμα αυτά έχουν μεγάλη βιομηχανική σημασία καθώς μπορούν να παράγουν βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς από απόβλητα τα οποία περιέχουν κυτταρίνη (Schuster 2010).

Η μεβινολίνη (Εικόνα 8) είναι ένας μεταβολίτης πολυκετιδικής φύσης που έχει απομονωθεί από νηματοειδείς Ασκομύκητες του γένους *Monascus* (Εικόνα 8). Η ουσία αυτή, καθώς και συγγενείς μεταβολίτες, εμφανίζουν αντιυπερχοληστεριναιμικές ιδιότητες και μελετάται η δυνατότητα χρήσης τους από τη φαρμακευτική βιομηχανία (Jůzlová *et al.* 1996).

Μελέτη σε έναν αριθμό Ασκομυκήτων αποκάλυψε νέους μεταβολίτες με νηματοκτόνες και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Το λινολεϊκό οξύ (Εικόνα 9)

απομονώθηκε ως νηματοκτόνος παράγοντας από είδη του γένους *Chlorosplenium* (Εικόνα 9), η 14-επικοχλιοκινόνη B (Εικόνα 10) από καλλιέργειες του είδους *Neobulgaria pura* (Εικόνα 10) και δύο ναφθαλένια, τα οποία προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελανίνης, από το είδος *Daldinia concentrica*. Η 5-πεντυλο-2-φουραλδεΐδη (Εικόνα 11), ένας μεταβολίτης που ήταν γνωστό ότι είχε απομονωθεί από ένα Βασιδιομύκητα, βρέθηκε ότι παράγεται από ένα Αυστραλιανό Ασκομύκητα (Anke *et al.* 1995).

Από κλαδιά κωνοφόρων δέντρων απομονώθηκαν στελέχη του ενδοφυτικού γένους *Pezicula* (Εικόνα 12) και εξετάστηκαν για μυκητοκτόνο και αντιβακτηριακή δράση. Βρέθηκαν πέντε βιολογικά δραστικές ουσίες με ισχυρή μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο δράση, ενώ η αντιβακτηριακή δράση ήταν λιγότερο σημαντική (Schulz *et al.* 1995).

Η πλεοσπορόνη (Εικόνα 13) είναι ένας μεταβολίτης ο οποίος παράγεται από έναν ενδοφυτικό Ασκομύκητα που συναντάται σε φυτά του είδους *Anthyllis vulneraria* L. της οικογένειας Fabaceae. Ο μεταβολίτης αυτός διαθέτει μέτρια αντιβακτηριακή δράση και δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση των μικροοργανισμών. Έδειξε τη μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι των μικροοργανισμών *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae* (Zhang *et al.* 2009).

Από τα καρποσώματα του Ασκομύκητα *Daldinia concentrica* (Εικόνα 14), απομονώθηκε ένας μεταβολίτης με το όνομα κονσεντρικολίδιο (Εικόνα 14). Το μόριο αυτό διαθέτει σκελετό βενζοφουρανικής λακτόνης. Έρευνες έδειξαν τη δράση της ουσίας αυτής έναντι του ιού HIV και είναι πιθανό να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από AIDS. Η ανάγκη για ανακάλυψη νέων μορίων με δράση κατά του ιού HIV δράση υπαγορεύεται από τη γρήγορη εξέλιξη νέων στελεχών του ιού οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στις τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Liu 2007).

Η τριχοθεκίνη (Εικόνα 15) παράγεται από τον ενδοφυτικό Ασκομύκητα *Trichothecium roseum* LZ93 (Εικόνα 15α) ο οποίος αναπτύσσεται στο φυτό *Maytenus hookeri* της οικογένειας Celastraceae. Ο συγκεκριμένος Ασκομύκητας βρέθηκε ότι ανταγωνίζεται άλλους παθογόνους μύκητες *in vitro*. Από τα συνολικά 11 συστατικά που απομονώθηκαν, μόνο η τριχοθεκίνη έδειξε ισχυρή

αντιμυκητιασική δράση, γεγονός που αποδεικνύει πως αυτή ευθύνεται για την ανταγωνιστική δράση του *Trichothecium roseum* LZ93 σε παθογόνους μύκητες (Zhang *et al.* 2010).

Οι ατροπισομερείς ενώσεις αλτερπορριόλη G και H (Εικόνα 16) παράγονται από τον ενδοφυτικό Ασκομύκητα *Stemphylium globuliferum* (Εικόνα 16) ο οποίος απομονώθηκε από τους ιστούς του φαρμακευτικού φυτού *Mentha pulegium*. Οι μεταβολίτες αυτοί έδειξαν σημαντική κυτταροτοξικότητα έναντι L5178Y κυττάρων (Debbab *et al.* 2009).

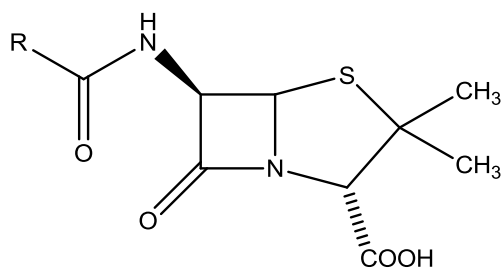
Το φομοεναμίδιο (Εικόνα 17) απομονώθηκε μαζί με άλλους μεταβολίτες από είδος του ενδοφυτικού Ασκομύκητα *Phomopsis* sp. PSU-D15 (Εικόνα 17α). Το μόριο αυτό επέδειξε μέτρια *in vitro* αντιμικροβιακή δράση έναντι στελέχους του *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Rukachaisirikul *et al.* 2008).

Οι ινφλατίνες A και B (Εικόνα 18) είναι δύο αφιδικολινικά ανάλογα που απομονώθηκαν από αρχικό εκχύλισμα του Ασκομύκητα *Tolyposcladium inflatum* (Εικόνα 18). Οι μεταβολίτες έδειξαν μέτρια κυτταροτοξική δράση έναντι οχτώ καρκινικών σειρών, όπως πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα, καρκίνος του μαστού, καρκίνος του οισοφάγου, ηπατικό καρκίνωμα και άλλα (Lin *et al.* 2011).

Η μπενεσουδόνη (Εικόνα 19) είναι ένας μεταβολίτης ο οποίος παράγεται από τον Ασκομύκητα *Mollisia benesuada* (Εικόνα 19). Ο μεταβολίτης αυτός έχει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, κυτταροτοξική και φυτοτοξική δράση. Φέρει μία δραστική ομάδα α-μεθυλενοκετόνης, η οποία αντιδρά με ομάδες κυστεΐνης και παράγει προϊόντα τα οποία στερούνται βιολογικής δράσης και ευθύνεται για τις αντιβιοτικές ιδιότητες της ένωσης (Thines *et al.* 1997).

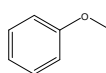


Penicillium sp.



R = H, Πενικιλίνη

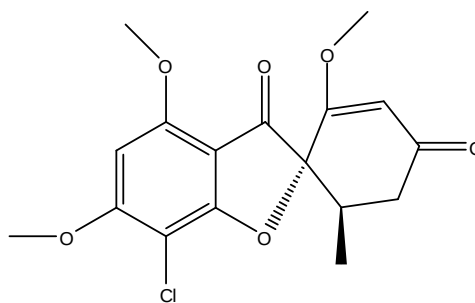
R = , Βενζυλοπενικιλίνη

R = , Φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη

Εικόνα 1



Penicillium griseofulvum

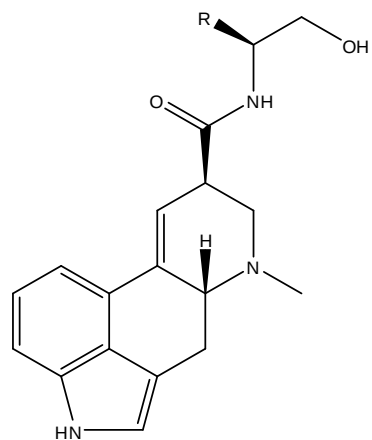


Γκριζεοφουλβίνη

Εικόνα 2

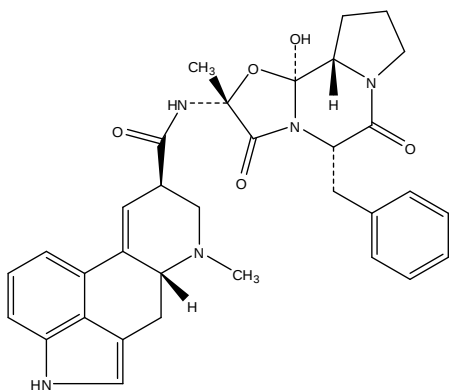


Σκληρώτια *Claviceps purpurea*

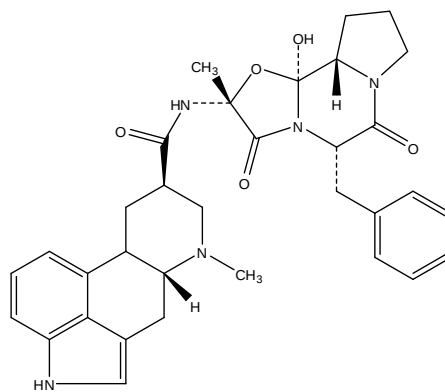


R = H, Εργομετρίνη

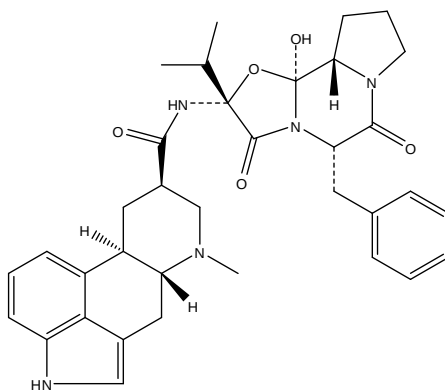
R = CH₃, Μεθυλοεργομετρίνη



Εργοταμίνη



Διϋδροεργοταμίνη

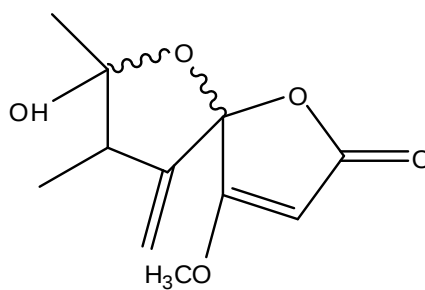


Διϋδροεργοκριστίνη

Εικόνα 3

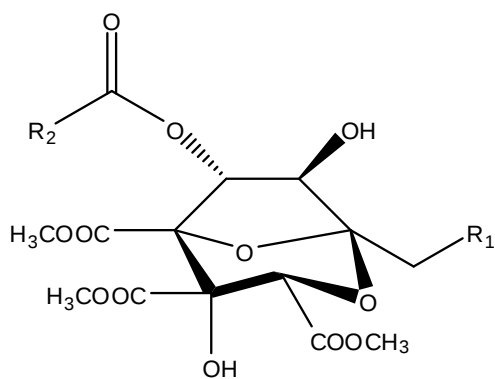


Lachnum sp.

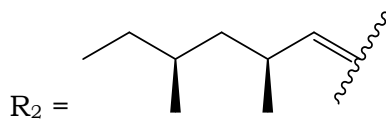
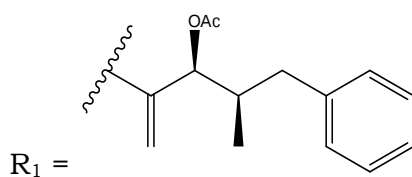


Παπυρακιλλικό οξύ

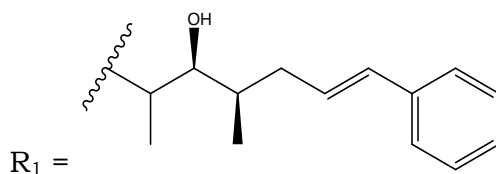
Εικόνα 4



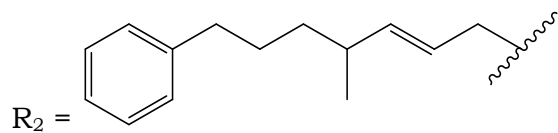
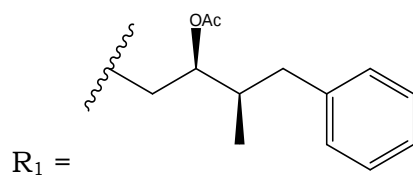
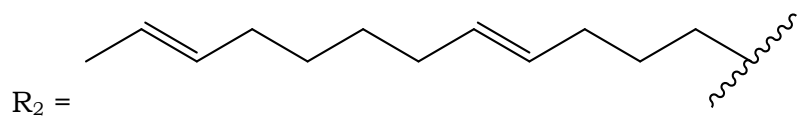
Σαραγοσικό οξύ Α



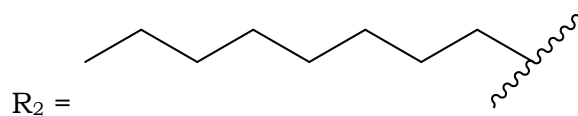
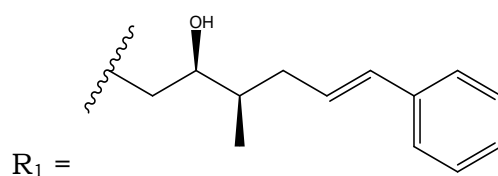
Σαραγοσικό οξύ Β



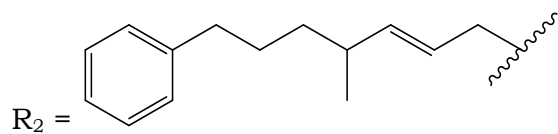
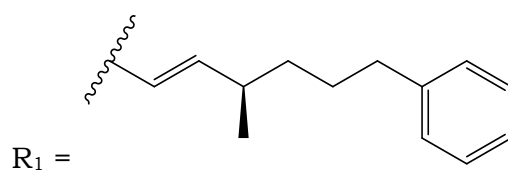
Σαραγοσικό οξύ C



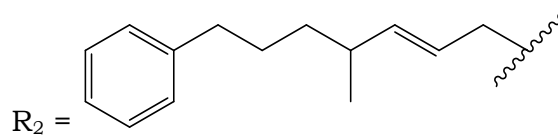
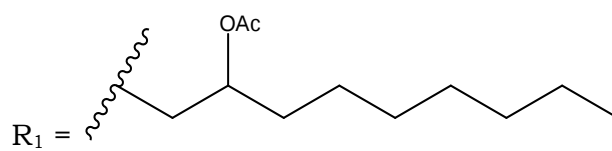
Σαραγοσικό οξύ D



Σαραγοσικό οξύ E



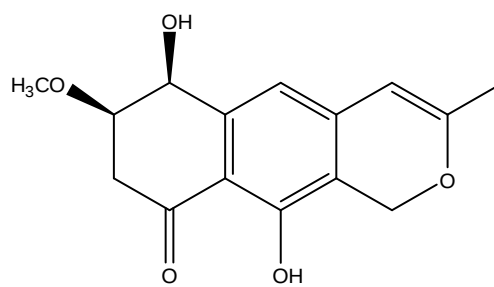
Σαραγοσικό οξύ F



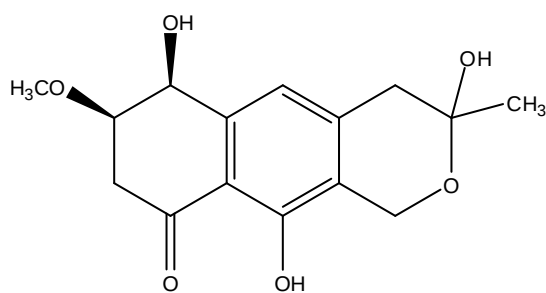
Εικόνα 5



Ascochyta sp.

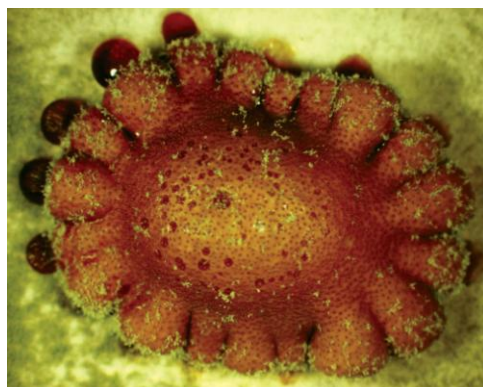


Χρυσανθόνη Β



Χρυσανθόνη C

Εικόνα 6

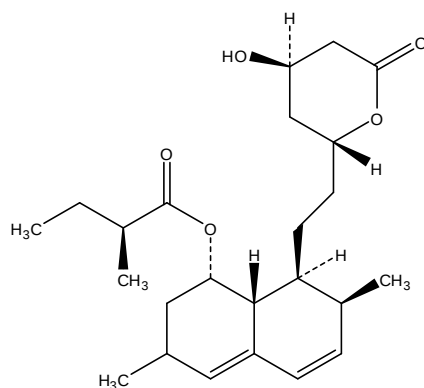


Trichoderma reesei

Εικόνα 7



Monascus sp.

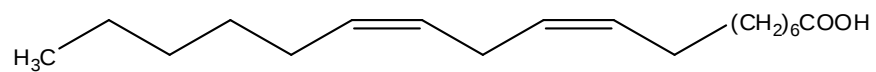


Μεβινολίνη

Εικόνα 8



Chlorosplenium sp.

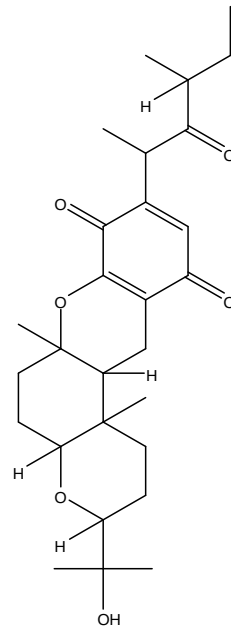


Λινολεϊκό οξύ

Εικόνα 9

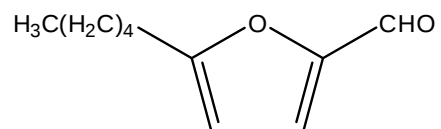


Neobulgaria pura



14-Επικοχλιοκινόνη Β

Εικόνα 10



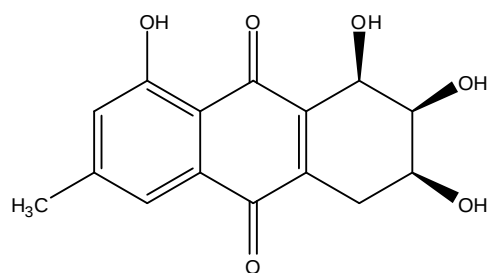
5-Πεντυλο-2-φουραλδεϋδη

Εικόνα 11



Pezizula sp.

Εικόνα 12

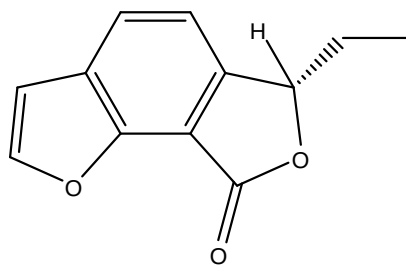


Πλεοσπορίνη

Εικόνα 13



Daldinia concentrica

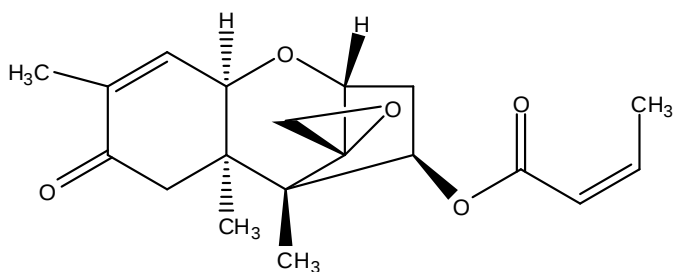


Κονσεντρικολίδιο

Εικόνα 14

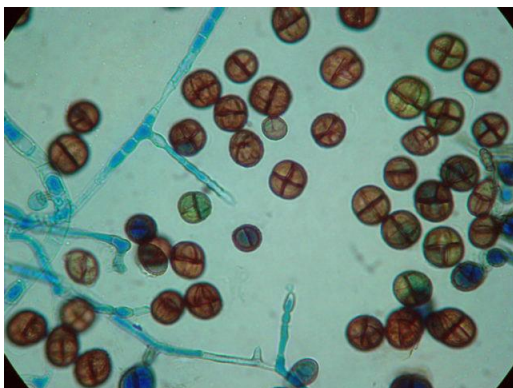


Trichothecium roseum

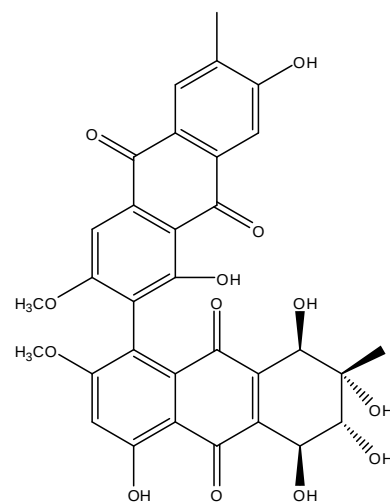


Τριχοθεκίνη

Εικόνα 15



Stemphylium sp.

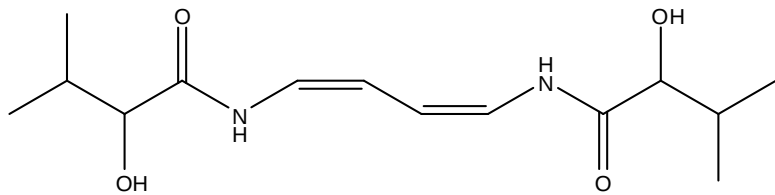


Αλτερπορριόλη G και H

Εικόνα 16

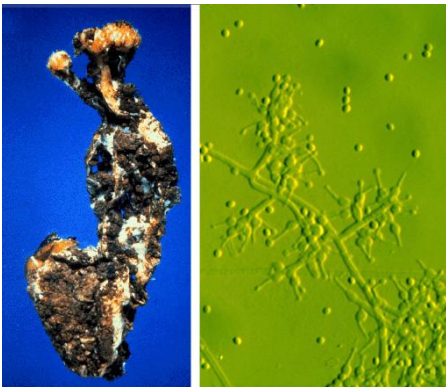


Phomopsis sp.

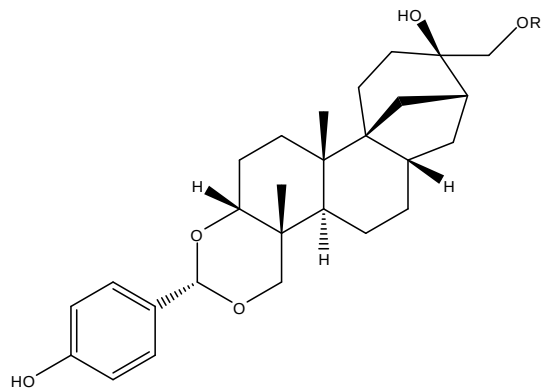


Φομοεναμίδιο

Εικόνα 17



Tolypocladium inflatum



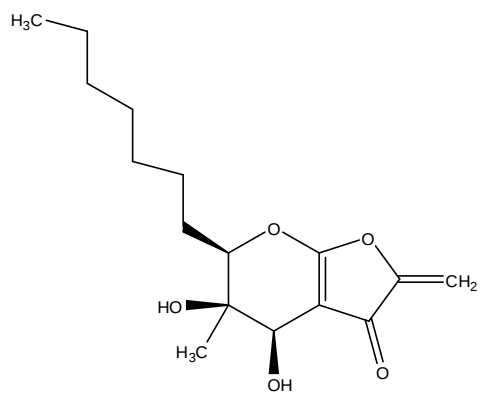
Ινφλατίνη Α, R = H

Ινφλατίνη Β, R = Ac

Εικόνα 18



Mollisia benesuada



Μπενεσουδόνη

Εικόνα 19

Οικογένεια *Xylariaceae*

Η οικογένεια *Xylariaceae* ανήκει στην τάξη *Xylariales* και περιλαμβάνει 85 γένη και 1343 είδη. Τα μέλη της παράγουν σκουρόχρωμα ασκοστρώματα που αποτελούνται από περιθήκια με έγχρωμα ασκοσπόρια. Οι αγενείς μορφές (αναμορφικοί χαρακτήρες) προέρχονται συνήθως από υφές ή καρποφόρα σώματα (πυκνίδια) τα οποία περιέχουν τα αγενή σπόρια ή κονίδια (Kirk *et al.* 2008). Οι οργανισμοί της οικογένειας αυτής είναι είτε σαπροφυτικοί, είτε παθογόνα παράσιτα τα οποία σχετίζονται με ασθένειες του φλοιώματος και ξυλώματος διαφόρων ειδών δέντρων (Webster & Weber 2007).

Τα μέλη της οικογένειας έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς πιθανές βιοδραστικές ιδιότητες, τη χημεία και ταξινόμική τους. Υπάρχουν μονογραφίες για 16 από τα 85 γένη. Τα γένη αυτά είναι τα: *Anthostomella*, *Ascovirgaria*, *Biscogniauxia*, *Creosphaeria*, *Daldinia*, *Discoxylaria*, *Entoleuca*, *Hypoxylon*, *Jumillera*, *Kretzschmaria*, *Kretzschmariella*, *Nemania*, *Rosellinia*, *Stilbohypoxylon*, *Vivantia* και *Whalleya* (Tang *et al.* 2009).

Τα γένη της οικογένειας *Xylariaceae* μπορούν να διαχωριστούν, με βάση τους αναμορφικούς χαρακτήρες, τις χρωστικές των ασκοστρωμάτων και την ύπαρξη άλλων δευτερογενών μεταβολιτών σε δύο υποοικονέειες: *Hypoxylloideae* και *Xylarioideae*. Στην υποοικογένεια *Hypoxylloideae* ανήκουν γένη με αγενείς μορφές τύπου *nodulisporium*, τα οποία παράγουν χρωστικές διαλυτές σε ΚΟΗ. Στην υποοικογένεια *Xylarioideae* ανήκουν γένη με αγενείς μορφές τύπου *geniculosporium*, τα οποία παράγουν χρωστικές αδιάλυτες σε ΚΟΗ:

- ***Hypoxylloideae:*** *Annulohypoxylon*, *Daldinia*, *Entonaema*, *Hypoxylon*
- ***Xylarioideae:*** *Entoleuca*, *Euepoxylon*, *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia*, *Stilbohypoxylon*, *Whalleya*, *Xylaria* (Tang *et al.* 2009).

Πρόσφατες πολυγονιδιακές φυλογενετικές αναλύσεις βασίστηκαν σε μεμονωμένες και συνδυασμένες αλληλουχίες DNA των γονιδίων ITS-5.8S rDNA, LSU rDNA, RPB2 και β-τουμπουλίνης. Τα γονίδια αυτά, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είναι πιο αξιόπιστα στο φυλογενετικό διαχωρισμό των γενών. Έτσι αποδείχτηκε ότι τα γένη *Biscogniauxia* και *Camillea*, τα οποία τοποθετούνταν στην

υποοικογένεια *Hypoxylidae*, δεν ανήκουν σε καμία από τις δύο υποοικογένειες (Tang *et al.* 2009).



Xylaria hypoxylon



Daldinia concentrica



Camillea patouillardii



Kretzschmaria deusta



Rosellinia aquila



Annulohypoxylon multiforme



Biscogniauxia nummularia



Hypoxylon ticinense



Entonaema liquescens

Γένος *Hypoxylon*

Το γένος *Hypoxylon* είναι ένα κοσμοπολίτικο γένος το οποίο περιλαμβάνει πάνω από 130 είδη (Kirk *et al.* 2008). Εξαπλώνεται σε όλες σχεδόν τις χώρες με το μεγαλύτερο αριθμό ειδών να απαντώνται κυρίως στις τροπικές περιοχές. Κάποια είδη εξαπλώνονται σε πολλές χώρες, ενώ κάποια άλλα μόνο στη Βόρειο Εύκρατη ζώνη. Η πλειοψηφία των ειδών αναπτύσσονται στην επιφάνεια φλοιών δέντρων που ανήκουν στα Δικοτυλήδονων. Τα περισσότερα δεν περιορίζονται σε ένα δέντρο-ξενιστή, ενώ κάποια άλλα προτιμούν συγκεκριμένα είδη όπως το *H. fragiforme* το οποίο παρασιτεί σε είδη του γένους *Fagus* και το *H. rubiginosum* σε είδη του γένους *Fraxinus* (Miller 1961).

Το γένος *Hypoxylon* χωρίζεται σε δύο υποομάδες: *Hypoxylon* και *Annulata*. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση την απουσία ή παρουσία, αντίστοιχα, ενός στρώματος ιστού που περικλείει τα περιθήκια. Ορισμένα από τα είδη τα οποία έχουν μελετηθεί βοτανικά είναι (Miller 1961):

- **Υποομάδα *Hypoxylon***

1. *H. aeruginosum* J. H. Miller
2. *H. carneum* Petch
3. *H. fragiforme* (Pers.: Fr.) J. Kickx fil.

Εξαπλώνεται στην Κεντρική και Βόρειο Ευρώπη, στον Καναδά, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στην Κολομβία και στην Παραγουάη.

4. *H. fuscum* (Pers.: Fr.) Fr.

Εξαπλώνεται στην Κεντρική και Βόρειο Ευρώπη, στον Καναδά, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στην Κίνα και στην Ιαπωνία.

5. *H. hypomiltum* Mont.

Εξαπλώνεται στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στη Νότιο Αμερική και στην Αφρική.

6. *H. macrocarpum* Pouzar
7. *H. rubiginosum* (Pers.: Fr.) Fr.

Εξαπλώνεται σε όλες τις χώρες.

8. *H. rutilum* Tul. & C. Tul.

Εξαπλώνεται στην Ευρώπη.

- **Υποομάδα *Annulata***

1. *H. archeri* Berk.

Εξαπλώνεται στη Βραζιλία, στην Κίνα, στην Κούβα, στο Πουέρτο Ρίκο και στην Τασμανία.

2. *H. cohaerens* (Pers.: Fr.) Fr.

Εξαπλώνεται στην Κεντρική και Βόρειο Ευρώπη, στον Καναδά, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και στην Ελλάδα.

3. *H. multiforme* (Fr.: Fr.) Fr.

Εξαπλώνεται στη Βόρειο Εύκρατη ζώνη, στον Καναδά, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στην Ευρώπη και στην Ασία.

4. *H. truncatum* (Schwein.: Fr.) J. H. Miller

Εξαπλώνεται στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στην Αφρική, στην Αυστραλία, στη Νότιο Αμερική, στην Κίνα, στην Ινδία και στην Ιαπωνία.

Αναλύσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε αλληλουχίες γονιδίων που κωδικοποιούν την β -τουμπουλίνη και την α -ακτίνη κατέληξαν στη δημιουργία του νέου γένους *Annulohypoxylon*, στο οποίο περιλαμβάνονται τα είδη τα οποία προηγουμένως τοποθετούνταν στην υποομάδα *Annulata* του γένους *Hypoxylon* (Hsieh *et al.* 2005).



Hypoxylon fragiforme



Hypoxylon rubiginosum



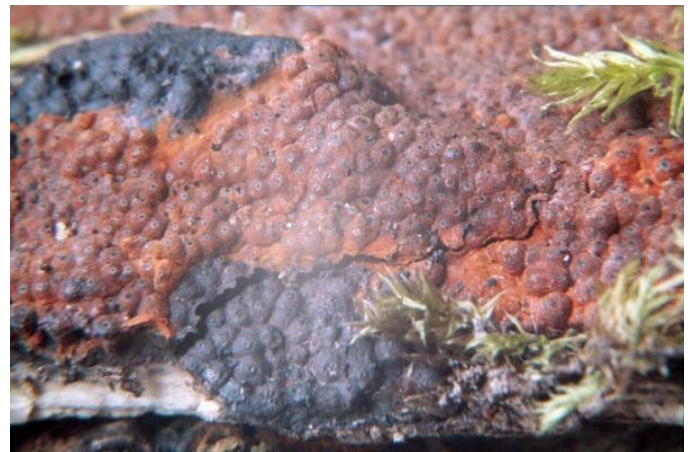
Hypoxylon fuscum



Hypoxylon hypomiltum



Hypoxylon macrocarpum



Hypoxylon rutilum



Hypoxylon carneum



Annulohypoxylon archeri



Annulohypoxylon multiforme



Annulohypoxylon truncatum



Annulohypoxylon cohaerens

Μορφολογία *Hypoxylon* spp.

Στρώματα κυρτά, πεπλατυσμένα, διογκωμένα στη βάση ή ημισφαιρικά, καθορισμένα ή διάχυτα, τα οποία εκφύονται από κορμό, με ελάχιστα ή καλώς ανεπτυγμένο, αλλά όχι καθορισμένο ενδόστρωμα σαρκώδες, ξυλώδες ή ανθρακούχο, με έγχρωμο ή μελανό εξώστρωμα. Περιθήκια εμβυθισμένα στην περιφέρεια του στρώματος, ημισφαιρικά ή γωνιώδη, με λεπτές παραφύσεις στην οστίολη, με ασκούς διεσπαρμένους στη βάση και στα τοιχώματα οι οποίοι συγκρατούνται με νηματοειδείς παραφύσεις (Miller 1961).

Ασκοί κυλινδρικοί με πολυστρωματικό τοίχωμα, ελαφρώς πεπαχυσμένο στην κορυφή, με φαρδύ πόρο. Ασκοσπόρια οκτώ, μονοκύτταρα, ημισφαιρικά ή ελλειπτικά με λείο τοίχωμα, καστανά έως σκουρόχρωμα, με διαμήκη πόρο (Miller 1961).

Κονidioφόρα διακλαδισμένα, προερχόμενα από υφές, διαφανή έως καστανοπράσινα. Κονίδια μικροσκοπικά, συνεχή, διαφανή, με κορυφαία ανάπτυξη στο εκτεθειμένο εξώστρωμα, τα οποία στη συνέχεια γίνονται πλευρικά λόγω συμποδιακής ανάπτυξης των υφών (Miller 1961).

Μορφολογία *H. fragiforme* (Pers.: Fr.) J. Kickx fil.

Στρώματα σφαιρικά έως ημισφαιρικά, διαμέτρου 2-15 mm, ύψους 2-8 mm, μεμονωμένα ή συμφυόμενα, με ανώμαλη επιφάνεια. Νεαρά στρώματα χρώματος ρόδινου το οποίο μετατρέπεται σε καστανοκόκκινο στα ώριμα και στη συνέχεια σε μαύρο, υφής σαρκώδους έως ξυλώδους, με γυαλιστερό, σκουρόχρωμο ενδόστρωμα (Miller 1961).

Περιθήκια ημισφαιρικά, διαμέτρου 4-8 mm. Ασκοί κυλινδρικοί διαστάσεων 70-85 x 7-9 μ, με στενό στέλεχος μήκους 60-70 μ. Ασκοσπόρια διατεταγμένα σε σειρά, ανομοιογενώς ελλειπτικά, σκουρόχρωμα στην ωριμότητα, διαστάσεων 11-15 x 5-7 μ (Miller 1961).

Κονίδια μικροσκοπικά, διαφανή, διαστάσεων 5 x 3 μ, που σχηματίζουν ένα ανοιχτό καστανοκίτρινο στρώμα (Miller 1961).



Αγενείς μορφές *H. fragiforme*



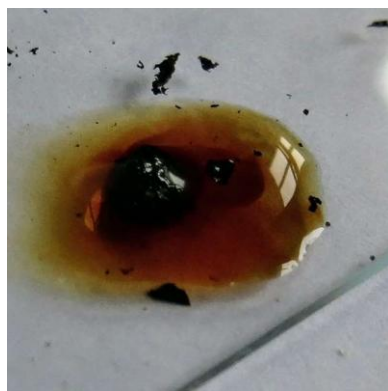
Στρώματα σε ωριμότητα



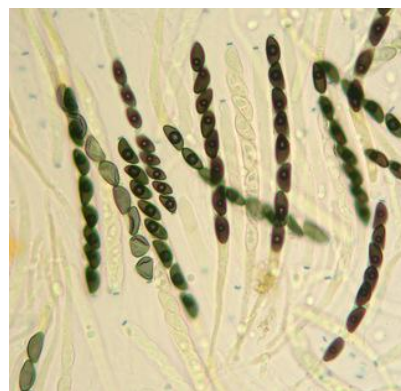
Στρώματα σε ωριμότητα



Στρώμα με περιθήκια



Χρωστικές διαλυτές σε KOH



Ασκοσπόρια

Ιστορική αναδρομή

Ο Bulliard το 1791 περιέγραψε το γένος *Hypoxylon* στο οποίο περιέλαβε 16 είδη, 11 από τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται πλέον στο γένος. Ο Persoon το 1801 περιέγραψε είδη *Hypoxylon* ως είδη του γένους *Sphaeria*. Την ταξινόμηση αυτή συνέχισε και ο Fries το 1823 στο δεύτερο τόμο του συγγράμματος *Systema Mycologicum*. Τα είδη ήταν διάσπαρτα σε 27 ομάδες και ο Fries χρησιμοποίησε το όνομα *Hypoxylon* για να υποδείξει σειρές σε ορισμένες ομάδες (Miller 1961).

Ο Greville στο σύγγραμμα *Scottish Cryptogamic Flora* χρησιμοποίησε το όνομα *Hypoxylon* για να περιγράψει 7 είδη, από τα οποία μόνο τα 2 εξακολουθούν να περιλαμβάνονται στο γένος. Στη συνέχεια τοποθέτησε τα είδη αυτά στο γένος *Sphaeria*. Ο Schweinitz το 1832 ακολούθησε το ταξινομικό σύστημα του Fries και περιέγραψε είδη *Hypoxylon* που ανακαλύφθηκαν στη Βόρειο Αμερική ως είδη *Sphaeria*. Ο Kickx το 1835 μετέφερε 13 είδη στο γένος *Hypoxylon*, από τα οποία 5 ανήκουν ακόμα στο γένος. Ο Montagne το 1838-42 τοποθέτησε στο γένος 14 είδη τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Xylariaceae*, άλλα μόνο 2 ανήκουν ακόμα στο γένος *Hypoxylon* (Miller 1961).

Ο Fries το 1849 στο σύγγραμμά του *Summa Vegetabilium Scandinaviae* οριοθέτησε το γένος *Hypoxylon* για πρώτη φορά μετά το έργο του Bulliard και το χώρισε σε τμήματα. Πολλά από τα είδη που υπέδειξε ο Fries υπάρχουν ακόμα στο γένος και το έργο του θεωρείται ως το σημείο εκκίνησης για το γένος *Hypoxylon* (Miller 1961).

Ορισμένα είδη *Hypoxylon* μεταφέρθηκαν σε άλλα γένη όπως το *H. concentricum* (Bolt ex Fr.) Grev. το οποίο τοποθετήθηκε το 1863 από τους Cesati και De Notaris στο γένος *Daldinia*, λόγω των χαρακτηριστικών ομόκεντρων ζωνών στα στρώματα οι οποίες δεν συναντώνται στο γένος *Hypoxylon* (Miller 1961).

Ανάπτυξη

Όλα τα είδη του γένους *Hypoxylon* είτε σαπροφυτούν, είτε παρασιτούν σε κορμούς δέντρων. Συνήθως η μόλυνση με τα είδη αυτά ξεκινά σε ζων δέντρο το οποίο έχει αποδυναμωθεί από ξηρασία ή άλλες καιρικές συνθήκες. Κάποια είδη όπως το *H. mediterraneum* αναπτύσσονται μετά από φωτιά, ενώ κάποια άλλα όπως το *H. atropunctatum* μετά από ξηρασία ή τραυματισμό της ρίζας. Τα ώριμα περιθήκια συναντώνται σε νεκρό φλοιό στο τέλος του καλοκαιριού ή το φθινόπωρο (Miller 1961).

Μετά την εκβλάστηση των ασκοσπορίων οι υφές διακλαδίζονται και διαπερνούν το φλοιό και το ξύλωμα. Στη συνέχεια το πλέγμα των υφών διογκώνεται, διαρρηγνύει τον ιστό και με σύμπτυση δημιουργείται το στρώμα. Το εξωτερικό περίβλημα του ώριμου στρώματος ονομάζεται εξώστρωμα και καλύπτει τον εσωτερικό ιστό που ονομάζεται ενδόστρωμα. Μετά τη διάρρηξη του φλοιού το εξώστρωμα καλύπτεται από κονίδια. Εάν η αρχική μόλυνση συμβεί φθινόπωρο ή χειμώνα, το στρώμα των κονιδίων εμφανίζεται το επόμενο καλοκαίρι και το στρώμα των περιθηκίων το μεθεπόμενο φθινόπωρο (Miller 1961).

Τα είδη του γένους *Hypoxylon* παράγουν ένζυμα τα οποία διασπούν τη λιγνίνη και προκαλούν αποσύνθεση του υποστρώματος πάνω στο οποίο αναπτύσσονται. Από τα πιο παθογόνα είδη είναι το *H. mammatum* το οποίο προκαλεί έλκη σε λεύκες (*Populus tremuloides*) στη βόρεια Αμερική. Άλλα γνωστά είδη είναι το *H. fragiforme* το οποίο παρασιτεί σε είδη του γένους *Fagus*, το *H. multiforme* σε είδη του γένους *Betula*, το *H. rubiginosum* σε είδη του γένους *Fraxinus* (Webster & Weber 2007) και το είδος *H. atropunctatum* σε είδη του γένους *Quercus* (Conway & Andrews 1986).

Παράγοντες που ευθύνονται για την αποδυνάμωση των ξενιστών και την επακόλουθη μόλυνσή τους με τα είδη του γένους *Hypoxylon* είναι τυχόν πληγές από έντομα, πτηνά ή αποκοπή κλάδων, η φυσιολογία του ξενιστή, η παραγωγή αμυντικών συστατικών, η παρουσία άλλων μικροοργανισμών και η παραγωγή φυτοαλεξινών. Αφού προκύψει η μόλυνση, παράγοντες όπως η παραγωγή τοξινών, η ξηρασία και οι αμυντικοί μηχανισμοί καθορίζουν την εξάπλωση των μυκήτων (Ostry & Anderson 2009).

Σε έρευνες που έγιναν πάνω σε υγιή κλαδιά δέντρων τα οποία έχουν επαρκή επίπεδα υγρασίας δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη μυκήτων του γένους *Hypoxylon*. Εάν όμως τα κλάδια έχουν χάσει ένα ποσοστό από την υγρασία τους, τότε σε διάστημα τριών εβδομάδων παρατηρούνται κηλίδες αποχρωματισμού στην επιφάνεια του φλοιού. Οι μύκητες είναι παρόντες στο φλοιό υγιών δέντρων και η ανάπτυξή τους ελέγχεται από τα υψηλά επίπεδα υγρασίας. Σε περιπτώσεις ξηρασίας οι μύκητες αναπτύσσονται γρήγορα και μολύνουν το φυτό (Webster & Weber 2007).

Η έλλειψη γνώσεων για τον τρόπο με τον οποίο τα είδη αυτά διασπείρονται και μολύνουν τα δέντρα καθιστούν αδύνατη την ύπαρξη μέτρων ελέγχου της ασθένειας και οι προσπάθειες εξάλειψής της είναι ανεπιτυχείς. Ο τακτικός έλεγχος του φλοιού των δέντρων και η απομάκρυνση εκείνων που έχουν προσβληθεί βοηθά στον περιορισμό της εξάπλωσης της ασθένειας (Anderson *et al.* 1997).



Hypoxylon mammatum



Hypoxylon atropunctatum

Δρογοχημεία

Τα γένος *Hypoxylon* περιλαμβάνει πολλές χημικές κατηγορίες όπως αζαφιλονικά παράγωγα, παράγωγα ναφθαλενίου, κυτοχαλασίνες, τερπένια και άλλα.

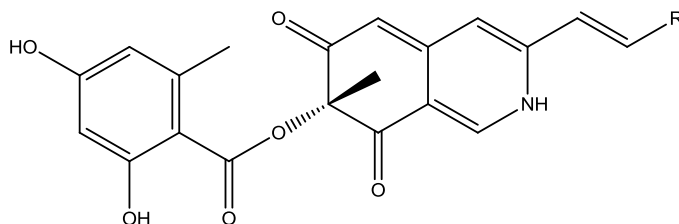
1. Αζαφιλονικά παράγωγα

Οι αζαφιλόνες αποτελούν μια δομικά πολυποίκιλη τάξη δευτερογενών μεταβολιτών οι οποίοι παράγονται από μύκητες. Είναι παράγωγα πολυκετιδίων με σκελετό πυρόνης-κινόνης, οξυγονωμένο δικυκλικό πυρήνα και χειρόμορφο κέντρο. Οι αζαφιλόνες αντιδρούν με αμίνες όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα και νουκλεϊκά οξέα, σχηματίζοντας κόκκινες ή ιώδεις γ-πυριδόνες οι οποίες περιέχουν βινυλικές ομάδες. Οι αζαφιλόνες ανάλογα με τη δομή τους χωρίζονται σε υποκατηγορίες (Osmanova *et al.* 2010):

- I. Δικυκλικές αζαφιλόνες με αλειφατική πλευρική αλυσίδα όπως η ρουμπιγκινοσίνη C που έχει απομονωθεί από το *H. rubiginosum* (Osmanova *et al.* 2010).
- II. Δικυκλικές αζαφιλόνες με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και αρωματικό δακτύλιο όπως η κοχαερίνη A και B που έχουν απομονωθεί από το *H. cohaerens* και η κοχαερίνη F από το *A. cohaerens* (Osmanova *et al.* 2010).
- III. Δικυκλικές αζαφιλόνες με ο-ορσελλινικό οξύ ή παράγωγα αυτού όπως: i) η εντοναεμίνη A που έχει απομονωθεί από το *H. rubiginosum*, ii) η υπομιλτίνη που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. hypomiltum*, *H. intermedium*, *H. perforatum*, *H. trugodes* και *H. piceum*, iii) η (-)-μιτορουμπρίνη που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *H. fuscum*, *H. haematostroma*, *H. howeianum*, *H. pilgerianum*, *H. rubiginosum*, *H. subcrocopeplum*, *H. subgilvum*, *H. subbrutiloides*, *H. subticinense* και *H. ticinense*, iv) το μιτορουμπρινικό οξύ που έχει απομονωθεί από το *H. fragiforme*, v) η μιτορουμπρινόλη που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. aucklandiae*, *H. crocopeplum*, *H. dihgleyae*, *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *haematostroma*, *H. howeianum*, *H. julianii*, *H. laschii*, *H. rutilum*, *H. subcrocopeplum*, *H. subgilvum*, *H. subticinense* και *H. ticinense*, vi) η 3'-

ακετυλο-μιτορουμπρινόλη που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. fragiforme*, *H. howeianum*, *H. pilgerianum* και *H. isubticiense*, vii) η ρουμπιγκινοσίνη Α που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. dihgleyae*, *H. julianii*, *H. laschii*, *H. rubiginosum*, *H. rutilum*, και *H. subticinense* και viii) η ρουμπιγκινοσίνη Β που έχει απομονωθεί από το *H. rubiginosum* (Osmanova *et al.* 2010).

- IV. Διμερείς αζαφιλόνες με ομάδα ο-ορσελλινικού οξέος όπως η ρουτιλίνη Α και Β που έχουν απομονωθεί από το *H. rutilum* (Osmanova *et al.* 2010).
- V. Δικυκλικές σπειρο-αζαφιλόνες όπως η νταλντινίνη C που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. rubiginosum* και *H. fuscum* και οι νταλντινίνες Ε και F που έχουν απομονωθεί από το *H. fuscum* (Osmanova *et al.* 2010).
- VI. Αζαφιλόνες με λακτονικό δακτύλιο όπως η κοχαερίνη C, D και Ε που έχουν απομονωθεί από το *A. cohaerens* και οι μουλτιφορμίνες Α, Β, C και D που έχουν απομονωθεί από το *H. multiforme* (Osmanova *et al.* 2010).
- VII. Παράγωγα μιτορουμπραμίνης τα οποία έχουν σκελετό 4-πυριδόνης και αποτελούν ταυτομερείς ενώσεις των παραγώγων της μιτορουμπρίνης. Προέρχονται από την αντίδραση των αζαφιλονικών χρωστικών τύπου μιτορουμπρίνης με την ομάδα αζώτου αμινών. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται η μιτορουμπραμίνη, η μιτορουμπραμινόλη, το μιτορουμπραμινικό οξύ και η 3'-ακετυλο-μιτορουμπραμινόλη που έχουν απομονωθεί από το *H. fragiforme* (Svilar *et al.* 2012).



Μιτορουμπραμίνη, R= CH₃

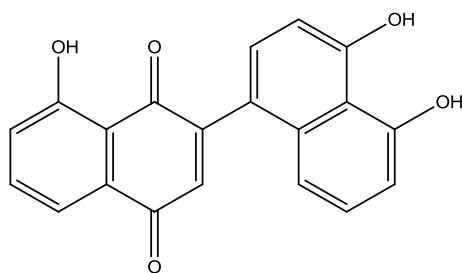
Μιτορουμπραμινικό οξύ, R= COOH

Μιτορουμπραμινόλη, R= CH₂OH

3'-Ακετυλο-μιτορουμπραμινόλη, R= CH₂OCOCH₃

2. Παράγωγα ναφθαλενίου

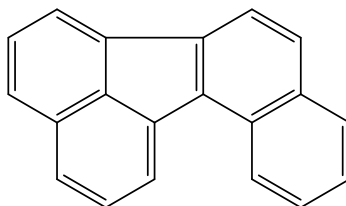
- I. Το 4,5,4',5'-τετραϋδροξυ-1,1'-διναφθύλιο (BNT) έχει απομονωθεί από τα είδη *H. aucklandiae*, *H. fendleri*, *H. haematostroma*, *H. pilgerianum*, *H. fuscum*, *H. fuscopurpureum*, *H. notatum*, *H. carneum*, *H. investiens*, *H. lenormandii*, *H. macrocarpum*, *H. monticulosum*, *H. subcortiseum*, *H. subrutilum*, *H. tortisporum* (Hellwig *et al.* 2005), *H. annulatum*, *H. archeri*, *H. atroroseum*, *H. bovei*, *H. bovei* var. *microspora*, *H. cohaerens*, *H. cohaerens* var. *microsporum*, *H. gombakense*, *H. hians*, *H. ilanense*, *H. leptascum* var. *macrosporum*, *H. michelianum*, *H. moriforme*, *H. moriforme* var. *microdiscus*, *H. multiforme*, *H. multiforme* var. *alaskense*, *H. nitens*, *H. nothofagi*, *H. pyriforme*, *H. pürpureonitens*, *H. stygium*, *H. stygium* var. *annulatum*, *H. thoursianum*, *H. thoursianum* var. *macrosporum*, *H. truncatum* και *H. wceolatum* (Quang *et al.* 2005a).
- II. Η 8-μεθοξυ-1-ναφθόλη έχει απομονωθεί από το *H. placentiforme* (Stadler & Fournier 2006).
- III. Η (4S)-5,8-διϋδροξυ-4-μεθοξυ-α-τετραλόνη έχει απομονωθεί από το *H. truncatum* (Gu *et al.* 2007).
- IV. Η υποξυλόνη η οποία είναι παράγωγο ναφθυλο-ναφθοκινόνης, έχει απομονωθεί από το *H. sclerophaeum* (Bodo *et al.* 1983).



Υποξυλόνη

- V. Η νταλντινάλη Α η οποία είναι παράγωγο βενζοφαινόνης, έχει απομονωθεί από τα είδη *H. fuscum* (Mühlbauer *et al.* 2002), *H. fuscopurpureum* (Quang *et al.* 2004a) και *H. symphyon* (Stadler & Fournier 2006).

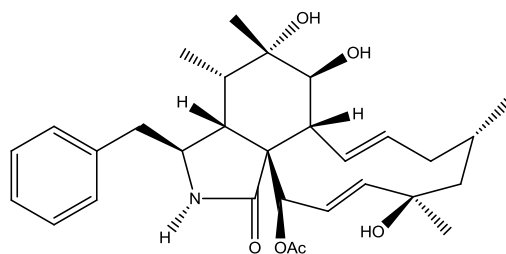
VI. Παράγωγα βενζο-[j]-φλουορανθενίου όπως: i) η νταλντινόνη A που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. monticulosum*, *A. moriforme*, *A. placentiforme* (Stadler & Fournier 2006), *H. bovei*, *H. bovei* var. *microspora*, *H. pyriforme*, *H. stygium* και *H. stygium* var. *annulatum* (Quang *et al.* 2005a), ii) η νταλντινόνη C και D που έχουν απομονωθεί από το *H. truncatum* IFB-18 (Gu *et al.* 2007), iii) η τρουγκατόνη που έχει απομονωθεί από τα είδη *H. annulatum*, *H. bovei* var. *microspora*, *H. moriforme*, *H. nitens*, *H. stygium*, *H. stygium* var. *annulatum*, *H. thoursianum*, *H. thoursianum* var. *macrosporum* και *H. truncatum* (Quang *et al.* 2005a) και iv) η υποξυλονόλη A, B, C, D, E και F που έχουν απομονωθεί από το *H. truncatum* (Fukai *et al.* 2012).



Βενζο-[j]-φλουορανθενίο

3. Κυτοχαλασίνες

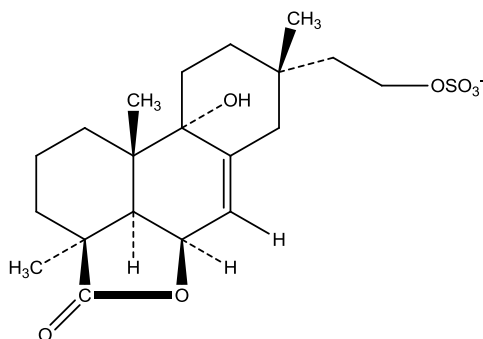
Οι κυτοχαλασίνες είναι τοξίνες μυκήτων που σχετίζονται μεταξύ τους λόγω της χημικής τους δομής, η οποία χαρακτηρίζεται από πολυ-υποκατεστημένο, υδρογονωμένο δακτύλιο ισο-ινδολίου, ενωμένου με μακροκυκλικό δακτύλιο (Dombrowski *et al.* 1992). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν i) η κυτοχαλασίνη H και οι φρατζιφορμίνες A και B που έχουν απομονωθεί από το *H. fragiforme* (Stadler *et al.* 2006) ii) η 18-δεϋδροξυ-κυτοχαλασίνη H που έχει επίσης απομονωθεί από το *H. fragiforme* (Dombrowski *et al.* 1992) και iii) οι κυτοχαλασίνες C, D, N, O, P, Q και R που έχουν απομονωθεί από το *H. terricola* Mill. (Edwards *et al.* 1989).



Κυτοχαλασίνη P

4. Τερπένια

Παράγωγα του πιμαρανίου όπως οι φυτοτοξικές ουσίες χυματοξίνες A, B, C, D και E έχουν απομονωθεί από το *H. mammatum* (Borgschulte *et al.* 1991) και οι χυματοξίνες K και L που επίσης έχουν απομονωθεί από το *H. mammatum* (Jossang *et al.* 1995).



Χυματοξίνη A

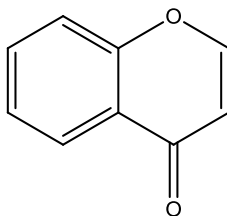
Διτερπένια με τετρακυκλικό πυρήνα όπως η σορδαρίνη και το παράγωγό της υποξυσορδαρίνη έχουν απομονωθεί από το *H. croceum* (Daferner *et al.* 1999).

Διτερπένια με πυρήνα ινδολίου όπως ανάλογα του νοδουλισπορικού οξέος έχουν απομονωθεί από το *H. pulicicidum* (Bills *et al.* 2012).

Σεσκιτερπένια τρικυκλικά όπως η πουνκταπορονίνη B έχει απομονωθεί από το *H. terricola* Mill. (Edwards *et al.* 1989).

5. Χρωμόνες

Το λεπραρικό οξύ έχει απομονωθεί από το *H. aeruginosum* (Læssøe *et al.* 2010) και η αλτεχρωμόνη Α από το *H. truncatum* (Gu *et al.* 2007).

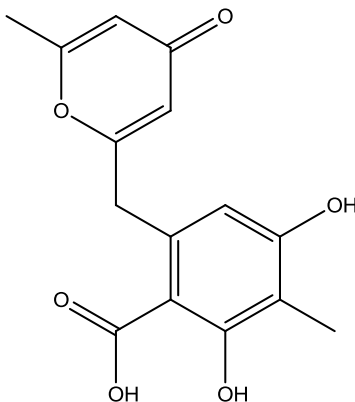


Χρωμόνη

6. Πολυκετίδια

Τα καρνεϊκά οξέα Α και Β τα οποία είναι πολυκετιδικά αντιβιοτικά, έχουν απομονωθεί από το *H. carneum* (Quang *et al.* 2006a).

Οι μακροκαρπώνες Α, Β και C οι οποίες είναι αρωματικά πολυκετίδια, έχουν απομονωθεί από το *H. macrocarpum* (Mühlbauer *et al.* 2002).

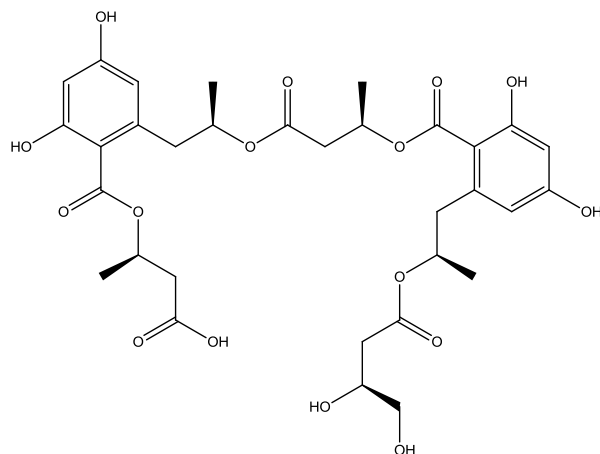


Μακροκαρπώνη Α

7. Πολυεστέρες

Μακροκυκλικοί πολυεστέρες, όπως τα λακτίδια 15G256α, 15G256α-1, 15G256β, 15G256ι και 15G256ω έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες του *H. oceanicum* (LL-15G256) (Schlingmann *et al.* 2002).

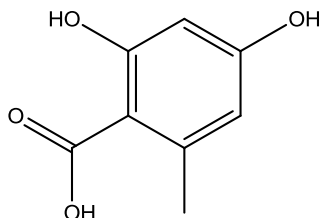
Γραμμικοί πολυεστέρες, όπως τα λακτίδια 15G256ο, 15G256α-2, 15G256β-2, 15G256ν και 15G256π έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες του *H. oceanicum* (LL-15G256) (Schlingmann *et al.* 2002).



Λακτίδιο 15G256α-2

8. Άλλα

Το ορσελλινικό οξύ το οποίο είναι φαινολικό οξύ, έχει απομονωθεί από τα *H. hypomiltum*, *H. perforatum*, *H. intermedium*, *H. trugodes*, *H. aucklandiae*, *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *H. haematostroma*, *H. howeianum*, *H. pilgerianum*, *H. subcrocopeplum*, *H. subgilvum*, *H. subgilvum* var. *microsporum*, *H. subbrutlloides*, *H. tacinense*, , *H. crocopeplum*, *H. dihgleyae*, *H. juliani*, *H. laschii*, *H. rubiginosum*, *H. rutilum*, *H. subtacinense* (Hellwig *et al.* 2005) και *H. carneum* (Quang *et al.* 2006a).

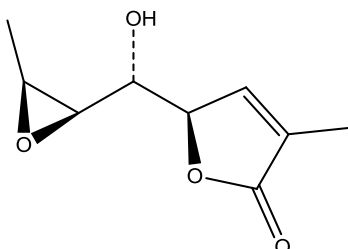


Ορσελλινικό οξύ

Η μελλεΐνη η οποία είναι παράγωγο διϋδροϊσοκουμαρίνης, έχει απομονωθεί από τα *H. cohaerens*, *H. fragiforme*, *H. howeianum*, *H. multiforme* και *H. rubiginosum* (Stadler *et al.* 2001).

Η τσεστερσιένη η οποία είναι αρωματικό παράγωγο αλλενικού αιθέρα, έχει απομονωθεί από το *H. chestersii* (Edwards *et al.* 1982).

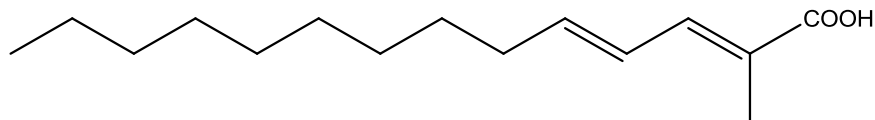
Η υποξυλακτόνη η οποία είναι παράγωγο γ-λακτόνης, έχει απομονωθεί από το *H. croceum* (Daferner *et al.* 1999).



Υποξυλακτόνη

Η υποξυζυλερόνη η οποία είναι παράγωγο βενζο-[b,h]-ξανθενόνης, έχει απομονωθεί από το *H. fragiforme* (Edwards *et al.* 1991).

Το ρουμπιγκινοσικό οξύ το οποίο είναι παράγωγο λιπαρού οξέος, έχει απομονωθεί από το *H. rubiginosum* (Quang *et al.* 2004b).



Ρουμπιγκινοσικό οξύ

Τα λιποδεψιπεπτίδια 15G256γ, 15G256δ και 15G256ε τα οποία κυκλικά λιποπεπτίδια, έχουν απομονωθεί από το *H. oceanicum* (LL-15G256) (Schlingmann *et al.* 1998).

Η (+)-α-μεθυλεν-α-φεγχοκαμφορόνη η οποία είναι παράγωγο ακόρεστης κετόνης, έχει απομονωθεί μαζί με την 1,8-κινεόλη και το 1-μεθυλ-1,4-κυκλοεξαδιένιο από ένα ενδοφυτικό είδος του γένους *Hypoxylon* (Tomscheck *et al.* 2010).

Με βάση τους απομονωμένους μεταβολίτες, τα είδη του γένους *Hypoxylon* χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη διαφορετικών χημειότυπων. Τα είδη του τμήματος *Annulata* έχουν ως κύριο μεταβολίτη το 4,5,4',5'-τετραϋδροxy-1,1'-διναφθύλιο (BNT) και μπορούν να χωριστούν σε δύο χημειότυπους:

1. **Χημειότυπος 1:** Είδη που περιέχουν το μεταβολίτη τρουνκατόνη, όπως το *H. annulatum*.
2. **Χημειότυπος 2:** Είδη που περιέχουν BNT, κοχαερίνες και μουλτιφορμίνες, όπως τα *H. cohaerens* και *H. multiforme* (Quang *et al.* 2006a).

Τα είδη του τμήματος *Hypoxylon* μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις χημειότυπους:

1. **Χημειότυπος 1:** Είδη που περιέχουν BNT και μακροκαρπώνες, όπως το *H. macrocarpum*.
2. **Χημειότυπος 2:** Είδη που περιέχουν BNT, νταλντινάλη Α και νταλντινίνες, όπως τα *H. fuscum* και *H. fuscopurpureum*.
3. **Χημειότυπος 3:** Είδη που περιέχουν BNT και μη ταυτοποιημένους μεταβολίτες όπως το *H. subrutilum*.
4. **Χημειότυπος 4:** Είδη που περιέχουν παράγωγα μιτορουμπρίνης και όχι BNT, όπως τα *H. fragiforme*, *H. howeianum*, *H. rubiginosum* και *H. rutilum* (Quang *et al.* 2006a).

Βιολογικές δράσεις

I. Αντιμικροβιακή δράση

Τα αζαφιλονικά παράγωγα εντοναεμίνη A (Εικόνα 20), (+)-3'-ακετυλο-μιτορουμπρινόλη, (+)-μιτορουμπρίνη, (+)-μιτορουμπρινόλη, μιτορουμπρινικό οξύ (Εικόνα 21), νταλντινίνη C (Εικόνα 22), E (Εικόνα 23) και F (Εικόνα 24), ρουμπιγκινοσίνη A-C (Εικόνες 25-27), κοχαερίνη A (Εικόνα 28) και B (Εικόνα 29) και μουλτιφορμίνη A-D (Εικόνες 30-33) εξετάστηκαν ως προς τις αντιμικροβιακές τους δράσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν μέτρια έως ισχυρή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* 95, *Aspergillus niger* και *Candida albicans*. Η δράση αυτή είναι μη εκλεκτική καθώς επηρεάστηκαν τόσο τα βακτήρια, όσο και οι μύκητες (Quang *et al.* 2005c). Επιπλέον, η (-)-μιτορουμπρίνη, η μιτορουμπρινόλη και η 3'-ακετυλο-μιτορουμπρινόλη έχουν δείξει νηματοκτόνο δράση έναντι του *Caenorhabditis elegans*, καθώς και αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis* και *Yarrowia lipolytica*. Αναφέρεται ότι αποτελούν και αντιμυκητιασικούς παράγοντες έναντι νηματωδών μυκήτων (Stadler *et al.* 2006).

Έχει αναφερθεί ότι η (-)-μιτορουμπρίνη αποτελεί μέτριο αναστολέα του ενζύμου γερανυλ-γερανυλ-τρανσφεράση I, η δράση του οποίου είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Συνεπώς η ένωση αποτελεί πιθανό αντιμυκητιασικό παράγοντα (Singh *et al.* 2005).

Οι κοχαερίνες C (Εικόνα 34), D (Εικόνα 35), E (Εικόνα 36) και F (Εικόνα 37) εξετάστηκαν για την ύπαρξη δράσης έναντι στο ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica* και το βακτήριο *Bacillus subtilis*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή, μη εκλεκτική αντιμικροβιακή δράση (Quang *et al.* 2006b).

Οι μουλτιφορμίνες A-D (Εικόνες 30-33), που απομονώθηκαν από το *H. multiforme*, διαθέτουν μέτρια έως ισχυρή και μη εκλεκτική αντιμικροβιακή δράση. Τα Gram (-) στελέχη έδειξαν την ίδια ευαισθησία με τα Gram (+), παρά τη μεγάλη αδιαπερατότητα του κυτταρικού λιποπολυσακχαριδικής φύσεως τοιχώματος τους. Τα πιο ανθεκτικά στελέχη ήταν ο ζυμομύκητας *Candida albicans* και ο νηματώδης

μύκητας *Aspergillus niger*, ωστόσο οι μουλτιφορμίνες B και C έδειξαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση εναντίον τους. Οι μουλτιφορμίνες A και D έδειξαν κυρίως βακτηριοστατική και μυκητοστατική δράση έναντι των *Escherichia coli* και *Salmonella enteritidis*. Η μουλτιφορμίνη D έδειξε εκλεκτική δράση έναντι του *Klebsiella pneumonia*, ενώ η μουλτιφορμίνη A έναντι των *K. pneumonia* και *Staphylococcus aureus*. Η μεγαλύτερη αναστολή έναντι σημαντικών παθογόνων μικροοργανισμών παρατηρήθηκε από τη μουλτιφορμίνη B, με δράση συγκρίσιμη με αυτή των αντιβιοτικών αναφοράς. Η αξιοσημείωτη διαφορά στη δράση των μουλτιφορμινών A και B οφείλεται στην αναγωγή του διπλού δεσμού της θέσης C-8/C-18, που στερεί από το μόριο την ομάδα της α-μεθυλεν-γ-λακτόνης. Αντίστοιχα, η μείωση στη δραστικότητα της μουλτοφορμίνης D εξηγείται λόγω της απώλειας του ακόρεστου καρβονυλίου της θέσης C-11, καθώς και της ύπαρξης υδροξυλομάδας της θέσης C-13 (Quang *et al.* 2005b).

Η βιολογική δράση της κυτοχαλασίνης H, της φραιζιφορμίνης A (Εικόνα 38) και B (Εικόνα 39) που απομονώθηκαν από το *H. fragiforme*, εξετάσθηκε έναντι διαφόρων μικροοργανισμών. Διαπιστώθηκε ότι διαθέτουν μη εκλεκτική νηματοκτόνο δράση έναντι του *Caenorhabditis elegans* και αντιμικροβιακή δράση έναντι μικροοργανισμών όπως *Bacillus subtilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium griseofulvum*, *Stachybotrys charatum*, *Trichoderma atroviridae* και *T. harzianum* με MIC που κυμαίνονταν από 3,1-25 µg/mL, 3,1-50 µg/mL και 3,1-50 µg/mL αντίστοιχα (Stadler *et al.* 2006). Επιπλέον, αναφέρεται ότι η κυτοχαλασίνη H είναι δραστική έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη των *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bipolaris maydis*, *B. sorokiniana*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* και *Rhizoctonia cerealis* (Fu *et al.* 2011).

Η σορδαρίνη και το παράγωγό της υποξυσορδαρίνη (Εικόνα 40) έχουν δείξει υψηλή αντιμυκητιασική δράση έναντι σε ζυμομυκήτων και νηματωδών μυκήτων. Ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην εκλεκτική αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης των μικροοργανισμών (Daferner *et al.* 1999).

In vitro αντιμικροβιακή μελέτη έδειξε ότι η αλτεχρωμόνη A (Εικόνα 41) είχε δράση έναντι των μικροοργανισμών *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas fluorescens και *Candida albicans* με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) 3.9, 3.9, 1.8 και 3.9 µg/mL αντίστοιχα (Gu 2009).

Τα καρνεϊκά οξέα Α και Β (Εικόνα 42) είναι πολυκετιδικά αντιβιοτικά τα οποία συνδέονται δομικά με την φομοψιδίνη, καθώς διαθέτουν ομάδα ελεύθερου πενταδιενικού οξέος και σκελετό δεκαλίνης. Εξετάστηκε η βιολογική δράση αυτών και του ολικού εκχυλίσματος του *H. carneum* έναντι νηματωδών μυκήτων, Gram (+) βακτηρίων και ενός ζυμομύκητα. Τόσο τα καρνεϊκά οξέα, όσο και το ολικό εκχύλισμα έδειξαν ασθενή αντιβακτηριακή και μέτρια αντιμυκητιασική δράση (Quang *et al.* 2006a).

Τα λακτίδια 15G256α, 15G256α-1, 15G256β (Εικόνα 43), 15G256ι και 15G256ω, που έχουν επίσης απομονωθεί από καλλιέργειες του *H. oceanicum* (LL-15G256), έδειξαν ανασταλτική δράση έναντι του μύκητα *Neurospora crassa*. Το λακτίδιο 15G256β είχε την πιο ισχυρή δράση με MIC 0,5 µg/mL. Ακολούθησαν τα λακτίδια 15G256ι και 15G256ω με MIC 2 µg/mL (Schlingmann *et al.* 2002).

Καλλιέργειες του θαλάσσιου μύκητα *H. oceanicum* LL-15G256 έδειξαν ισχυρή αντιμυκητιασική δράση. Απομονώθηκαν τα λιποδεψιπεπτίδια 15G256γ (Εικόνα 44), 15G256δ και 15G256ε που ήταν υπεύθυνα για τη δράση αυτή (Schlingmann *et al.* 1998). Το λιποδεψιπεπτίδιο 15G256γ έδειξε μέτρια δράση έναντι σε φυτοπαθογόνων μυκήτων, καθώς και έναντι παθογόνων μυκήτων που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Ο μηχανισμός δράσης της ουσίας βασίζεται στην αναστολή βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (Albaugh *et al.* 1998).

Εκχύλισμα υγρής καλλιέργειας του *Hypoxylon perforatum* έχει δείξει ισχυρή αντιμυκητιασική δράση έναντι του μύκητα *Sphaeropsis sapinea*. Η δραστική ανασταλτική ουσία του εκχυλίσματος βρέθηκε ότι είναι ο μεθυλεστέρας του *p*-μεθοξυ-κινναμωμικού οξέος που έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην κοσμητολογία (Song & Gao 2009).

Μίγμα πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) από καλλιέργεια ενός ενδοφυτικού είδους του γένους *Hypoxylon* που περιείχε (+)-*α*-μεθυλεν-*α*-φεγχοκαμφορόνη, 1,8-κινεόλη και 1-μεθυλ-1,4-κυκλοεξαδιένιο, εξετάστηκε για να διαπιστωθεί αν διαθέτει ανασταλτική δράση έναντι 10 διαφορετικών μυκητιακών παθογόνων. Διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη συγκέντρωση VOCs και συνεπώς η

μέγιστη αναστολή έγινε την έκτη ημέρα ανάπτυξης της καλλιέργειας. Μεγαλύτερη ευαισθησία έδειξαν είδη του γένους *Phytophthora* και τα είδη *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus fumigates* και *Cercospora beticola*. Το ευρύ φάσμα αντιμυκητιασικής δράσης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ενδοφυτικό αυτό είδος προσφέρει προστασία στον ξενιστή του από παθογόνους οργανισμούς μέσω της παραγωγής VOCs (Tomscheck *et al.* 2010).

II. Ανασταλτική δράση στην παραγωγή NO σε RAW κύτταρα (Αντιφλεγμονώδης δράση)

Εξετάστηκε η ανασταλτική δράση 12 αζαφιλονικών παραγώγων στην αναστολή παραγωγής NO σε κυτταρική σειρά RAW 264.7. Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε τις νταλτινίνες C, E και F (Εικόνες 22-24) και έδειξε ασθενή αναστολή παραγωγής NO. Η μουλτιφορμίνη D (Εικόνα 33) που ανήκε στη δεύτερη ομάδα είχε ισχυρότερη δράση από τις ενώσεις της πρώτης ομάδας. Η τρίτη ομάδα περιλάμβανε τη ρουμπικινοσίνη A και B (Εικόνες 25-26) και την εντοναεμίνη A (Εικόνα 20). Η ρουμπικινοσίνη A έδειξε την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση στην ομάδα (IC_{50} ίση με 2.56 μM), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της ακετοξυ-ομάδας αυξάνει τη δραστικότητα. Η δράση αυτή της ρουμπικινοσίνης A βασίζεται στη μείωση έκφρασης του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της iNOS ισομορφής της συνθάσης του NO. Η τέταρτη ομάδα στην οποία ανήκαν η ρουμπικινοσίνη C (Εικόνα 27) και οι κοχαερίνες A και B (Εικόνες 28-29) έδειξαν ασθενή ανασταλτική δράση. Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έδειξαν οι ρουτιλίνες A (Εικόνα 45) και B (Εικόνα 46) της πέμπτης ομάδας, με τιμές IC_{50} ίσες με 1,76 και 1,80 μM αντίστοιχα (Quang *et al.* 2006c).

Οι κοχαερίνες C (Εικόνα 34), D (Εικόνα 36), E (Εικόνα 36) και F (Εικόνα 37) έχουν δείξει μέτρια δράση στην αναστολή παραγωγής NO σε κυτταρική σειρά RAW 264.7. Οι συγκεντρώσεις IC_{50} ήταν 30.2, 19.6, 26.1 και 41.2 μM αντίστοιχα. Η παρουσία λακτονικού δακτυλίου στο σκελετό των ενώσεων αυτών αυξάνει την ανασταλτική τους δράση (Quang *et al.* 2006b).

Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) αποτελείται από τρεις ξεχωριστές ισομορφές (nNOS, eNOS, iNOS) και καταλύει τη μετατροπή L-αργινίνης και οξυγόνου, σε L-κιτρουλλίνη και μονοξείδιο του αζώτου (NO). Το NO

αντιδρά με υπεροξειδικά ανιόντα σχηματίζοντας ενώσεις τοξικές για τους ιστούς. Διάφορες ενδοτοξίνες που εμπλέκονται σε παθολογικές αποκρίσεις του οργανισμού διεγείρουν την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων NO. Συνεπώς, αναστολή της παραγωγής NO μπορεί να ελέγξει φλεγμονώδεις παθήσεις. Εξετάστηκε η επίδραση της νταλντινάλης A (Εικόνα 47) στην αναστολή παραγωγής NO, που έχει προκληθεί από λιποπολυσακχαρίδιο, σε κυτταρική σειρά λευχαιμικών μονοκυττάρων/μακροφάγων από μύες (κυτταρική σειρά RAW 264.7). Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή ανασταλτική δράση με συγκέντρωση IC₅₀ 15,2 μM (Quang *et al.* 2006d).

Οι χυματοξίνες K και L έχουν εξετασθεί ως προς την ανασταλτική τους δράση στην παραγωγή NO, που έχει προκληθεί από λιποπολυσακχαρίδιο, σε κυτταρική σειρά RAW 264.7. Τα αποτελέσματα έδειξαν οριακή ανασταλτική δράση, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις 100 μM (Wang *et al.* 2012).

III. Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση του 4,5,4',5'-τετραϋδροξυ-1,1'-διναφθύλιου (BNT, Εικόνα 48) προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από τους Quang *et al.* (2004a) με τη μέθοδο DPPH, προσδιορίζοντας την ποσότητα ουσίας που είναι απαραίτητη για να μειωθεί η αρχική δραστική συγκέντρωση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζόλης (DPPH) κατά 50%. Βρέθηκε ότι το BNT έχει την ίδια σχεδόν αντιοξειδωτική δράση με το ασκορβικό οξύ με συγκεντρώσεις IC₅₀ 18,2 και 16,5 μM αντίστοιχα.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DPPH βρέθηκε ότι η 8-μεθοξυ-1-ναφθόλη διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς παγίδευσε το 63,5% των ελευθέρων ριζών και είχε IC₅₀ ίση με 30 μg/mL, ενώ η ένωση αναφοράς 2,6-δι-τερτ-βουτυλ-4-υδροξυτολουένιο είχε IC₅₀ ίση με 20 μg/mL (Rukachaisirikul *et al.* 2007).

Αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα της μελανίνης (HM) που παράγεται από το είδος *Hypoxylon archeri*, το οποίο συμβιώνει με το βασιδιομύκητα *Tremella fuciformis*, έναντι συνθετικής μελανίνης και βιταμίνης C. Μετρήθηκε η αναστολή οξείδωσης του 5-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (TNB) που είχε προκληθεί από υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Σε συγκέντρωση 100 mg/L η μελανίνη HM προστάτησε το 80,95% του TNB από οξείδωση λόγω

H₂O₂, ενώ ήταν λιγότερο αποτελεσματική στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου οι οποίες παράγονται από HOCl. Αποδείχτηκε ότι η μελανίνη HM είναι πολύ αποτελεσματική στην εξάλειψη ελευθέρων ριζών και η δράση της είναι μεγαλύτερη από αυτή της συνθετικής μελανίνης και της βιταμίνης C (Wu *et al.* 2008).

IV. Κυτταροτοξική και αντικαρκινική δράση

Ερευνητές εξέτασαν την κυτταροτοξική δράση της νταλντινόνης C (Εικόνα 49) και D (Εικόνα 50) που απομονώθηκαν από το *H. truncatum* IFB-18 (Εικόνα 1α) συγκρίνοντάς τη με αυτή της 5-φθορο-ουρακίλης. Οι δύο ενώσεις έδειξαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι σειράς ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέως εντέρου (SW1116 κύτταρα) με συγκεντρώσεις IC₅₀ 49,5 και 41,0 μM αντίστοιχα. Η συγκέντρωση IC₅₀ της 5-φθορο-ουρακίλης ήταν 37,0 μM (Gu *et al.* 2007).

Οι υποξυλονόλες D και E (Εικόνα 51) έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από φλέβες και αρτηρίες ανθρώπινου ομφάλιου λώρου (HUVECs και HUAECs αντίστοιχα). Η υποξυλονόλη D είχε τιμές IC₅₀ 6,9 και 6,1 μM αντίστοιχα, για τις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ για την υποξυλονόλη E οι τιμές IC₅₀ ήταν 7,4 και 4,1 μM αντίστοιχα. Ο πολλαπλασιασμός των αρτηριακών ενδοθηλιακών κυττάρων είναι απαραίτητος για την καρκινική αγγειογένεση. Συνεπώς, οι ουσίες αυτές αποτελούν πιθανούς αντικαρκινικούς αγγειογενετικούς παράγοντες (Fukai *et al.* 2012).

Ερευνητές εξέτασαν την ικανότητα πρόσδεσης και αποδέσμευσης της κυτοχλασίνης H σε νημάτια ακτίνης. Η πρόσδεση ανιχνεύτηκε με αύξηση της G-ακτίνης (σφαιρική ακτίνη), ενώ η αποδέσμευση με αύξηση των συντελεστών διάχυσης των νηματίων ακτίνης. Διαπιστώθηκε ότι η κυτοχλασίνη H αναστέλλει τον πολυμερισμό των νηματίων ακτίνης. Διαθέτει ικανότητα τόσο πρόσδεσης, όσο και αποδέσμευσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η δράση της είναι αντιστρεπτή (Urbanik & Ware 1989).

Επιπλέον έχει εξετασθεί η επίδραση της κυτοχλασίνης H σε έμβρυα όρνιθας που αναπτύχθηκαν σε *in vitro* καλλιέργεια. Αποδείχτηκε ότι η ένωση αναστέλλει την πρωτογενή μορφογένεση των εμβρύων και προκαλεί κυτταρική αποσύνθεση. Επιπλέον, αναστέλλει την ανάπτυξη της κεφαλής και μειώνει το μήκος του

σωματικού άξονα. Οι ιστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι μειώνεται η ποσότητα γλυκοπρωτεϊνών και μη σουλφιδικών γλυκοζαμινο-γλυκανών, απαραίτητων για την κυτταρική προσκόλληση (Ghaskadbi & Mulherkar, 1984).

Η κυτοχαλασίνη Η βρέθηκε ότι αποτελεί έναν αποτελεσματικό αναστολέα της κυτταροσκελετικής αναδιοργάνωσης που συμβαίνει στα αιμοπετάλια μετά από ενεργοποίηση με δισφωφορική αδενοσίνη (ADP). Ερευνητές εξέτασαν την επίδραση της κυτοχαλασίνης Η σε διάφορες λειτουργίες των αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας 10 μM ουσίας. Βρέθηκε ότι η κυτοχαλασίνη Η παρεμποδίζει τη φυσιολογική ενσωμάτωση ακτίνης, α -ακτινίνης και πρωτεϊνών στον κυτταροσκελετό και μειώνει σημαντικά την ενσωμάτωση μυοσίνης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αναστολή σύνθεσης αιμοπεταλίων, καθώς και σημαντική αύξηση στο ρυθμό αποσύνθεσής τους. Η αλλαγή στη δομή των αιμοπεταλίων λόγω της ADP ανεστάλη. Συνεπώς, η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση κατέχει σημαντική θέση στη σύνθεση και την αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων (Natarajan *et al.* 2000).

Η κυτοχαλασίνη Η εξετάστηκε για ύπαρξη κυτταροτοξικής δράσης έναντι σειράς ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων K562. Βρέθηκε ότι διαθέτει ισχυρή κυτταροτοξική δράση (τιμή IC_{50} ίση με 10,1 μM), ισχυρότερη από αυτή της 5-φθορο-ουρακίλης που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς (τιμή IC_{50} ίση με 33,0 μM). Η έρευνα έδειξε ότι η παρουσία της ακετόξυ-ομάδας στο άνθρακα 21, σε συνδυασμό με το διπλό δεσμό της θέσης 6-12 στο σκελετό του μορίου, αυξάνει τη δραστικότητα (Xu *et al.* 2009). Επιπλέον, η κυτοχαλασίνη Η έδειξε ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι κυτταρικής σειράς KB (επιδερμικά στοματικά καρκινικά κύτταρα) και KBv200 με τιμή IC_{50} μικρότερη από 1,25 μM (Tao *et al.* 2008).

V. Φυτοτοξική δράση

Οι χυματοξίνες A, B, C, D και E είναι φυτοτοξικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες του *H. mammatum*, το οποίο προκαλεί έλκη σε δέντρα του είδους *Populus tremuloides*. Οι τοξίνες αυτές διαχέονται στους ιστούς του ξενιστή προκαλώντας νέκρωση των φύλλων και του φλοιού, καθώς και αναστολή ανάπτυξης του καμβίου (Borgschulte *et al.* 1991). Από τις ίδιες

καλλιέργειες απομονώθηκαν οι επίσης φυτοτοξικές ενώσεις χυματοξίνες K και L (Jossang *et al.* 1995).

VI. Εντομοκτόνος δράση

Τα νοδουλισπορικά οξέα είναι μεταβολίτες μυκήτων οι οποίοι έχουν δείξει ισχυρή και αποτελεσματική δράση έναντι αρθρόποδων που τρέφονται με αίμα (όπως ψύλλοι, κρότωνες, κοριοί). Η δράση εκδηλώνεται μέσω πρόσδεσης των μεταβολιτών σε ειδικούς διαύλους χλωρίου των αρθρόποδων. Πηγή των νοδουλισπορικών οξέων αποτελούν αγενή στελέχη ενδοφυτικών μυκήτων που έχουν αναγνωριστεί ως είδη του γένους *Nodulisporium*. Μελέτες που έγιναν σε αλληλουχίες γονιδίων έδειξαν ότι τα είδη αυτά ταυτίζονται με την αγενή μορφή ενός είδους του γένους *Hypoxylon*, για το οποίο προτάθηκε η ονομασία *H. pulicicidum* (Bills *et al.* 2012).

VII. Άλλες δράσεις

Η μιτορουμπρίνη και η μιτορουμπρινόλη, λόγω της ιδιότητάς τους ως χρωστικές, εξετάζονται από ερευνητές για πιθανή χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων (Mapari *et al.* 2005).

Το (-)-μιτορουμπρινικό οξύ προάγει την παραγωγή χλαμυδοσπορίων (αγενή σπόρια) στο μύκητα *Cochliobolus lunatus* (Natsume *et al.* 1985). Επιπλέον αναστέλλει τη δράση του ενζύμου θρυψίνη έχοντας τιμή IC_{50} ίση με 41.05 μM (Lešoná *et al.* 2000).

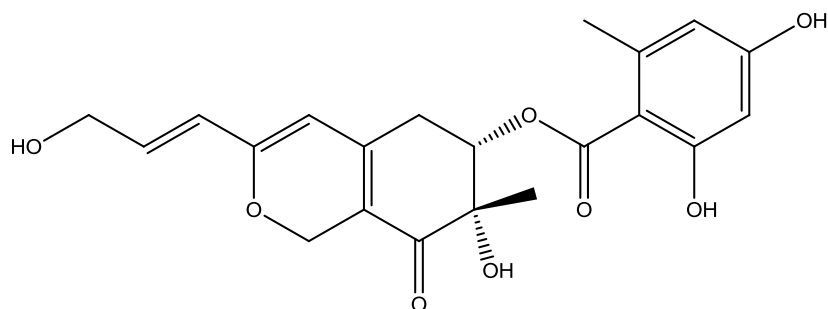
Η 18-δεϋδροξυ-κυτοχλασίνη Η έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη δράση του ενζύμου HIV-1 πρωτεάση, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση, συναρμολόγηση και ωρίμανση των δομικών πρωτεϊνών του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) με τιμή IC_{50} ίση με 3 μM . Η ένωση αυτή είναι ανταγωνιστικός αναστολέας γρήγορης πρόσδεσης και η αναστολή του ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωσή του (Lingham *et al.* 1992).

Ερευνητές εξέτασαν τη δράση της αλτεχρωμόνης Α (Εικόνα 41) στην ανάπτυξη σπερμάτων μαρουλιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αλτεχρωμόνη Α σε

συγκέντρωση 3 mg/L επιτάχυνε την ανάπτυξη της ρίζας κατά 54% (Kimura *et al.* 1992).

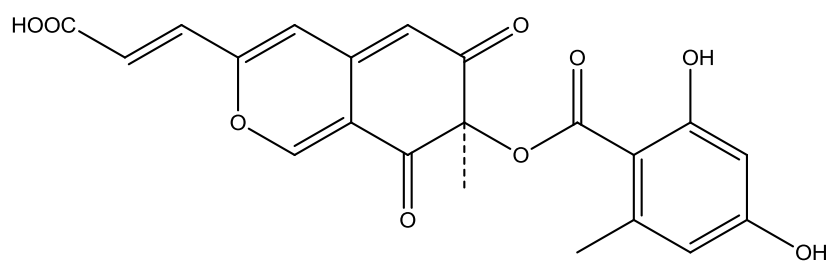
Στελέχη μυκήτων της οικογένειας *Xylariaceae* έχουν εξετασθεί για την ύπαρξη κυτταρολυτικών ενζύμων που μετατρέπουν την κυτταρίνη σε απλούς υδρογονάνθρακες. Το *Hypoxylon stygium* βρέθηκε ότι παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα β-γλυκοσιδάσης (51×10^{-3} μονάδες/mL) από όλα τα υπόλοιπα στελέχη μετά από επώαση τριών ημερών, η οποία και συνέχισε να αυξάνεται έως την έβδομη ημέρα (165×10^{-3} μονάδες/mL). Επιπλέον, αναπτύχθηκε μέθοδος ταυτόχρονης επώασης των *Trichoderma reesei* QM 9414 και *H. stygium* για την ενίσχυση της σύνθεσης κελλουλάσης και β-γλυκοσιδάσης. Παρατηρήθηκε αύξηση στην παραγωγή β-γλυκοσιδάσης μέσα σε 48 ώρες, με την προσθήκη του *H. stygium* να έχει γίνει μετά τις πρώτες 24 ώρες (Wei *et al.* 1992).

Δευτερογενείς Μεταβολίτες γένους *Hydroxylon*



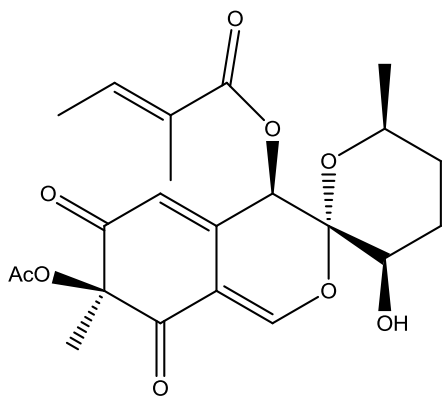
Εντοναεμίνη Α

Εικόνα 20



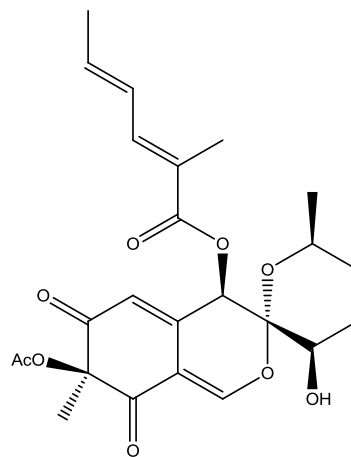
Μιτορουμπρινικό οξύ

Εικόνα 21



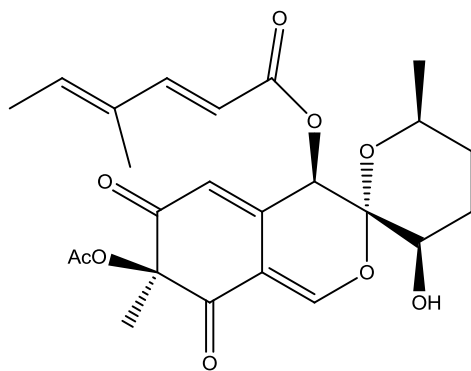
Νταλντινίνη C

Εικόνα 22



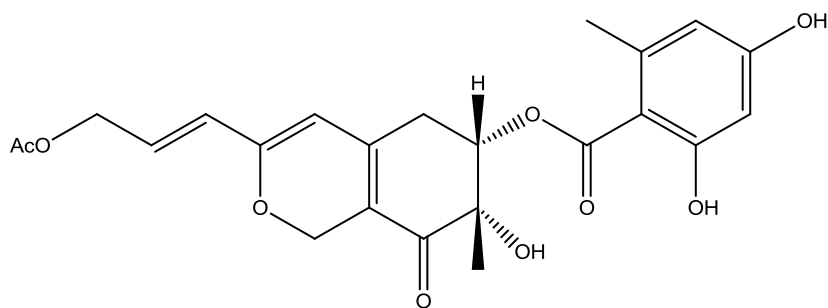
Νταλντινίνη Ε

Εικόνα 23



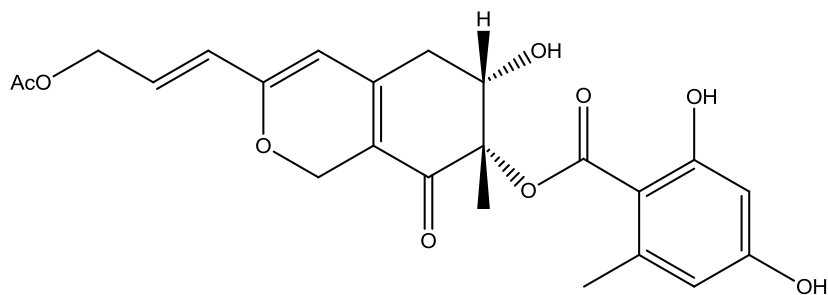
Νταλντινίνη F

Εικόνα 24



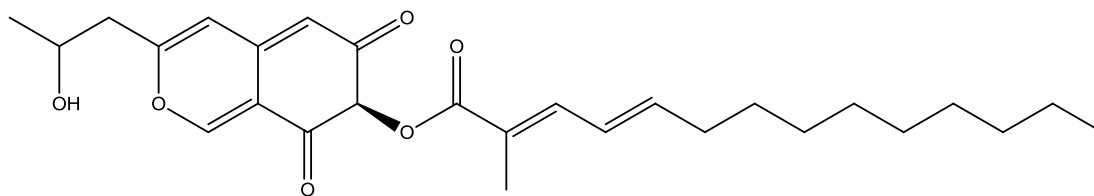
Ρουμπιγκινοσίνη A

Εικόνα 25



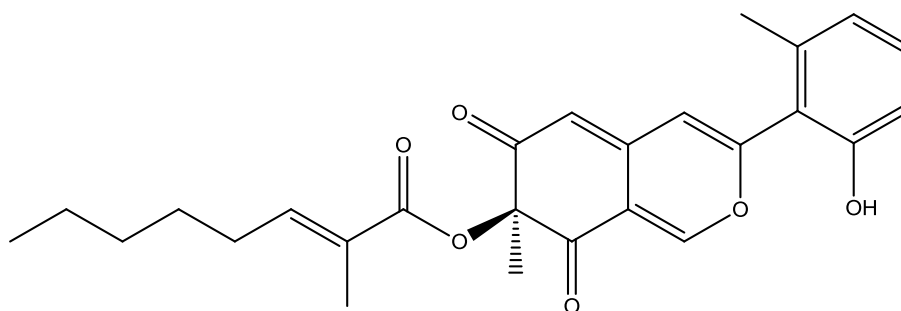
Ρουμπιγκινοσίνη B

Εικόνα 26



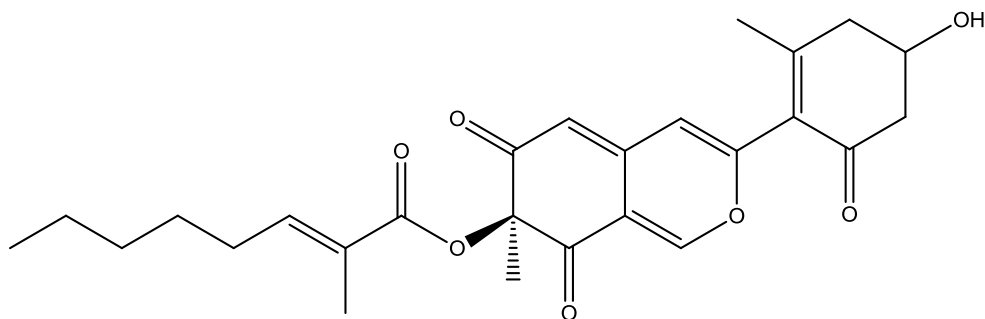
Ρουπαγκινουσίνη C

Εικόνα 27



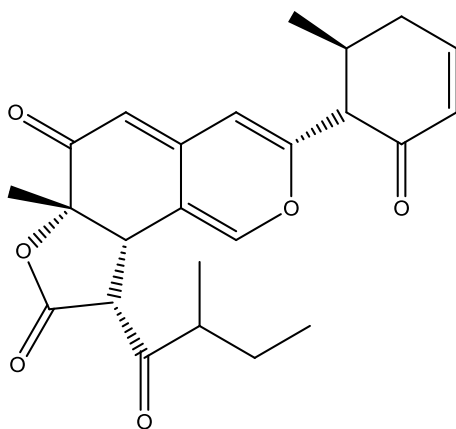
Κοχαερίνη A

Εικόνα 28



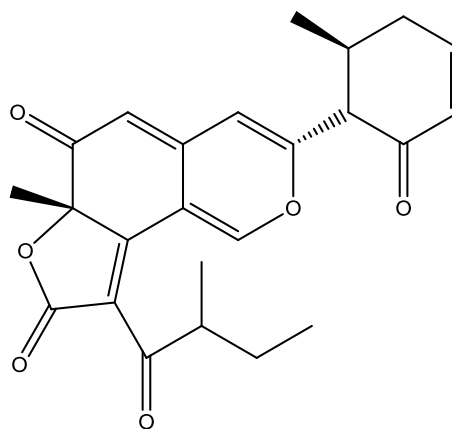
Κοχαερίνη B

Εικόνα 29



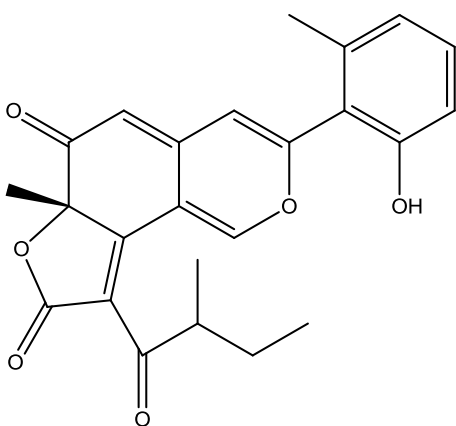
Μουλτιφορμίνη Α

Εικόνα 30



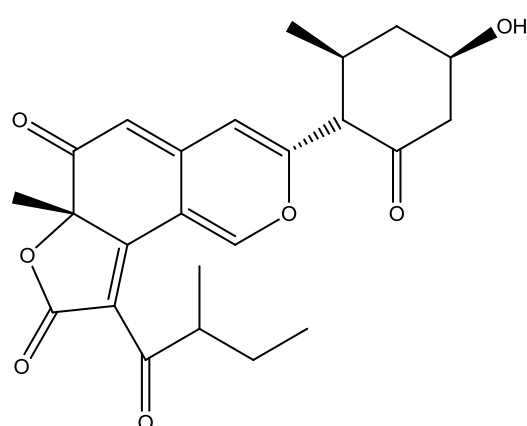
Μουλτιφορμίνη Β

Εικόνα 31



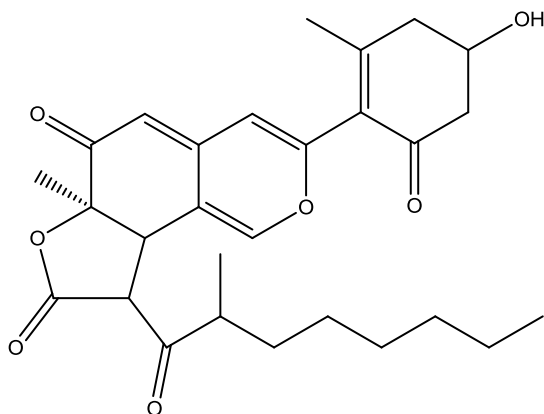
Μουλτιφορμίνη Γ

Εικόνα 32



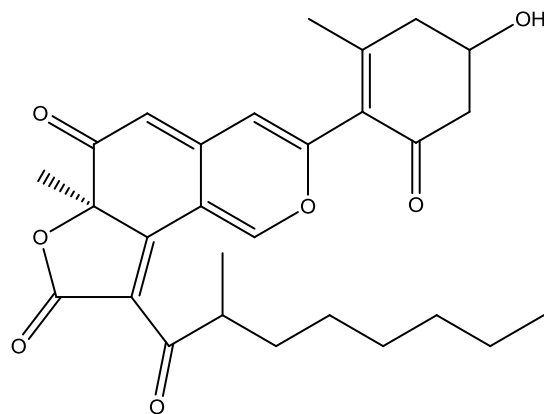
Μουλτιφορμίνη Δ

Εικόνα 33



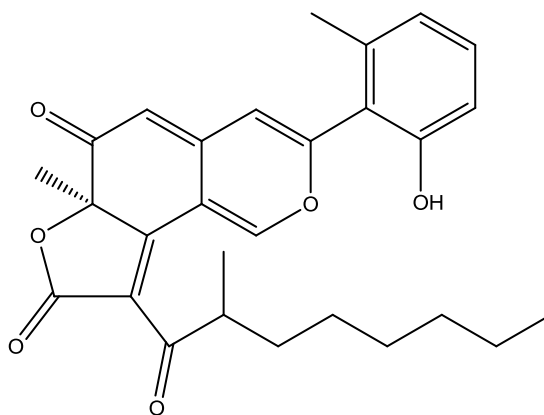
Κοχαερίνη C

Εικόνα 34



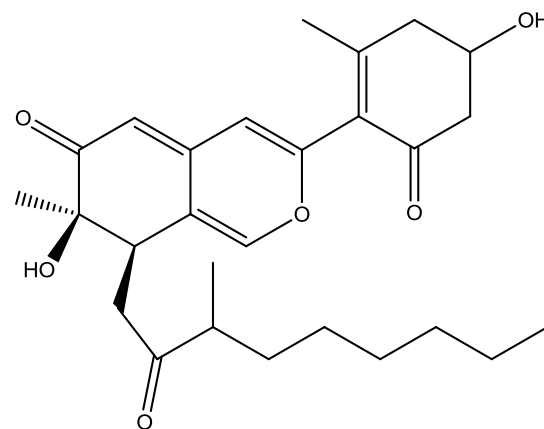
Κοχαερίνη D

Εικόνα 35



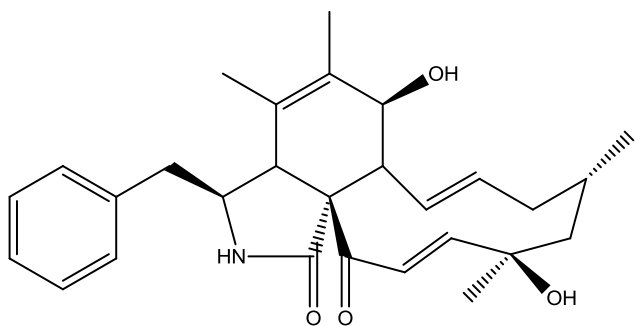
Κοχαερίνη E

Εικόνα 36



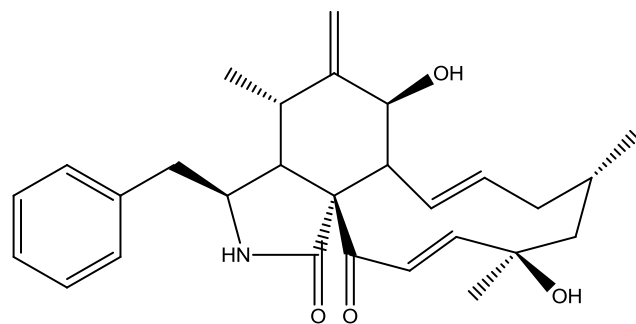
Κοχαερίνη F

Εικόνα 37



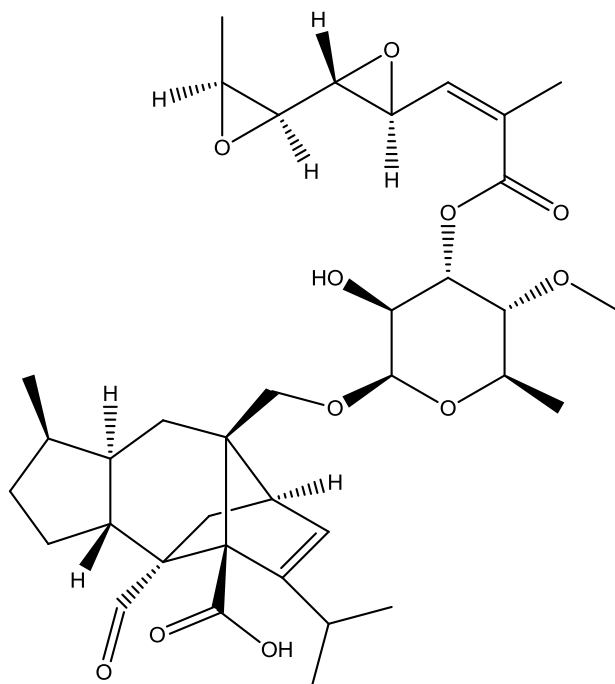
Φρατζιφορμίνη Α

Εικόνα 38



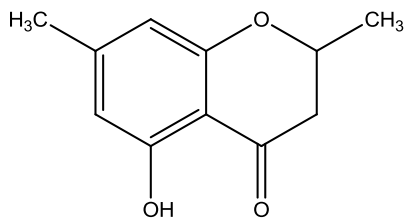
Φρατζιφορμίνη Β

Εικόνα 39



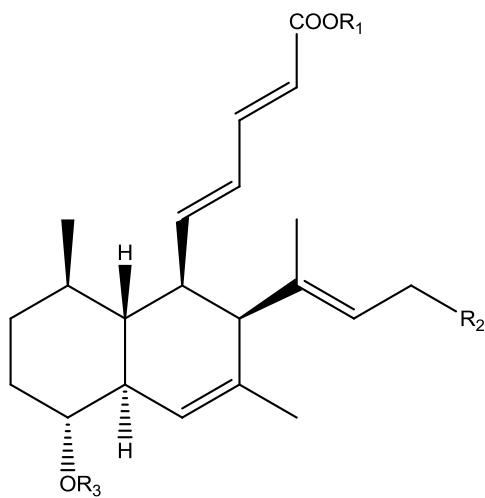
Υποξυσορδαρίνη

Εικόνα 40



Αλτεχρωμόνη Α

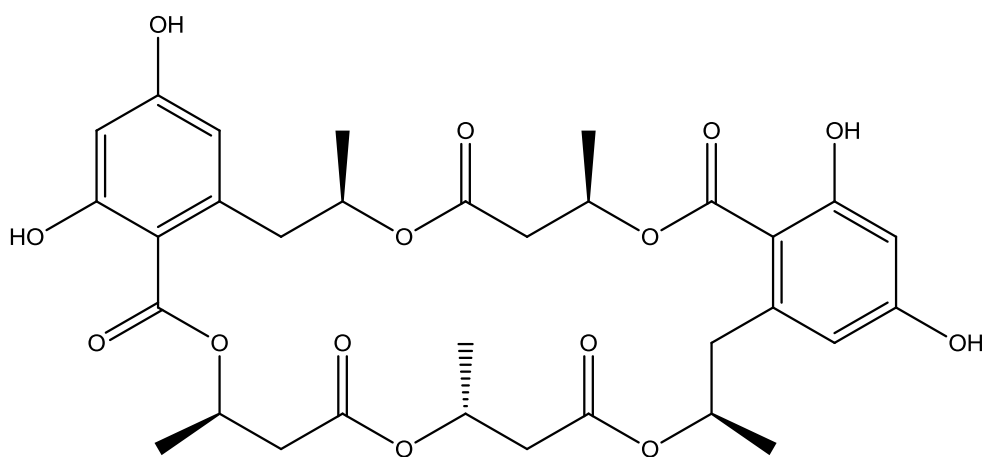
Εικόνα 41



Καρνεϊκό οξύ Α, $R_1=R_2=R_3=H$

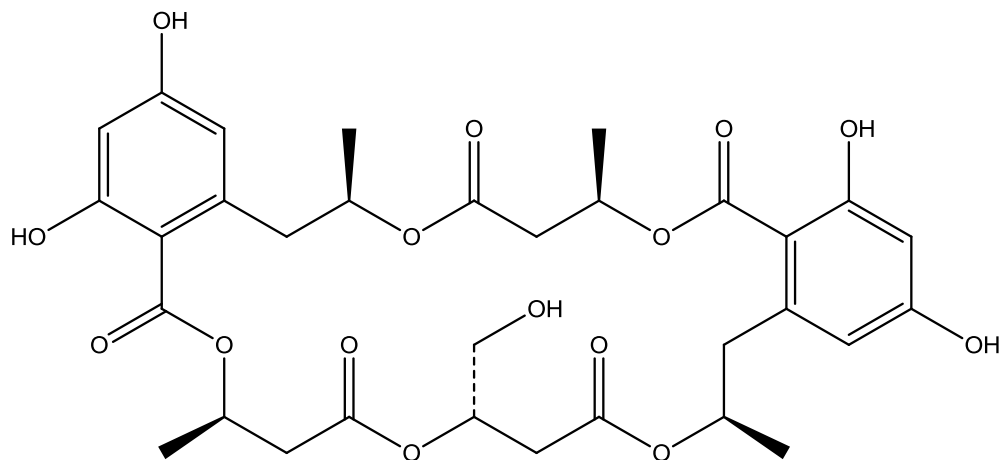
Καρνεϊκό οξύ Β, $R_1=R_3=H$, $R_2=OH$

Εικόνα 42



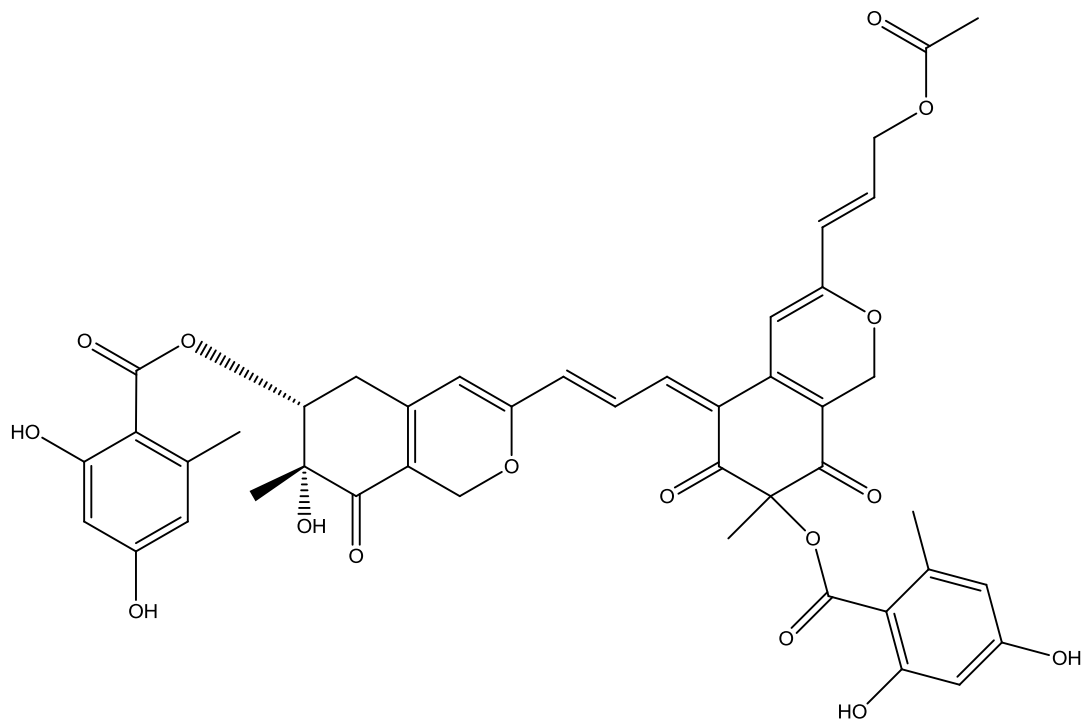
Λακτίδιο 15G256β

Εικόνα 43



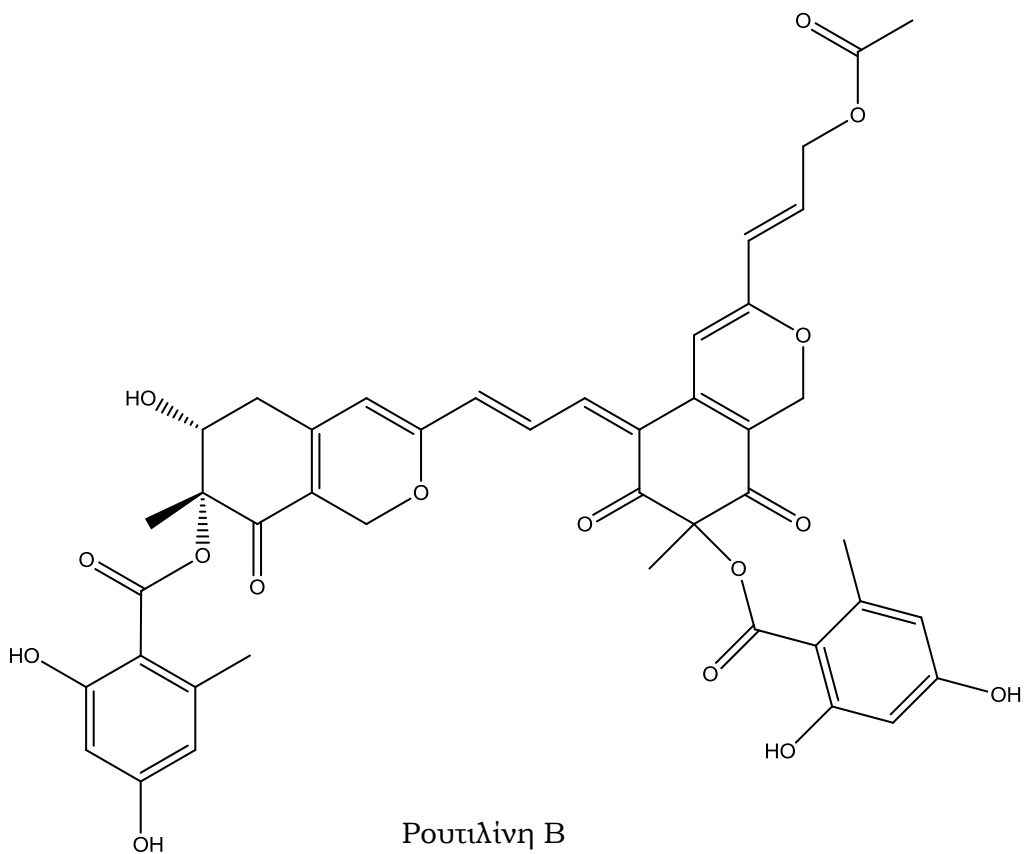
Λιποδεψιπεπτίδιο 15G256γ

Εικόνα 44



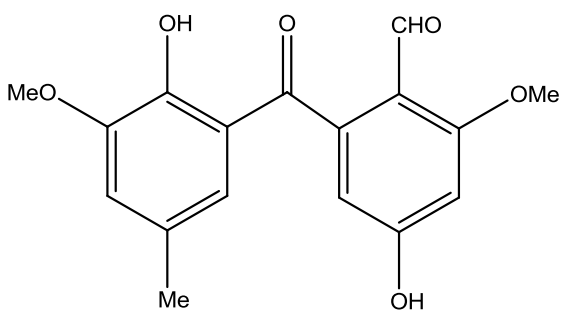
Ρουτιλίνη Α

Εικόνα 45



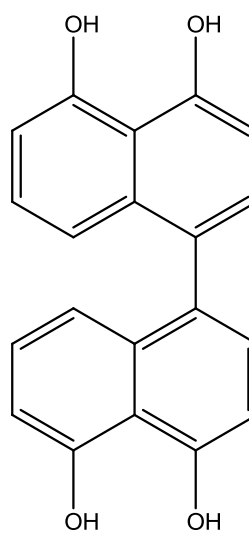
Ρουτιλίνη Β

Εικόνα 46



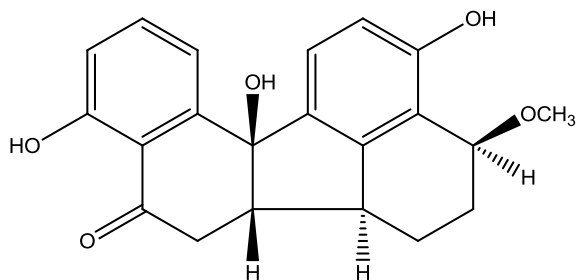
Νταλντινάλη Α

Εικόνα 47



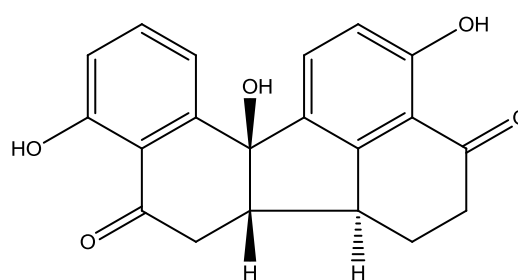
ΒΝΤ

Εικόνα 48



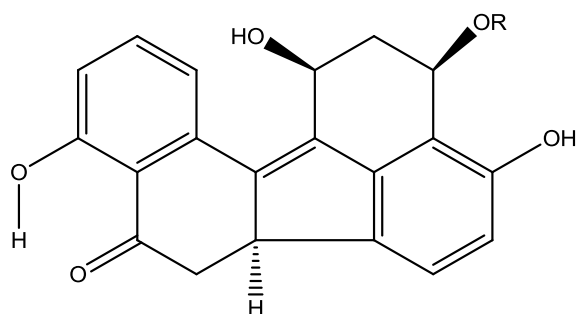
Νταλντινόνη C

Εικόνα 49



Νταλντινόνη D

Εικόνα 50



Υποξυλονόλη D, R= CH₂CH₃

Υποξυλονόλη E, R= CH₃

Εικόνα 51

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά-Μέθοδοι

Όργανα

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφους Bruker AC 200, Bruker DRX 400 και Bruker Ascend 700. Τα 2D-NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες ακολουθίες παλμών Bruker.

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 (EI-MS).

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο Cecil 1100 series με ανιχνευτή RI και στήλη κανονικής φάσης Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm) ή σε χρωματογράφο Agilent 1100 series με ανιχνευτή RI και στήλη αντίστροφης φάσης Kromasil 100 C18 5 μm (250 x 8 mm).

Η συμπύκνωση των υπολειμμάτων και των κλασμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-200 σε θερμοκρασία έως 40°C.

Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας με υποβοήθηση κενού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60H της εταιρείας Merck.

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

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου κανονικής φάσης (SiOH) τύπου SEP-PAK silica cartridge for rapid

sample preparation της εταιρείας Waters Associates ή Chromafix της εταιρείας Macherey-Nagel.

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας: α) πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20x20 cm, πάχους 0,2 mm) της εταιρείας Macherey-Nagel και β) πλάκες αλουμινίου με επίστρωση RP-18/UV₂₅₄ (20 x 20 cm) 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 το κατάλληλο αντιδραστήριο και θέρμανση της πλάκας στους 100 °C για περίπου 2 min. Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο διάλυμα 5% H₂SO₄ σε MeOH.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc και CH₂Cl₂ ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες MeOH και Me₂CO ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Ο διαλύτης CHCl₃ ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, ενώ το H₂O που χρησιμοποιήθηκε στους διαχωρισμούς με HPLC ήταν υπερκάθαρο. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Για τη λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο και CD₃OD χωρίς εσωτερικό πρότυπο της εταιρείας Aldrich-Sigma Chemical Company.

Συλλογή του οργανισμού

Ωριμα και νεαρά στρώματα του μύκητα *Hypoxylon fragiforme* συλλέχθηκαν χωριστά από δασύλλια της περιοχής Braunschweig στη Γερμανία από τον καθηγητή Marc Stadler (Helmholtz – Centre for Infection Research, Braunschweig). Τα δείγματα εκχυλίστηκαν χωριστά εξαντλητικά με μεθανόλη και τα οργανικά υπολείμματα που προέκυψαν εστάλησαν στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας για περαιτέρω φυτοχημική ανάλυση.

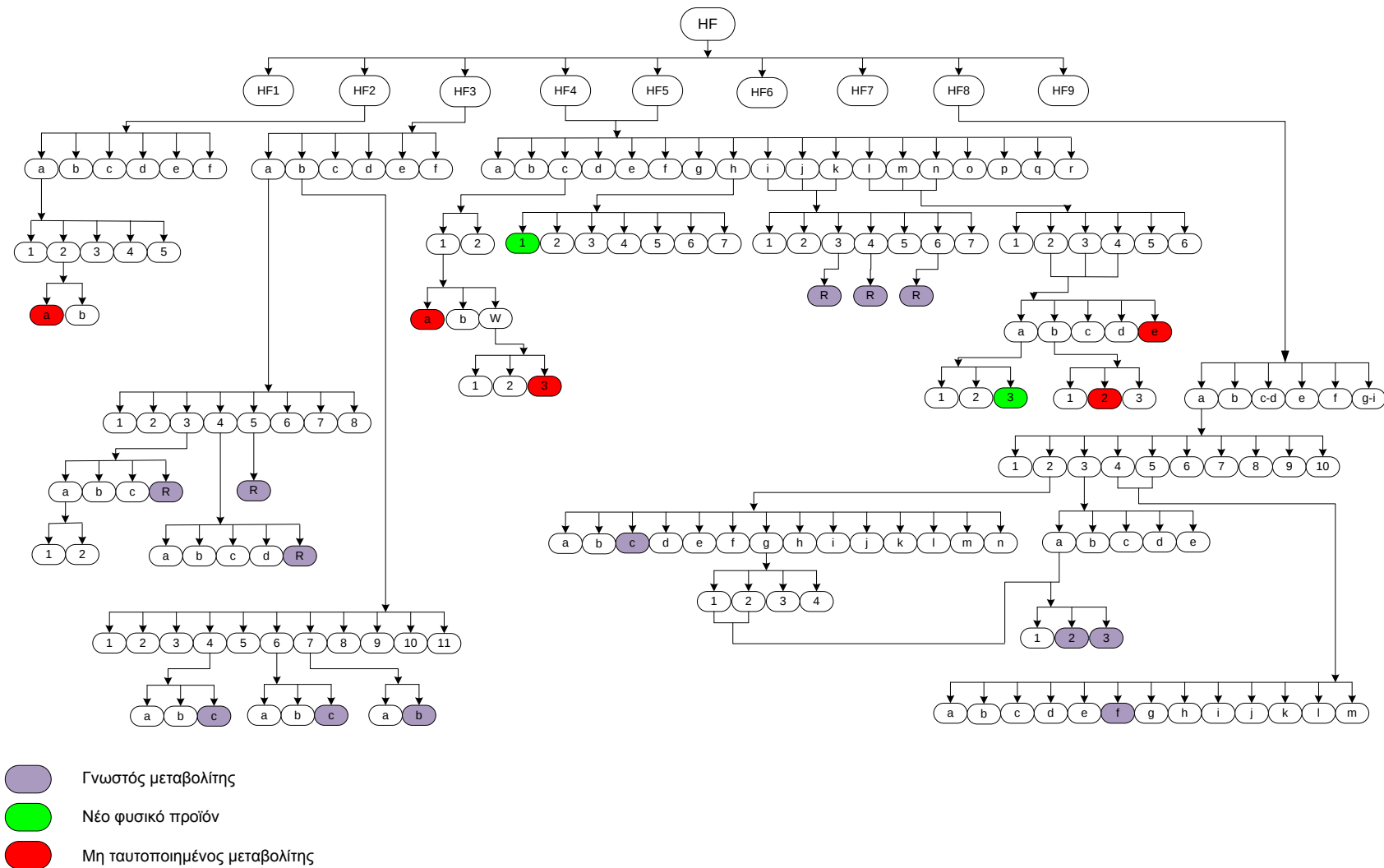
Απομόνωση μεταβολιτών από τον ασκομύκητα *Hypoxylon fragiforme*

A. Ώριμα στρώματα

Το οργανικό εκχύλισμα HF των ώριμων στρώματων είχε μάζα 3,49 gr. Ακολούθησε διαχωρισμός των χημικών συστατικών με χρήση υγρής χρωματογραφίας μέσης πίεσης (MPLC), στήλης υπό κενό (VLC), στήλης βαρύτητας (GCC), εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Στο σχήμα 1 δίνεται διαγραμματικά η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών του οργανισμού, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.

Το αρχικό εκχύλισμα HF (3,49 gr) υπέστη χρωματογραφικό διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία μέσης πίεσης αντίστροφης φάσης. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά μειούμενης πολικότητας. Η ροή του διαλύτη ήταν 8 mL/min και η κλασμάτωση ξεκίνησε με H₂O-MeOH 70:30. Συνολικά συλλέχθηκαν 55 κλάσματα, όγκου 50 mL (κλάσματα 2-16) και 100 mL (κλάσματα 1 και 17-55), τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 9 (Πίνακας 1). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Το κλάσμα HF2 υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη υπό κενό (VLC) από όπου προέκυψαν 6 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του κλάσματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 10 κλάσματα, όγκου 150 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 6 (Πίνακας 2). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR και TLC.



Πορεία απομόνωσης μεταβολιτών από τον ασκομύκητα *Hypoxylon fragiforme*

Α) Ώριμα στρώματα

Σχήμα 1

Πίνακας 1. Χρωματογραφικές συνθήκες για το ολικό εκχύλισμα του *H. fragiforme*

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v				Όγκος (mL)	Κωδικός	Μάζα (mg)
	H ₂ O	MeOH	EtOAc	CH ₂ Cl ₂			
1-15	Βαθμιδωτή έκλουση με αρχικό σύστημα διαλυτών H ₂ O-MeOH 70:30 και τελικό σύστημα διαλυτών MeOH 100% με ροή 8 mL/min				800	HF1	674,7
16-23					800	HF2	188,0
24-27					400	HF3	256,8
28-31					400	HF4	328,7
32-35					400	HF5	988,0
36-37					200	HF6	313,5
38-41					400	HF7	313,7
42-50	0	100	0	0	900	HF8	434,8
	0	0	100	0			
51-55	0	0	0	100	500	HF9	152,1

Πίνακας 2. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF2

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1	50	50	0	HF2a	12,6
2	50	50	0	HF2b	9,9
3-4	0	100	0	HF2c	21,8
5-6	0	95	5	HF2d	23,1
	0	90	10		
7-8	0	80	20	HF2e	34,7
	0	70	30		
9-10	0	60	40	HF2f	58,6
	0	0	100		

Το κλάσμα HF2a υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 5 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 18 κλάσματα, όγκου 8 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 5 (Πίνακας 3). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 3. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF2a

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1	60	40	0	HF2a1	7,8
2	60	40	0	HF2a2	1,8
3-5	60	40	0	HF2a3	0,5
6-12	50	50	0	HF2a4	0,3
	0	100	0		
13-18	0	50	50	HF2a5	1,2
	0	0	100		

Το κλάσμα HF2a2 μάζας 1,8 mg υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF2a2a ήταν ο μεταβολίτης **HF15**.

Το κλάσμα HF3 μάζας 256,8 mg υποβλήθηκε σε VLC από όπου προέκυψαν 6 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του κλάσματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλά-

Πίνακας 4. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF2a2

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 60:40	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF2a2a	0,8	17,9
HF2a2b	0,4	20,2

σματα, όγκου 200 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 6 (Πίνακας 5). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 5. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1	50	50	0	HF3a	42,4
2	0	100	0	HF3b	67,1
3-4	0	95	5	HF3c	37,9
	0	90	10		
5	0	80	20	HF3d	26,7
6-7	0	70	30	HF3e	70,7
	0	60	40		
8	0	0	100	HF3f	26,6

Το κλάσμα HF3a υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 8 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το

σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 42 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 8 (Πίνακας 6). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 6. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3a

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v		Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc		
1-4	60	40	HF3a1	6,7
5-6	60	40	HF3a2	2,7
7-9	60	40	HF3a3	6,4
10-18	60	40	HF3a4	10,3
19-23	60	40	HF3a5	3,3
24-36	60	40	HF3a6	5,7
37-41	60	40	HF3a7	1,5
42	0	100	HF3a8	2,5

Το κλάσμα HF3a3 δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 45:55. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 7). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HF3a3R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 7. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3a3

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HF3a3S	cHex-EtOAc 45:55	3,5
HF3a3R	MeOH-CH ₂ Cl ₂ 1:1	2,9

Το κλάσμα HF3a4 μάζας 10,3 mg δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 50:50. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 8). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HF3a4R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 8. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3a4

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HF3a4S	cHex-EtOAc	4,0
	50:50	
HF3a4R	MeOH-CH ₂ Cl ₂	6,3
	1:1	

Το κλάσμα HF3a5 μάζας 3,3 mg δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 60:40. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 9). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HF3a5R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 9. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3a5

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HF3a5S	cHex-EtOAc	1,5
	60:40	
HF3a5R	MeOH-CH ₂ Cl ₂	1,8
	1:1	

Το κλάσμα HF3b μάζας 67,1 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 11 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 118 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν

σε 11 (Πίνακας 10). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 10. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3b

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1-7	60	40	0	HF3b1	7,4
8-13	60	40	0	HF3b2	5,5
14-17	60	40	0	HF3b3	1,5
18-22	60	40	0	HF3b4	3,3
23-25	60	40	0	HF3b5	1,8
26-31	60	40	0	HF3b6	3,7
32-43	60	40	0	HF3b7	5,3
44-66	60	40	0	HF3b8	5,2
	55	45	0		
67-91	55	45	0	HF3b9	7,6
	40	60	0		
92-117	20	80	0	HF3b10	8,7
	0	100	0		
118	0	0	100	HF3b11	9,3

Το κλάσμα HF3b4 υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF3b4c ήταν ο μεταβολίτης **HF08**.

Το κλάσμα HF3b6 μάζας 3,7 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF3b6c ήταν ο μεταβολίτης **HF16**.

Πίνακας 11. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3b4

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 40:60	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF3b4a	0,2	12,9
HF3b4b	0,1	13,7
HF3b4c	1,5	16,9

Πίνακας 12. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3b6

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 55:45	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF3b6a	0,3	19,3
HF3b6b	0,1	29,8
HF3b6c	1,6	33,8

Το κλάσμα HF3b7 μάζας 2,4 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF3b4c ήταν ο μεταβολίτης **HF16**.

Το κλάσμα HF4 διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF5 οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF4.5) μάζας 1.316,7 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 18 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος

Πίνακας 13. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF3b7

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 55:45	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF3b7a	0,2	19,4
HF3b7b	0,9	33,7

χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 119 κλάσματα, όγκου 20 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 18 (Πίνακας 14). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Το κλάσμα HF4.5c υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, όγκου 15 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 2 (Πίνακας 15).

Το κλάσμα HF4.5c1 υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF4.5c1a ήταν ο μεταβολίτης **HF04**.

Το υπόλειμμα HF4.5c1w υποβλήθηκε σε HPLC αντίστροφης φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 17. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF4.5c1w3 ήταν ο μεταβολίτης **HF04**.

Πίνακας 14. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1-9	60	40	0	HF4.5a	15,0
10-13	60	40	0	HF4.5b	25,5
14-17	60	40	0	HF4.5c	18,7
18-19	60	40	0	HF4.5d	23,4
20-21	60	40	0	HF4.5e	26,8
22-29	60	40	0	HF4.5f	63,4
30-33	60	40	0	HF4.5g	12,9
34-39	60	40	0	HF4.5h	15,6
40-45	60	40	0	HF4.5i	35,8
46-47	60	40	0	HF4.5j	4,0
48-60	60	40	0	HF4.5k	13,0
61-77	50	50	0	HF4.5l	16,4
	30	70	0		
78-84	30	70	0	HF4.5m	13,8
85-94	0	100	0	HF4.5n	33,7
95-96	0	100	0	HF4.5o	16,8
97-108	0	75	25	HF4.5p	86,3
109-118	0	50	50	HF4.5q	522,1
119	0	0	100	HF4.5r	245,3

Πίνακας 15. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5c

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HF4.5c1	cHex-EtOAc 60:40	17,2
HF4.5c2	EtOAc 100% MeOH 100%	1,6

Πίνακας 16. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5c1

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 60:40	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HF4.5c1a	2,2	12,2
HF4.5c1b	1,3	12,9
HF4.5c1w	11,6	-

Πίνακας 17. Χρωματογραφικές συνθήκες για το υπόλειμμα HF4.5c1w

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Kromasil 100 C18 5 μ m (250 x 8 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	MeOH 100%	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	15 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HF4.5c1w1	2,4	7,2
HF4.5c1w2	1,0	8,0
HF4.5c1w3	0,6	10,2

Το κλάσμα HF4.5g μάζας 12,1 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5g

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 50:50	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF4.5g1	0,5	14,9
HF4.5g2	3,2	15,3

Το κλάσμα HF4.5h μάζας 15,6 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 19. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF4.5h1 ήταν ο καθαρός μεταβολίτης **HF06**.

Πίνακας 19. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5h

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 50:50	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF4.5h1	0,7	13,4
HF4.5h2	1,1	14,1
HF4.5h3	0,9	14,8
HF4.5h4	0,6	15,5
HF4.5h5	0,6	15,9
HF4.5h6	1,4	16,3
HF4.5h7	3,0	19,5

Το κλάσμα HF4.5i διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF4.5j και HF4.5k οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF4.5i) μάζας 52,8 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, όγκου 20 mL το καθένα (Πίνακας 20). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 20. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5i

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HF4.5i1	cHex-EtOAc 70:30	2,5
HF4.5i2	cHex-EtOAc 70:30	0,9
HF4.5i3	cHex-EtOAc 60:40	11,0
HF4.5i4	cHex-EtOAc 60:40	10,3
HF4.5i5	EtOAc 100%	12,2
HF4.5i6	MeOH 100%	3,1
HF4.5i7	MeOH 100%	14,3

Το κλάσμα HF4.5i3 δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 60:40. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 21). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HF4.5i3R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 21. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5i3

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HF4.5i3S	cHex-EtOAc 60:40	10,6
HF4.5i3R	MeOH-CH ₂ Cl ₂ 1:1	0,4

Το κλάσμα HF4.5i4 μάζας 10,3 mg δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 60:40. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 22). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HF4.5i4R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 22. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5i4

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HF4.5i4S	cHex-EtOAc	9,5
	60:40	
HF4.5i4R	MeOH-CH ₂ Cl ₂	0,8
	1:1	

Το κλάσμα HF4.5i6 μάζας 3,1 mg δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 50:50. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 23). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HF4.5i6R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 23. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5i6

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HF4.5i6S	cHex-EtOAc	0,8
	50:50	
HF4.5i6R	MeOH-CH ₂ Cl ₂	2,3
	1:1	

Το κλάσμα HF4.5l διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF4.5m και HF4.5n οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF4.5m) μάζας 63,9 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, όγκου 30 mL το καθένα (Πίνακας 24). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ¹H NMR και TLC.

Πίνακας 24. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5m

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HF4.5m1	cHex-EtOAc 60:40	8,5
HF4.5m2	cHex-EtOAc 55:45	6,9
HF4.5m3	cHex-EtOAc 55:45	11,9
HF4.5m4	cHex-EtOAc 50:50	17,1
HF4.5m5	EtOAc 100%	18,4
HF4.5m6	MeOH 100%	13,3

Το κλάσμα HF4.5m2 διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF4.5m3 και HF4.5m4 οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF4.5m4) μάζας 35,9 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 25. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF4.5m4e ήταν ο μεταβολίτης **HF11**.

Πίνακας 25. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5m4

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 40:60	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HF4.5m4a	2,9	13,6
HF4.5m4b	3,8	16,9
HF4.5m4c	0,6	19,9
HF4.5m4d	0,9	20,4
HF4.5m4e	1,6	22,6

Το κλάσμα HF4.5m4a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 26. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF4.5m4a3 ήταν ο καθαρός μεταβολίτης **HF13**.

Πίνακας 26. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5m4a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 40:60	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF4.5m4a1	0,1	12,9
HF4.5m4a2	0,2	13,3
HF4.5m4a3	0,6	13,9

Το κλάσμα HF4.5m4b μάζας 3,8 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 27. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF4.5m4b2 ήταν ο μεταβολίτης **HF09**.

Πίνακας 27. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF4.5m4b

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 40:60	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HF4.5m4b1	0,3	15,3
HF4.5m4b2	1,0	15,6
HF4.5m4b3	0,2	16,4

Το κλάσμα HF8 μάζας 434,8 mg υποβλήθηκε σε VLC από όπου προέκυψαν 6 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του κλάσματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 9 κλάσματα, όγκου 50 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 6 (Πίνακας 28). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 28. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v		Κωδικός	Μάζα (mg)
	EtOAc	MeOH		
1	100	0	HF8a	255,0
2	100	0	HF8b	16,0
3-4	100	0	HF3c-d	17,0
5	90	10	HF3e	8,0
6	50	50	HF8f	58,0
7-9	0	100	HF8g-i	16,0

Το κλάσμα HF8a υποβλήθηκε σε VLC από όπου προέκυψαν 10 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του κλάσματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 15 κλάσματα, όγκου 100 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 10 (Πίνακας 29). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 29. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8a

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1-2	100	0	0	HF8a1	132,5
	95	5	0		
3	90	10	0	HF8a2	47,6
4	85	15	0	HF8a3	21,1
5	80	20	0	HF8a4	17,6
6	75	25	0	HF8a5	11,0
7	70	30	0	HF8a6	5,2
8-9	65	35	0	HF8a7	5,8
	60	40	0		
10-11	55	45	0	HF8a8	5,0
	50	50	0		
12-13	0	100	0	HF8a9	13,6
	0	95	5		
14-15	0	75	25	HF8a10	13,2
	0	0	100		

Το κλάσμα HF8a2 υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 14 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 106 κλάσματα, όγκου 12 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 14 (Πίνακας 30). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC. Διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF8a2c ήταν ο μεταβολίτης **HF01**.

Πίνακας 30. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8a2

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v		Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc		
1-20	97	3	HF8a2a	3,9
21-24	97	3	HF8a2b	2,8
25-28	97	3	HF8a2c	3,9
29-33	97	3	HF8a2d	2,3
34-37	97	3	HF8a2e	0,7
38-46	96	4	HF8a2f	3,1
47-63	96	4	HF8a2g	8,2
	93	7		
64-66	93	7	HF8a2h	1,0
	90	10		
67-70	90	10	HF8a2i	1,8
71-77	90	10	HF8a2j	1,0
	85	15		
78-86	85	15	HF8a2k	0,5
	80	20		
87-90	80	20	HF8a2l	1,0
91-97	80	20	HF8a2m	3,6
	0	100		
98-106	0	100	HF8a2n	4,8

Το κλάσμα HF8a2f διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF8a3 οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF8a3) μάζας 24,2 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 14 κλάσματα, όγκου 5 mL (1-12), 20 mL (13) και 10 mL (14), τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης

πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 5 (Πίνακας 31). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Πίνακας 31. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8a3

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1-4	95	5	0	HF8a3a	5,8
5	90	10	0	HF8a3b	1,4
6-8	90	10	0	HF8a3c	1,7
9-12	85	15	0	HF8a3d	1,8
13-14	0	100	0	HF8a3e	11,3
	0	0	100		

Το κλάσμα HF8a2g μάζας 8,2 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, όγκου 5 mL (1-6, 8) και 10 mL (7), τα οποία αφού εξετάστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 4 (Πίνακας 32). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Το κλάσμα HF8a3a διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF8a2g1 και το HF8a2g2 οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF8a3a) μάζας 9,9 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 33. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF8a3a2 ήταν ο μεταβολίτης **HF03** και το υπόλειμμα HF8a3a3 ήταν ο μεταβολίτης **HF12**.

Πίνακας 32. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8a2g

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1-3	95	5	0	HF8a2g1	3,6
	90	10	0		
4	90	10	0	HF8a2g2	0,5
5-6	85	15	0	HF8a2g3	0,4
7-8	0	100	0	HF8a2g4	4,3
	0	0	100		

Πίνακας 33. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8a3a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 95:5	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HF8a3a1	0,1	20,5
HF8a3a2	2,2	37,3
HF8a3a3	1,6	41,1

Το κλάσμα HF8a4 διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF8a5 οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HF8a4.5) μάζας 28,6 mg υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 13 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex και EtOAc Συνολικά παρελήφθησαν 56 κλάσματα, όγκου 12 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 13

(Πίνακας 34). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC. Διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HF8a4.5f ήταν ο μεταβολίτης **HF02**.

Πίνακας 34. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HF8a4.5

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v		Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc		
1-3	82	18	HF8a4.5a	0,8
4-6	82	18	HF8a4.5b	1,8
7-10	82	18	HF8a4.5c	1,0
11-14	82	18	HF8a4.5d	1,5
15-17	82	18	HF8a4.5e	1,2
18-21	82	18	HF8a4.5f	7,3
22-25	82	18	HF8a4.5g	1,3
26-30	82	18	HF8a4.5h	0,8
31-36	82	18	HF8a4.5i	1,3
37-40	75	25	HF84.5j	0,5
41-46	75	25	HF8a4.5k	0,7
	50	50		
47-51	50	50	HF8a4.5l	1,8
52-56	50	50	HF8a4.5m	2,1
	0	100		

B. Νεαρά στρώματα

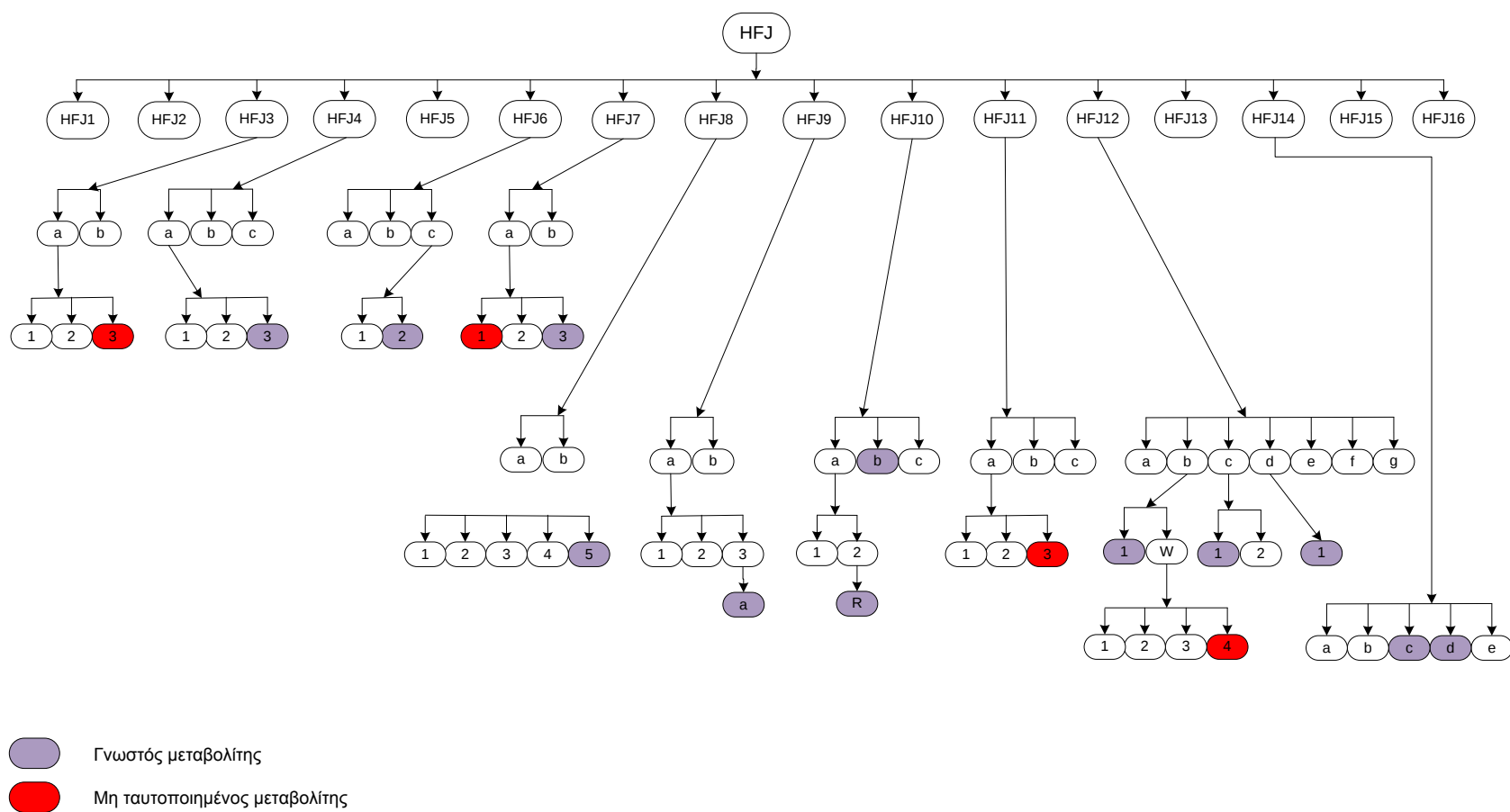
Το οργανικό εκχύλισμα HFJ των νεαρών στρωμάτων είχε μάζα 1,76 gr. Ακολούθησε διαχωρισμός των χημικών συστατικών με χρήση στήλης υπό κενό (VLC), στήλης βαρύτητας (GCC), εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Στο σχήμα 2 δίνεται διαγραμματικά η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών του οργανισμού, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια της.

Το αρχικό εκχύλισμα HFJ (1,76 gr) υπέστη χρωματογραφικό διαχωρισμό με στήλη βαρύτητας από όπου προέκυψαν 16 κλάσματα. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου και για την κλασμάτωση του υπολείμματος χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση σύστημα διαλυτών προοδευτικά αυξανόμενης πολικότητας. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελείτο από μίγματα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 108 κλάσματα, όγκου 25 mL το καθένα, τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 16 (Πίνακας 35). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με φασματοσκοπία ^1H NMR και TLC.

Το κλάσμα HFJ3 υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, όγκου 5 mL το καθένα (Πίνακας 36). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με TLC.

Το κλάσμα HFJ3a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 37. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ3a3 ήταν ο μεταβολίτης **HF05**.

Το κλάσμα HFJ4 μάζας 26,4 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 3 (Πίνακας 38).



Πορεία απομόνωσης μεταβολιτών από τον ασκομύκητα *Hypoxylon fragiforme*

Β) Νεαρά στρώματα

Σχήμα 2

Πίνακας 35. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ

Κλάσμα	Διαλύτης έκλουσης %v/v			Κωδικός	Μάζα (mg)
	cHex	EtOAc	MeOH		
1-10	90	10	0	HFJ1	21,2
11-14	90	10	0	HFJ2	36,3
	85	15	0		
15-22	85	15	0	HFJ3	7,9
	75	25	0		
23-29	75	25	0	HFJ4	26,4
	65	35	0		
30-32	65	35	0	HFJ5	20,9
33-39	65	35	0	HFJ6	26,5
	55	45	0		
40-47	55	45	0	HFJ7	14,1
48-52	55	45	0	HFJ8	15,2
	40	60	0		
53-59	40	60	0	HFJ9	18,0
60-65	40	60	0	HFJ10	33,1
66-69	40	60	0	HFJ11	14,4
	20	80	0		
70-80	20	80	0	HFJ12	60,4
	0	100	0		
81-90	0	100	0	HFJ13	27,4
	0	90	10		
91-100	0	90	10	HFJ14	34,8
	0	75	25		
101-106	0	75	25	HFJ15	81,7
107-108	0	0	100	HFJ16	973,0

Πίνακας 36. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ3

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ3a	cHex-EtOAc	6,3
	95:5	
HFJ3b	cHex-EtOAc	1,9
	90:10	

Πίνακας 37. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ3a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 95:5	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HFJ3a1	1,8	12,7
HFJ3a2	0,6	21,3
HFJ3a3	0,9	23,3

Πίνακας 38. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ4

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ4a	cHex-EtOAc	22,6
	90:10	
HFJ4b	cHex-EtOAc	2,2
	85:15	
HFJ4c	cHex-EtOAc	2,4
	85:15	
	EtOAc 100%	

Το κλάσμα HFJ4a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 39. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ4a3 ήταν ο μεταβολίτης **HF01**.

Πίνακας 39. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ4a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 90:10	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 $^{\circ}\text{C}$	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ4a1	1,6	19,9
HFJ4a2	1,2	20,7
HFJ4a3	2,3	23,0

Το κλάσμα HFJ6 μάζας 26,5 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα (Πίνακας 40). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με TLC.

Πίνακας 40. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ6

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ6a	cHex-EtOAc 90:10	6,2
HFJ6b	cHex-EtOAc 85:15	6,2
HFJ6c	EtOAc 100%	13,6

Το κλάσμα HFJ6c υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 41. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ6c2 ήταν ο μεταβολίτης **HF02**.

Πίνακας 41. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ6c

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 65:35	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ6c1	0,4	23,2
HFJ6c2	0,9	23,8

Το κλάσμα HFJ7 μάζας 14,1 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, όγκου 7 mL το καθένα τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 2 (Πίνακας 42).

Πίνακας 42. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ7

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ7a	cHex-EtOAc	11,7
	70:30	
HFJ7b	cHex-EtOAc	1,2
	65:35	
	EtOAc 100%	

Το κλάσμα HFJ7a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 43. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ7a1 ήταν ο μεταβολίτης **HF04** και το υπόλειμμα HFJ7a3 ήταν ο μεταβολίτης **HF02**.

Το κλάσμα HFJ8 μάζας 15,2 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, όγκου 7 mL το καθένα τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 2 (Πίνακας 44).

Πίνακας 43. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ7a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 65:35	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ7a1	1,9	13,0
HFJ7a2	0,4	17,1
HFJ7a3	1,3	23,9

Πίνακας 44. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ8

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ8a	cHex-EtOAc	12,1
	70:30	
HFJ8b	cHex-EtOAc	1,5
	65:35	
	EtOAc 100%	

Το κλάσμα HFJ8a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 45. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ8a5 ήταν ο μεταβολίτης **HF02**.

Το κλάσμα HFJ9 μάζας 18,0 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex και EtOAc. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα (Πίνακας 46). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με TLC.

Το κλάσμα HFJ9a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 47.

Πίνακας 45. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ8a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 65:35	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ8a1	0,5	16,6
HFJ8a2	0,8	19,8
HFJ8a3	0,7	20,2
HFJ8a4	0,5	23,4
HFJ8a4	0,9	24,2

Πίνακας 46. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ9

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ9a	cHex-EtOAc 50:50	17,5
HFJ9b	EtOAc 100%	0,5

Πίνακας 47. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ9a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 50:50	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ9a1	0,6	10,2
HFJ9a2	0,8	15,2
HFJ9a3	3,9	15,5

Το κλάσμα HFJ9a3 διαπιστώθηκε ότι ήταν το ίδιο μίγμα μεταβολιτών με το κλάσμα HF4.5g2, το HF4.5h4 και το HF4.5h5 οπότε και συνενώθηκαν. Το συνενωμένο κλάσμα (αναφέρεται παρακάτω ως HFJ9a3) μάζας 8,3 mg υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 48. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ9a3a ήταν ο μεταβολίτης **HF10**.

Πίνακας 48. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ9a3

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 55:45	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 $^{\circ}\text{C}$	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_{R}, min)
HFJ9a3a	5,1	16,9

Το κλάσμα HFJ10 μάζας 33,1 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 6 κλάσματα, όγκου 12 mL το καθένα τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 3 (Πίνακας 49). Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ10b ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 49. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ10

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ10a	cHex-EtOAc	14,3
	70:30	
	cHex-EtOAc	
HFJ10b	70:30	10,4
	cHex-EtOAc	
	60:40	
	EtOAc 100%	
HFJ10c	MeOH 100%	0,3

Το κλάσμα HFJ10a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 50.

Πίνακας 50. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ10a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 60:40	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ10a1	0,3	20,0
HFJ10a2	3,4	20,5

Το κλάσμα HFJ10a2 δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 65:35. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 51). Κατόπιν ελέγχου με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το αδιάλυτο υπόλειμμα HFJ10a2R ήταν ο μεταβολίτης **HF07**.

Πίνακας 51. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ10a2

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HFJ10a2S	cHex-EtOAc 65:35	2,2
HFJ10a2R	MeOH-CH ₂ Cl ₂ 1:1	1,3

Το κλάσμα HFJ11 μάζας 14,4 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 3 (Πίνακας 52).

Πίνακας 52. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ11

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ11a	cHex-EtOAc	8,9
	65:35	
HFJ11b	cHex-EtOAc	1,7
	60:40	
HFJ11c	cHex-EtOAc	2,5
	50:50	
	EtOAc 100%	
	MeOH 100%	

Το κλάσμα HFJ11a υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 53. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ11a3 ήταν ο μεταβολίτης **HF09**.

Πίνακας 53. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ11a

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 50:50	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R , min)
HFJ11a1	1,0	15,5
HFJ11a2	0,4	20,6
HFJ11a3	1,6	21,8

Το κλάσμα HFJ12 μάζας 60,4 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 7 κλάσματα, όγκου 30 mL το καθένα (Πίνακας 54). Σε κάθε κλάσμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος με TLC.

Πίνακας 54. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ12a	cHex-EtOAc 60:40	4,9
HFJ12b	cHex-EtOAc 60:40	12,4
HFJ12c	cHex-EtOAc 55:45	11,7
HFJ12d	cHex-EtOAc 55:45	4,1
HFJ12e	cHex-EtOAc 50:50	4,6
HFJ12f	EtOAc 100%	14,1
HFJ12g	MeOH 100%	13,4

Το κλάσμα HFJ12b δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 45:55. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 55).

Πίνακας 55. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12b

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HFJ12bS	cHex-EtOAc 45:55	11,5
HFJ12bR	MeOH-CH ₂ Cl ₂ 1:1	0,8

Το κλάσμα HFJ12bS (αναφέρεται παρακάτω ως HFJ12b) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 56. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ12b1 ήταν ο μεταβολίτης **HF08**.

Το υπόλειμμα HFJ12bw υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 57. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ12bw4 ήταν ο μεταβολίτης **HF11**.

Πίνακα 56. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12b

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 45:55	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ12b1	4,3	18,9
HFJ12bw	8,0	-

Πίνακας 57. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12bw

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 45:55	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ12bw1	0,7	19,4
HFJ12bw2	0,3	23,3
HFJ12bw3	0,3	24,1
HFJ12bw4	0,5	25,3

Το κλάσμα HFJ12c μάζας 11,7 mg δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 45:55. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 58).

Το κλάσμα HFJ12cS (αναφέρεται παρακάτω ως HFJ12c) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 59. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ12c1 ήταν ο μεταβολίτης **HF08**.

Πίνακας 58. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12c

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HFJ12cS	cHex-EtOAc	11,0
	45:55	
HFJ12cR	MeOH-CH ₂ Cl ₂	2,0
	1:1	

Πίνακας 59. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12c

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μm (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 45:55	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t _R , min)
HFJ12c1	4,0	18,9
HFJ12c2	1,2	22,6

Το κλάσμα HFJ12d μάζας 4,1 mg δε διαλυόταν πλήρως στους συνήθεις διαλύτες οπότε πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός διαλυτού και αδιάλυτου υπολείμματος με σύστημα διαλυτών cHex-EtOAc 45:55. Το αδιάλυτο υπόλειμμα παραλήφθηκε με MeOH-CH₂Cl₂ 1:1. Προέκυψαν 2 κλάσματα (Πίνακας 60).

Πίνακας 60. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12d

Κλάσμα	Διαλύτης	Μάζα (mg)
HFJ12dS	cHex-EtOAc	3,4
	45:55	
HFJ12dR	MeOH-CH ₂ Cl ₂	0,8
	1:1	

Το κλάσμα HFJ12dS (αναφέρεται παρακάτω ως HFJ12d) υποβλήθηκε σε HPLC κανονικής φάσης, οι συνθήκες της οποίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 61. Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ¹H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ12d1 ήταν ο μεταβολίτης **HF08**.

Πίνακας 61. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ12d

Χρωματογραφικές Συνθήκες		
Στήλη	Supelcosil LC-Si 5 μ m (250 x 10 mm)	
Διαλύτης Έκλουσης	cHex-EtOAc 45:55	
Ροή Διαλύτη	1,5 mL/min	
Θερμοκρασία	25 °C	
Ανιχνευτής	RI	
Κωδικός Υπολείμματος	Μάζα (mg)	Χρόνος Έκλουσης (t_R, min)
HFJ12d1	0,8	19,0

Το κλάσμα HFJ14 μάζας 34,8 mg υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεής φάσης με υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου και κινητή φάση σύστημα cHex, EtOAc και MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 8 κλάσματα, όγκου 10 mL το καθένα τα οποία αφού εξετάστηκαν με TLC με σύστημα διαλυτών κατάλληλης πολικότητας και πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες συνενώσεις, περιορίστηκαν σε 5 (Πίνακας 62).

Πίνακας 62. Χρωματογραφικές συνθήκες για το κλάσμα HFJ14

Κλάσμα	Δ/της έκλουσης	Μάζα (mg)
HFJ14a	cHex-EtOAc	13,9
	40:60	
HFJ14b	cHex-EtOAc	3,1
	40:60	
HFJ14c	cHex-EtOAc	3,0
	30:70	
HFJ14d	EtOAc 100%	4,0
HFJ14e	MeOH 100%	9,6

Κατόπιν ελέγχου των κλασμάτων με φασματοσκοπία ^1H NMR διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα HFJ14c και HFJ14d ήταν ο μεταβολίτης **HF14**.

Συνολικά απομονώθηκαν 16 μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 63:

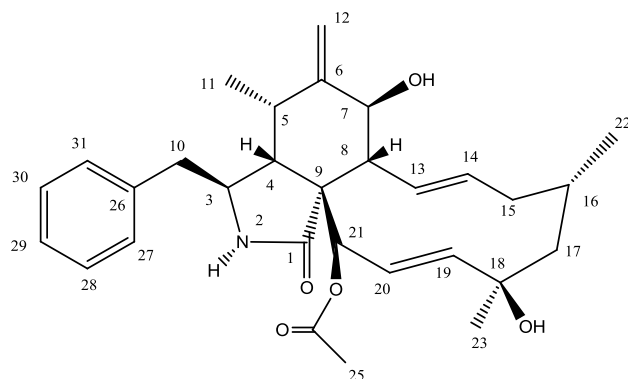
Πίνακας 63. Απομονωμένοι μεταβολίτες και μάζες αυτών

Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
1	HF16	HF3b6c, HF3b7b	2,5
2	HF10	HFJ9a3a	5,1
3	HF07	HF3a3R, HF3a4R HF3a5R, HF4.5i3R HF4.5i4R, HF4.5i6R HFJ10a2R, HFJ10b	26,2
4	HF14	HFJ14c, HFJ14d	7,0
5	HF08	HF3b4c, HFJ12b1 HFJ12c1, HFJ12d1	10,6
6	HF06	HF4.5h1	1,3
7	HF13	HF4.5m4a3	0,9
8	HF01	HF8a2c, HFJ4a3	6,2
9	HF03	HF8a3a2	2,2
10	HF12	HF8a3a3	1,6
11	HF02	HF8a4.5f, HFJ6c2 HFJ7a3, HFJ8a5	10,4
	HF04	HF4.5c1a, HF4.5c1w3 HFJ7a1	4,7
	HF05	HFJ3a3	1,3
	HF09	HF4.5m4b2, HFJ11a3	2,6
	HF11	HF4.5m4e, HFJ12bw4	2,1
	HF15	HF2a2a	0,8

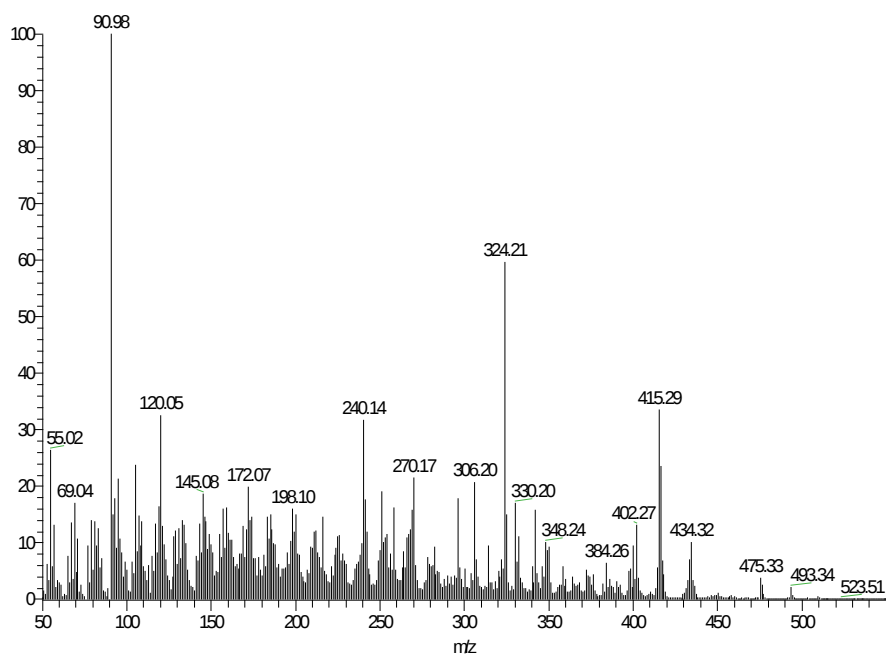
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ταυτοποίηση δομής μεταβολιτών από τον ασκομύκητα *Hypoxylon fragiforme*

Μεταβολίτης 1: Κυτοχλασίνη Η

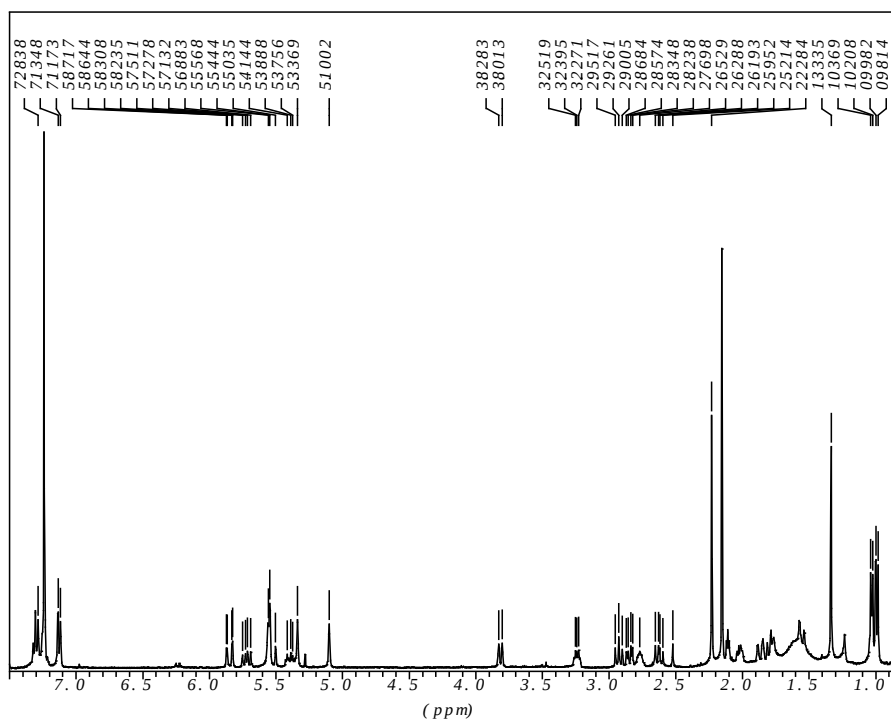


Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα συνολικής μάζας 2,5 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 493 (Εικόνα 52), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{30}H_{39}NO_5$.



Εικόνα 52. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **1**

Στο φάσμα ^1H NMR χαρακτηριστικά σήματα παρουσίασαν τα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου H-27, H-28, H-29, H-30 και H-31 που συντονίζονταν σε δ 7,12-7,30. Τα ολεφινικά πρωτόνια H-13, H-14 και H-20 εμφανίστηκαν στα 5,72, 5,38 και 5,85 ppm αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου H-12a και H-12b εμφανίστηκαν πιο θωρακισμένα ως απλές κορυφές στα 5,10 και 5,34 ppm αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H-2 της αμινομάδας, το ολεφινικό H-19 και το H-21 του άνθρακα που φέρει την ακετόξυ-ομάδα συντονίζονταν στην περιοχή 5,50-5,55 ppm, ενώ το πρωτόνιο του οξυγονωμένου C-7 εμφανίστηκε ως διπλή κορυφή σε 3,81. Τα μεθυλικά πρωτόνια της ακετόξυ-ομάδας έδωσαν μία απλή κορυφή στα 2,23 ppm και της θέσης H₃-23 μία απλή κορυφή στα 1,33 ppm. Τέλος, τα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων H₃-11 και H₃-22 έδωσαν δύο διπλές κορυφές σε δ 0,98 και 1,03 αντίστοιχα (Εικόνα 53).



Εικόνα 53. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **1**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **1** ταυτοποιήθηκε ως η κυτοχαλασίνη Η. Η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **1** φαίνεται στον Πίνακα 64.

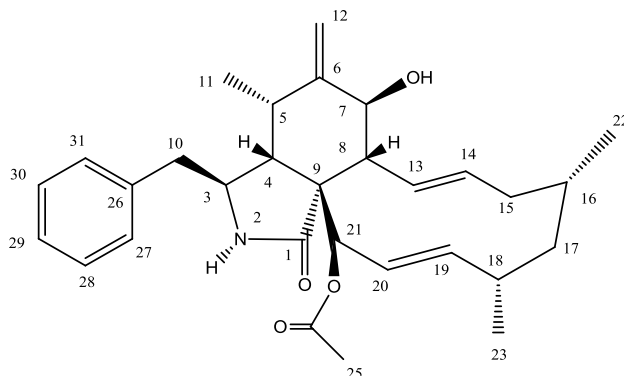
Η κυτοχαλασίνη Η έχει βρεθεί στα γένη *Geniculosporium* (Krohn *et al.* 2005) και *Xylaria* (Li *et al.* 2012) της οικογένειας *Xylariaceae*, στο γένος *Phomopsis* της οικογένειας *Diaporthaceae* (Fu *et al.* 2011), καθώς και στο είδος *Endothia gyrosa* της οικογένειας *Cryphonectriaceae* (Xu *et al.* 2009). Στο γένος *Hypoxylon* έχει απομονωθεί από το είδος *H. fragiforme* (Stadler *et al.* 2006).

Η κυτοχαλασίνη Η διαθέτει μη εκλεκτική νηματοκτόνο και αντιμικροβιακή δράση (Stadler *et al.* 2006). Επιπλέον, αναφέρεται ότι είναι δραστική έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων (Fu *et al.* 2011). Βρέθηκε επίσης ότι διαθέτει ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι σειράς ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων K562 (Xu *et al.* 2009), καθώς και έναντι σειράς επιδερμικών στοματικών καρκινικών κυττάρων (Tao *et al.* 2008).

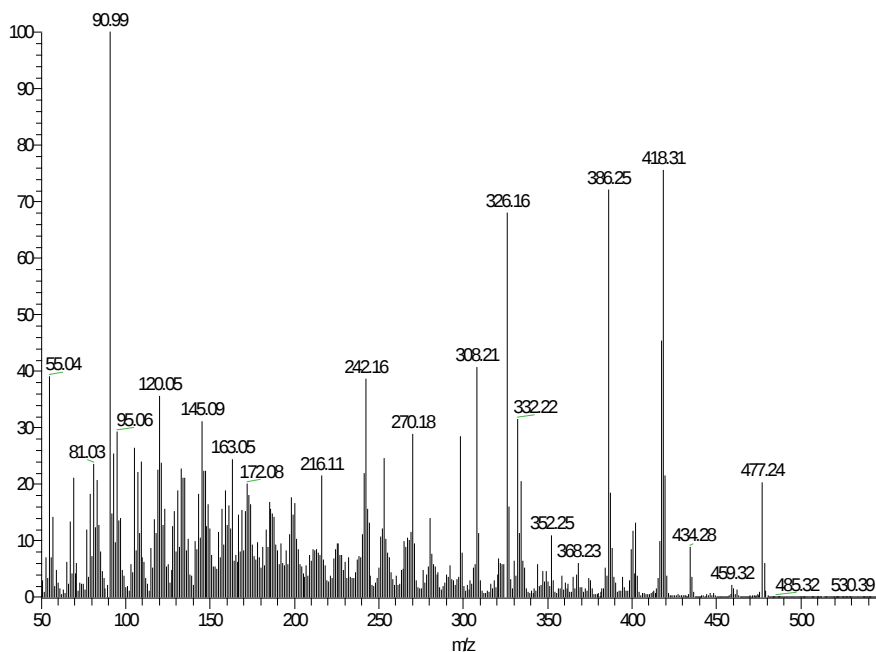
Πίνακας 64. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα *J* σε Hz)

Θέση	δ _H
2	5,55, s
3	3,24, m
4	2,11, t (4,4)
5	2,77, m
7	3,81, d (10,8)
8	2,92, t (10,8)
10a	2,84, dd (13,4, 4,4)
10b	2,62, dd (13,4, 9,9)
11	0,98, d (6,7)
12a	5,10, s
12b	5,34, s
13	5,72, ddd (15,7, 9,6, 0,9)
14	5,38, ddd (15,7, 10,5, 5,0)
15a	2,02, m
15b	1,76, m
16	1,84, m
17a	1,86, dd (14,3, 2,9)
17b	1,55, dd (14,3, 2,6)
19	5,54, d (2,0)
20	5,85, dd, (16,4, 2,9)
21	5,50, d (2,3)
22	1,03, d (6,4)
23	1,33, s
25	2,23, s
27/31	7,12, d (7,0)
28/30	7,30, t (7,0)
29	7,23, t

Μεταβολίτης 2: 18-Δεϋδροξυ-κυτοχαλασίνη Η



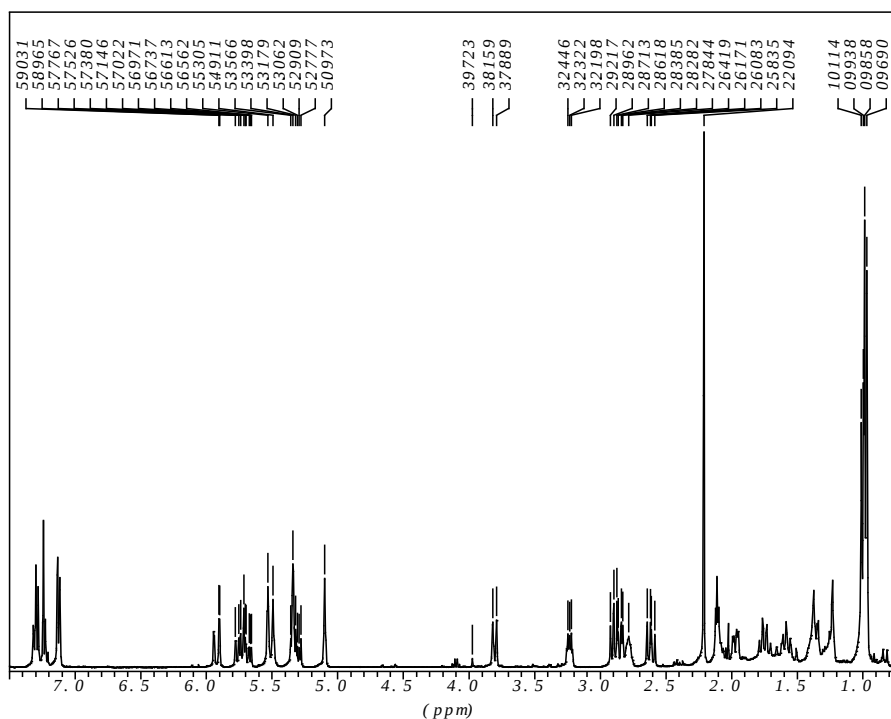
Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα μάζας 5,1 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν σε $[M]^+$ σε m/z 477 (Εικόνα 54), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{30}H_{39}NO_4$.



Εικόνα 54. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **2**

Το φάσμα 1H NMR εμφάνισε ομοιότητες με το μεταβολίτη **1** και παρέπεμπε σε κυτοχαλασίνη. Εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα στην περιοχή 7,12-7,30 ppm τα οποία αντιστοιχούν στα πέντε αρωματικά πρωτόνια των θέσεων H-27, H-28, H-29, H-30 και H-31. Στην ολεφινική περιοχή παρουσιάστηκαν τα πρωτόνια των

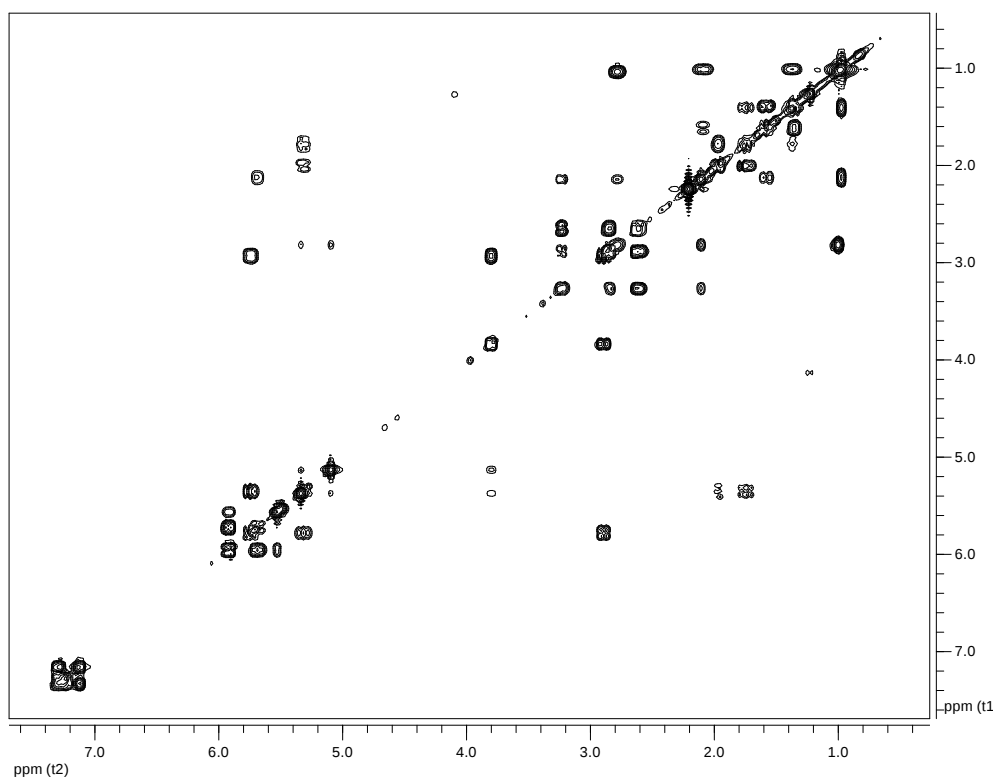
θέσεων H-13, H-14, H-19 και H-20 σε δ 5,75, 5,32, 5,69 και 5,92 αντίστοιχα. Σε υψηλότερα πεδία εμφανίστηκαν οι δύο απλές κορυφές των πρωτονίων H-12a και H-12b του εξωμεθυλενίου, στα 5,10 και 5,34 ppm αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H-2 της αμινομάδας συντονιζόταν στα 5,49 ppm, το H-21 του άνθρακα που φέρει την ακετόξυ-ομάδα στα 5,53 ppm, ενώ στην οξυγονωμένη περιοχή εμφανίστηκε το πρωτόνιο H-7 ως διπλή κορυφή σε δ 3,80. Τα μεθυλικά πρωτόνια της ακετόξυ-ομάδας έδωσαν μία απλή κορυφή στα 2,21 ppm. Σε σύγκριση με το μεταβολίτη **1**, η απουσία της υδροξυλομάδας της θέσης 18 είχε ως αποτέλεσμα τη θωράκιση των μεθυλικών πρωτονίων της θέσης H₃-23 και την εμφάνισή τους μαζί με τα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων H₃-11 και H₃-22 στην περιοχή 0,97-1,00 ppm (Εικόνα 55).



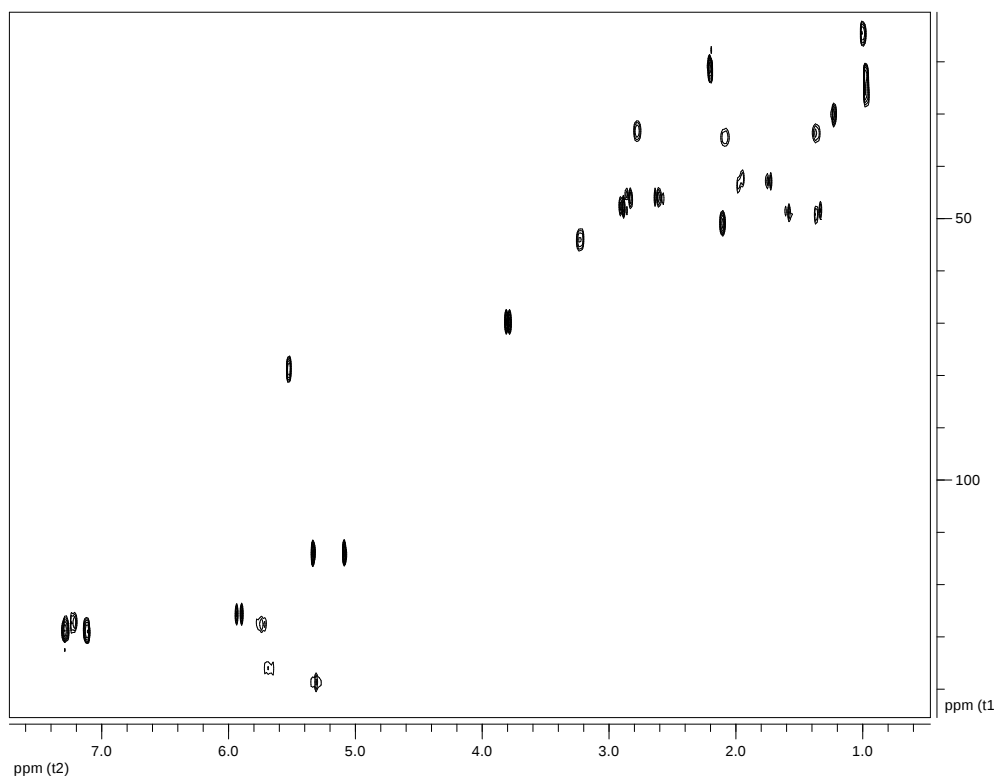
Εικόνα 55. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **2**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **2** ταυτοποιήθηκε ως η 18-δεϋδροξυ-κυτοχαλασίνη H.

Η επαλήθευση της δομής του μεταβολίτη **2** και η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων (Πίνακας 65) έγινε με τη λήψη και ανάλυση των δισδιάστατων φασμάτων ^1H - ^1H COSY και HSQC-DEPT (Εικόνες 56 & 57).



Εικόνα 56. Φάσμα ^1H - ^1H COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **2**



Εικόνα 57. Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **2**

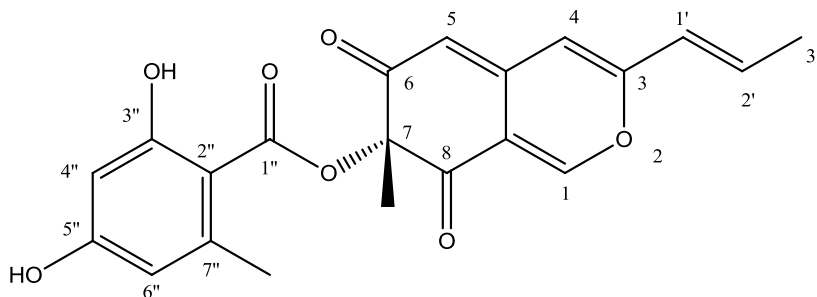
Η 18-δεϋδροξυ-κυτοχλασίνη Η έχει βρεθεί στο γένος *Geniculosporium* της οικογένειας *Xylariaceae* (Krohn *et al.* 2005). Στο γένος *Hypoxylon* έχει απομονωθεί από το είδος *H. fragiforme* (Dombrowski *et al.* 1992).

Η 18-δεϋδροξυ-κυτοχλασίνη Η έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη δράση του ενζύμου HIV-1 πρωτεάση, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση, συναρμολόγηση και ωρίμανση των δομικών πρωτεϊνών του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Lingham *et al.* 1992).

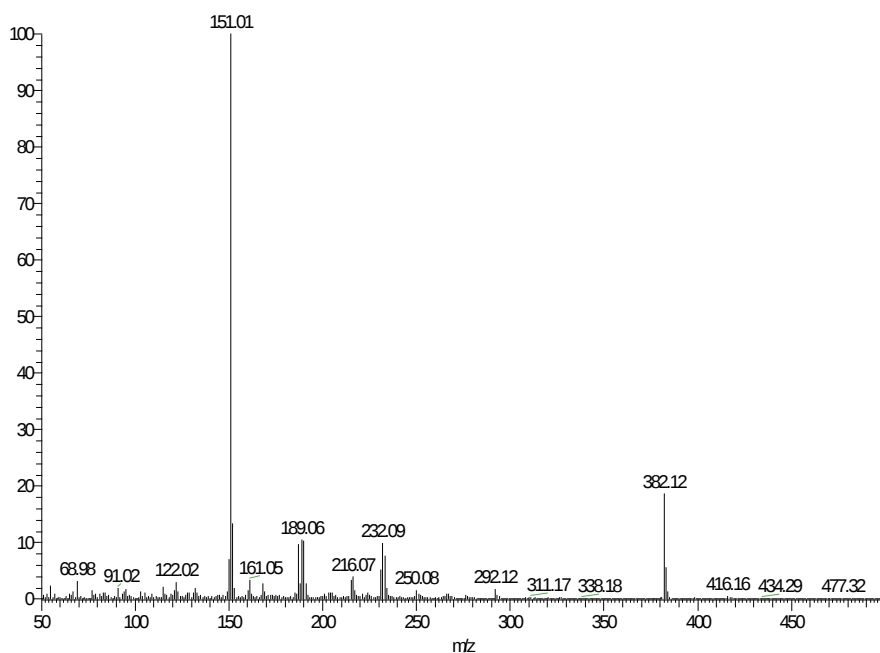
Πίνακας 65. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα *J* σε Hz)

Θέση	δ _H
2	5,49, s
3	3,23, m
4	2,11, t (4,4)
5	2,78, m
7	3,80, d (11,4)
8	2,90, t (10,2)
10a	2,85, dd (13,4, 4,1)
10b	2,61, dd (13,4, 9,6)
11	1,00, d (6,7)
12a	5,10, s
12b	5,34, s
13	5,75, dd (15,8, 9,9)
14	5,32, ddd (15,7, 11,1, 4,9)
15a	1,97, m
15b	1,75, m
16	1,37, m
17a	1,40, m
17b	1,58, m
18	2,03, m
19	5,69, ddd (16,4, 7,0, 2,0)
20	5,92, dd, (16,4, 3,2)
21	5,53, t (2,4)
22	0,97, d (7,0)
23	0,97, d (7,0)
25	2,21, s
27/31	7,12, d (7,0)
28/30	7,30, t (7,3)
29	7,23, t (7,6)

Μεταβολίτης 3: Μιτορουμπρίνη



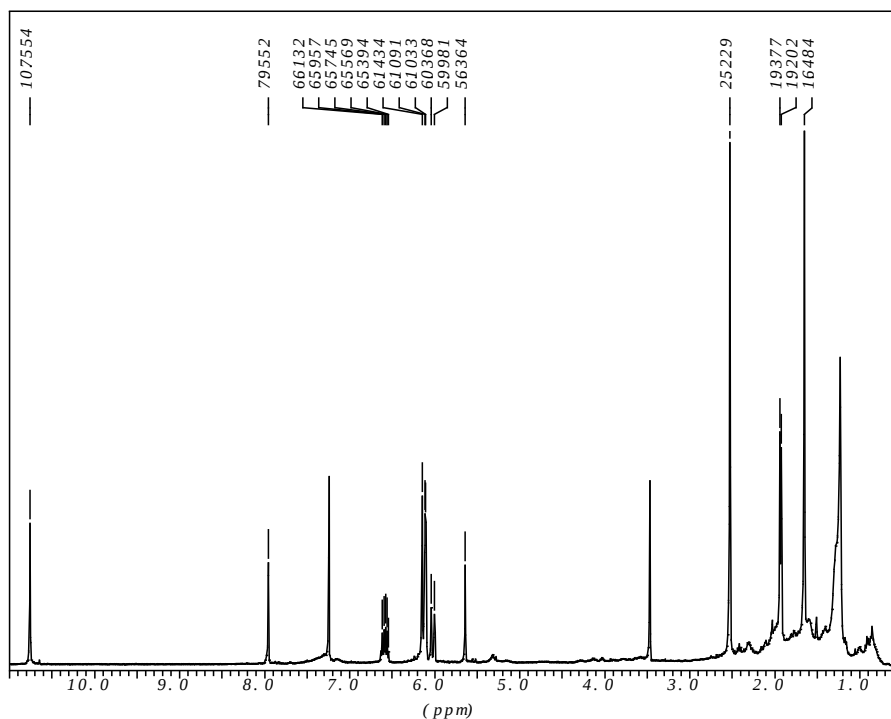
Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα συνολικής μάζας 26,2 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 382 (Εικόνα 58), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{21}H_{18}O_7$.



Εικόνα 58. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **3**

Το φάσμα 1H NMR παρέπεμπε σε αζαφιλονικό παράγωγο. Εξαιτίας του σκελετού πυρόνης-κινόνης, τα ολεφινικά πρωτόνια H-1, H-4, H-5, H-1' και H-2' εμφανίστηκαν αποθωρακισμένα σε δ 7,96, 5,64, 6,14, 6,02 και 6,58 αντίστοιχα. Τα αρωματικά πρωτόνια H-4'' και H-6'' έδωσαν δύο απλές κορυφές στα 6,10 και 6,11 ppm αντίστοιχα. Το πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 3'' σταθεροποιήθηκε

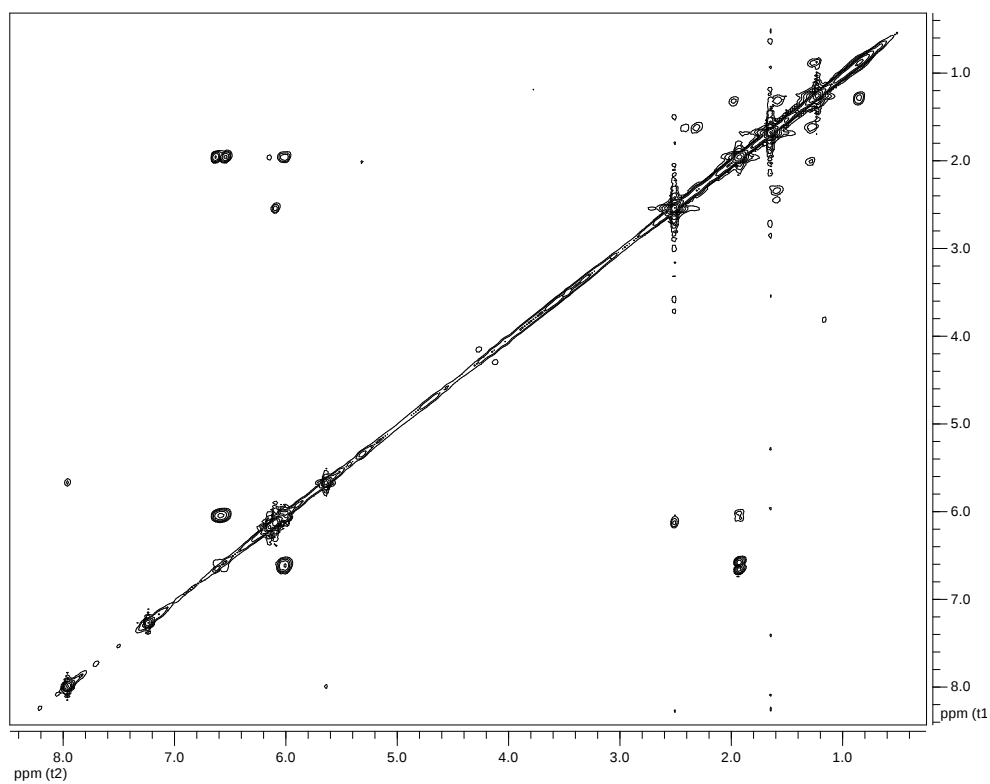
λόγω του γειτονικού καρβονυλίου της θέσης C-1” και συντονιζόταν σε δ 10,76. Τα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου εμφανίστηκαν ως απλή κορυφή στα 2,52 ppm, του βινυλικού ως διπλή κορυφή στα 1,93 ppm, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7 συντονίζονταν σε δ 1,65 (Εικόνα 59).



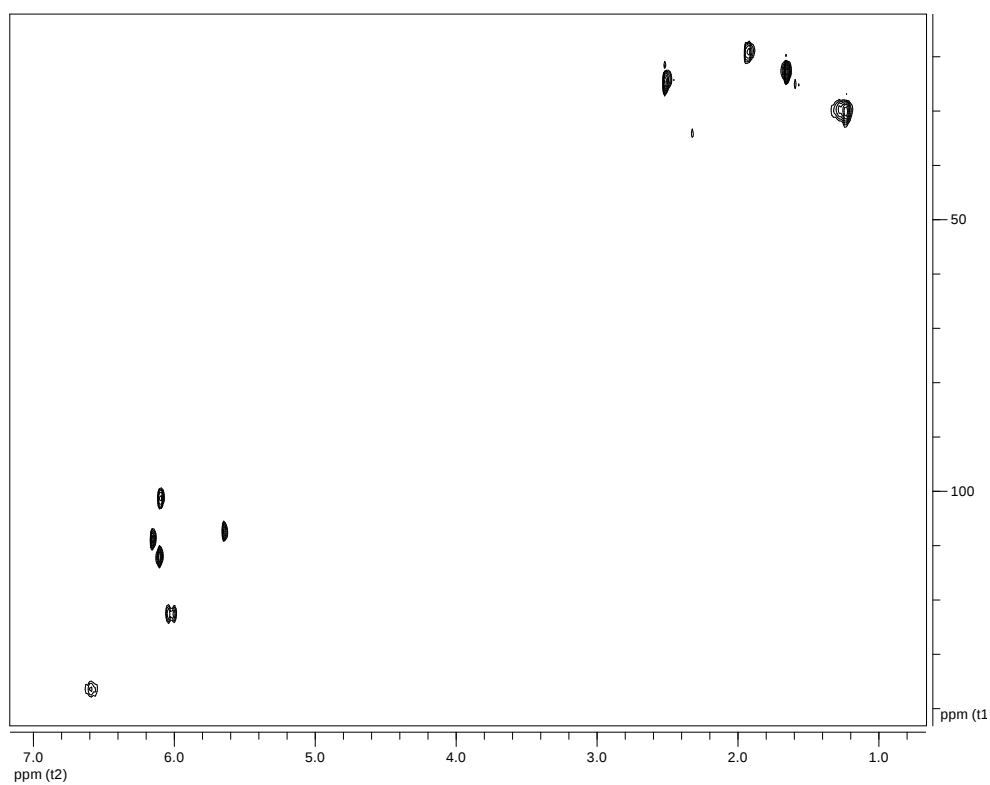
Εικόνα 59. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **3**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **3** ταυτοποιήθηκε ως το αζαφιλονικό παράγωγο μιτορουμπρίνη.

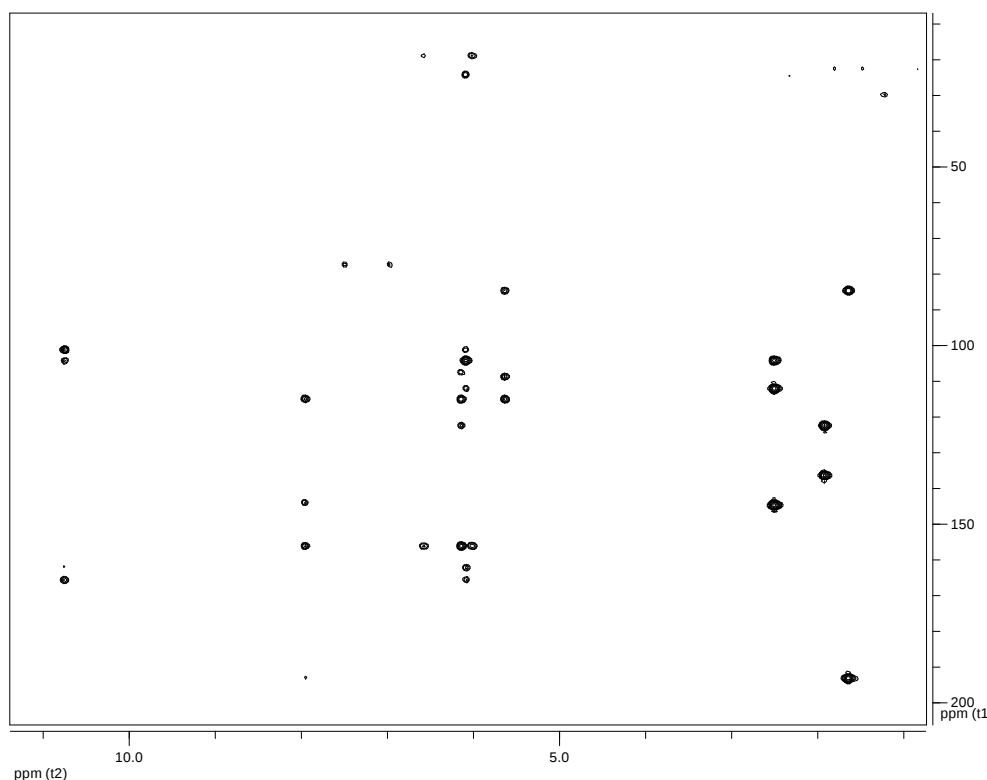
Η επαλήθευση της δομής του μεταβολίτη **3** και η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων (Πίνακας 66) έγινε με τη λήψη και ανάλυση των δισδιάστατων φασμάτων ^1H - ^1H COSY, HSQC-DEPT και HMBC (Εικόνες 60-62).



Εικόνα 60. Φάσμα ^1H - ^1H COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **3**



Εικόνα 61. Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **3**



Εικόνα 62. Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **3**

Η μιτορουμπίνη συναντάται σε είδη των οικογενειών *Xylariaceae* (*Entonaema cinnabarina*) και *Trichocomaceae* (*Penicillium rubrum*, *Talaromyces flavus*, *T. macrospores*, *T. mimosinus*, *T. udagawae*, *T. wortmannii*). Στο γένος *Hypoxylon* έχει απομονωθεί από τα είδη *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *H. fuscum*, *H. haematostroma*, *H. howeianum*, *H. pilgerianum*, *H. rubiginosum*, *H. subcrocopeplum*, *H. subgilvum*, *H. subrutiloides*, *H. subticinense* και *H. ticinense* (Osmanova *et al.* 2010).

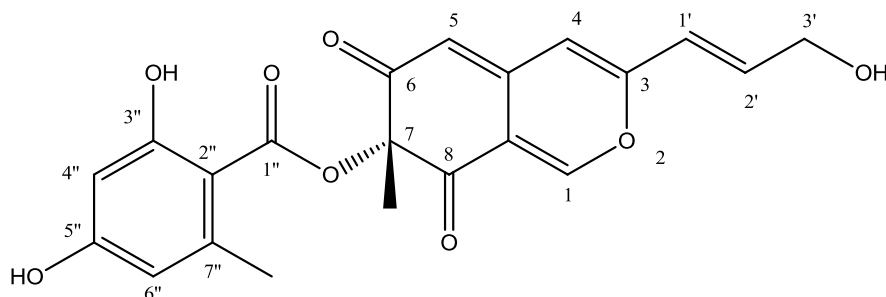
Η μιτορουμπρίνη διαθέτει μη εκλεκτική αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* και *Candida albicans* (Quang *et al.* 2005c). Επιπλέον, έχει δείξει νηματοκτόνο δράση έναντι του *Caenorhabditis elegans*, καθώς και αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis* και *Yarrowia lipolytica*. Αποτελεί και αντιμυκητιασικό παράγοντα έναντι νηματωδών μυκήτων (Stadler *et al.* 2006). Η μιτορουμπρίνη, λόγω του έντονου χρώματος της, εξετάζεται για πιθανή χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ως χρωστική (Mapari *et al.* 2005).

Πίνακας 66. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα *J* σε Hz)

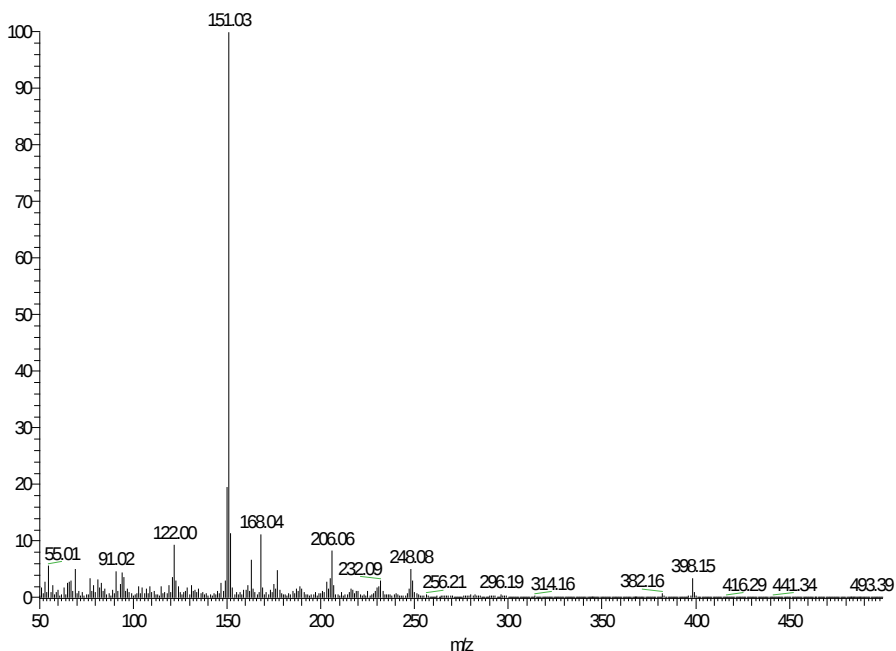
Θέση	δ _H πειραματικές τιμές	δ _H βιβλιογραφικές τιμές*
1	7,96, s	8,18, br s
4	5,64, s	5,63, d (1,0)
5	6,14, s	6,20, br s
7-CH ₃	1,65, s	1,63, s
1'	6,02, d (15,2)	6,15, dq (16,0, 1,5)
2'	6,58, m	6,68, dq (16,0, 7,0)
3'	1,93, d (7,3)	1,94, dd (7,0, 1,5)
3''-OH	-	10,76, s
4''	6,10, s	6,25, br s
6''	6,11, s	6,48, br s
7''- CH ₃	2,52, s	2,60, s

* Διαλύτης λήψης φάσματος: CD₃OD

Μεταβολίτης 4: Μιτορουμπρινόλη



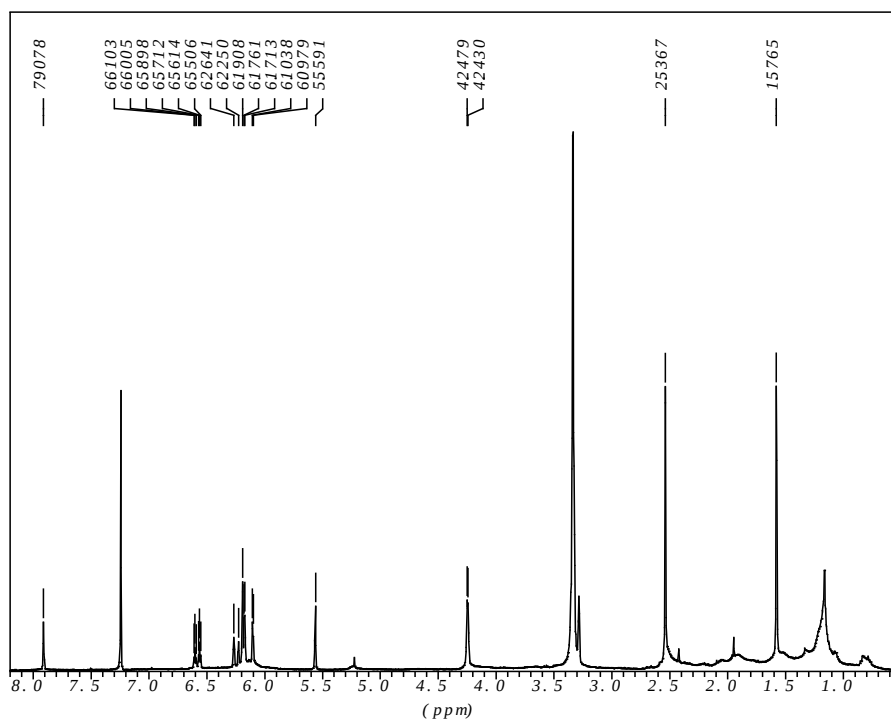
Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε ως καστανοκίτρινο ίζημα συνολικής μάζας 7,0 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 398 (Εικόνα 63), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{21}H_{18}O_8$.



Εικόνα 63. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **4**

Το φάσμα 1H NMR εμφάνισε ομοιότητες με το μεταβολίτη **3** και παρέπεμπε σε αζαφιλονικό παράγωγο. Χαρακτηριστικά ήταν τα σήματα των ολεφινικών πρωτονίων H-1, H-4, H-5, H-1' και H-2' στα 7,91, 5,56, 6,19, 6,24 και 6,58 ppm αντίστοιχα. Τα αρωματικά πρωτόνια H-4'' και H-6'' εμφανίστηκαν ως δύο διπλές κορυφές στα 6,10 και 6,17 ppm αντίστοιχα. Σε σύγκριση με το μεταβολίτη **3**, ο

μεταβολίτης **4** διέθετε μια επιπλέον υδροξυλομάδα στη θέση 3' όπως υποδείχθηκε από τα μεθυλικά πρωτόνια H₂-3' που παρουσιάζονταν ως πολλαπλή κορυφή στα 4,24 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου εμφανίστηκαν ως απλή κορυφή στα 2,54 ppm και τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7 συντονίζονταν σε δ 1,58 (Εικόνα 64).



Εικόνα 64. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃+ 3 σγ. CD₃OD) του μεταβολίτη **4**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **4** ταυτοποιήθηκε ως το αζαφιλονικό παράγωγο μιτορουμπρινόλη. Η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **4** φαίνεται στον Πίνακα 67.

Η μιτορουμπινόλη συναντάται σε είδη των οικογενειών *Xylariaceae* (*Entonaema cinnabarina*) και *Trichocomaceae* (*Penicillium funiculosum*, *P. rubrum*, *P. vermiculatum*, *P. wortmannii*, *P. invocans*, *Talaromyces wortmannii*). Στο γένος *Hypoxylon* έχει απομονωθεί από τα είδη *H. aucklandiae*, *H. crocopeplum*, *H. dihgleyae*, *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *haematostroma*, *H. howeianum*, *H. julianii*, *H. laschii*, *H. rutilum*, *H. subcrocopeplum*, *H. subgilvum*, *H. subticinense* και *H. ticinense* (Osmanova et al. 2010).

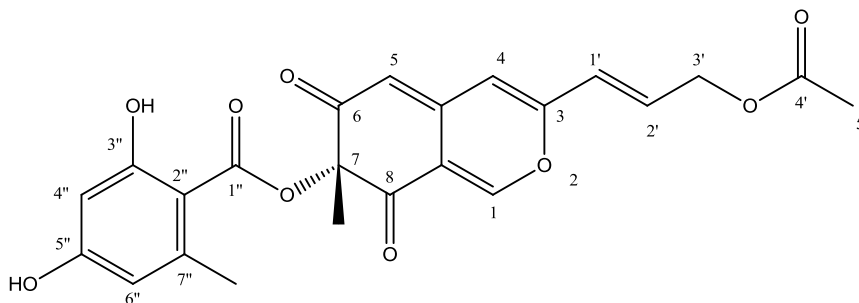
Η μιτορουμπρινόλη διαθέτει μη εκλεκτική δράση έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* και *Candida albicans*. (Quang *et al.* 2005c). Επίσης, έχει δείξει νηματοκτόνο δράση έναντι του *Caenorhabditis elegans*, καθώς και αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis* και *Yarrowia lipolytica*. Αποτελεί και αντιμυκητιασικό παράγοντα έναντι νηματωδών μυκήτων (Stadler *et al.* 2006).

Η μιτορουμπρινόλη, λόγω του έντονου χρώματος της, διαθέτει πιθανή εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων ως χρωστική (Mapari *et al.* 2005). Επιπλέον, αναστέλλει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην κυτταρική σειρά RAW 264.7 (Osmanova *et al.* 2010).

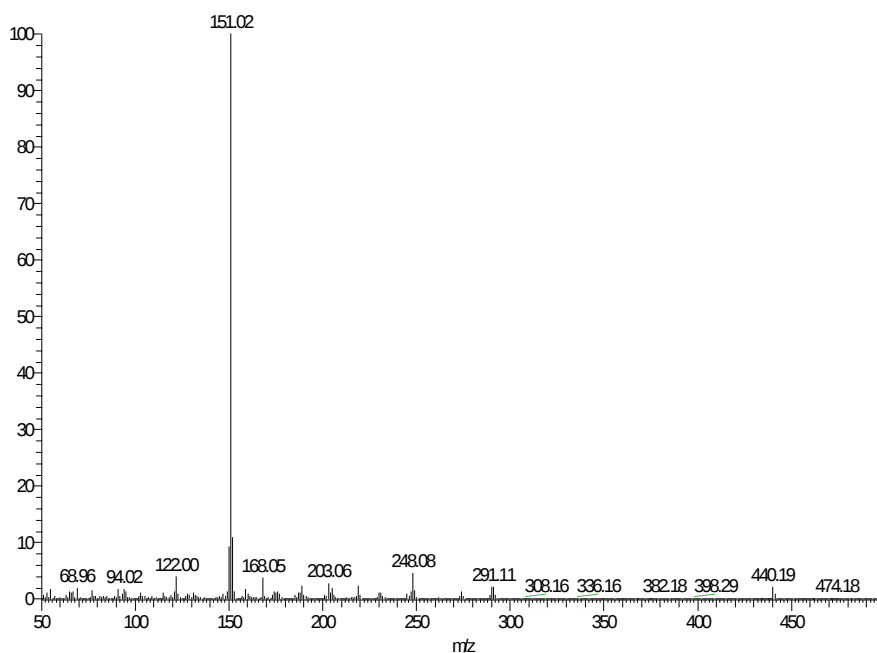
Πίνακας 67. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** σε CDCl₃+ 3 σγ. CD₃OD (δ σε ppm, πολλαπλότητα J σε Hz)

Θέση	δ _H
1	7,91, s
4	5,56, d (1,2)
5	6,19, s
7-CH ₃	1,58, s
1'	6,24, d (15,3)
2'	6,58, td (15,7, 4,3)
3'	4,24, m
4''	6,10, d (2,3)
6''	6,17, d (1,9)
7''- CH ₃	2,54, s

Μεταβολίτης 5: 3'-Ακετυλο-μιπορουμπρινόλη



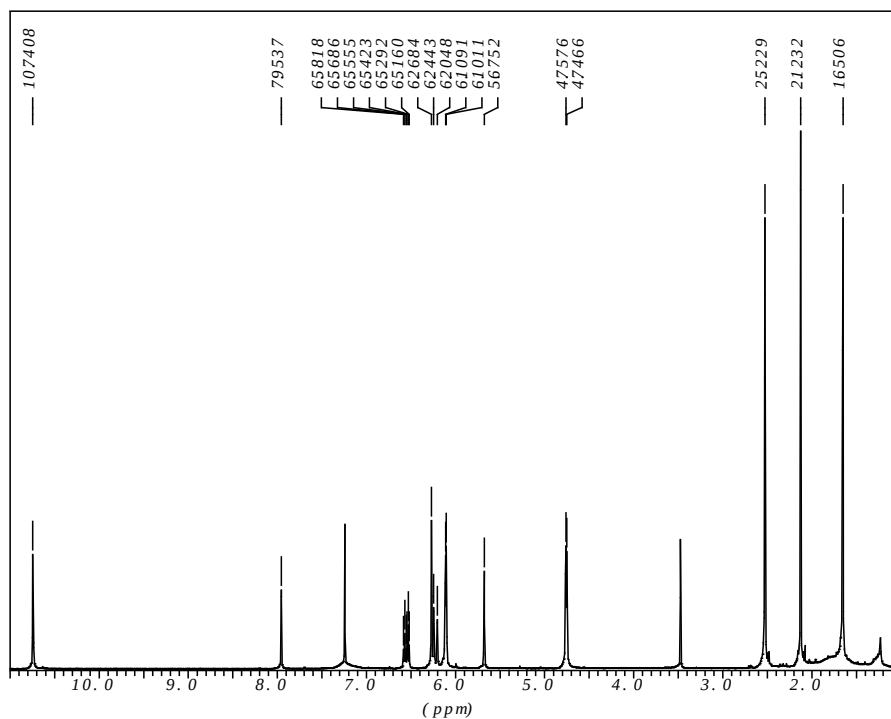
Ο μεταβολίτης **5** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα συνολικής μάζας 10,6 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 440 (Εικόνα 65), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{23}H_{20}O_9$.



Εικόνα 65. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **5**

Το φάσμα 1H NMR παρέπεμπε επίσης αζαφιλονικό παράγωγο, όπως οι μεταβολίτες **3** και **4**. Παρατηρήθηκαν τα σήματα των ολεφινικών πρωτονίων H-1, H-4, H-5, H-1' και H-2' στα 7,95, 5,67, 6,27, 6,22 και 6,55 ppm αντίστοιχα. Τα αρωματικά πρωτόνια H-4'' και H-6'' εμφανίστηκαν ως μία πολλαπλή κορυφή σε 6,10, ενώ το πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 3'' έδωσε μία απλή κορυφή στα

10,74 ppm. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H₂-3' του οξυγονωμένου C-3' συντονίζονταν σε δ 4,75. Τα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου εμφανίστηκαν ως απλή κορυφή στα 2,52 ppm και τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7 συντονίζονταν σε δ 1,65. Σε σχέση με το μεταβολίτη **4**, η ακετυλίωση της υδροξυλομάδας της θέσης 3' δικαιολογεί την αποθωράκιση των πρωτονίων H₂-3' και την εμφάνιση μιας επιπλέον απλής κορυφής στα 2,12 ppm η οποία αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια της ακετυλο-ομάδας (Εικόνα 66).



Εικόνα 66. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃) του μεταβολίτη **5**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **5** ταυτοποιήθηκε ως το αζαφιλονικό παράγωγο 3'-ακετυλο-μιτορουμπρινόλη. Η απόδοση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **5** φαίνεται στον Πίνακα 68.

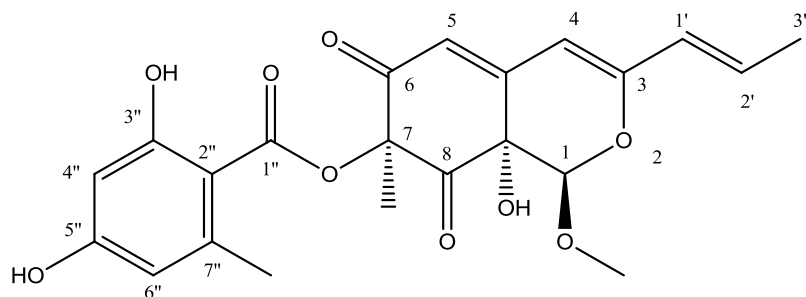
Η 3'-ακετυλο-μιτορουμπινόλη απαντάται σε είδη των οικογενειών *Xylariaceae* (*Entonaema cinnabarina*) και *Trichocomaceae* (*Talaromyces emodensis*, *T. hachijoensis*, *T. udagawae*, *T. wortmannii* var. *sublevisporus*). Στο γένος *Hypoxylon* έχει απομονωθεί από τα είδη *H. fragiforme*, *H. howeianum*, *H. pilgerianum* και *H. isubticiense* (Osmanova et al. 2010).

Η 3'-ακετυλο-μιτορουμπρινόλη έδειξε μη εκλεκτική δράση έναντι των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* και *Candida albicans* (Quang *et al.* 2005c). Επιπλέον, διαθέτει νηματοκτόνο δράση έναντι του *Caenorhabditis elegans*, καθώς και αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis* και *Yarrowia lipolytica*. Αναφέρεται ότι αποτελεί και αντιμυκητιασικό παράγοντα έναντι νηματωδών μυκήτων (Stadler *et al.* 2006).

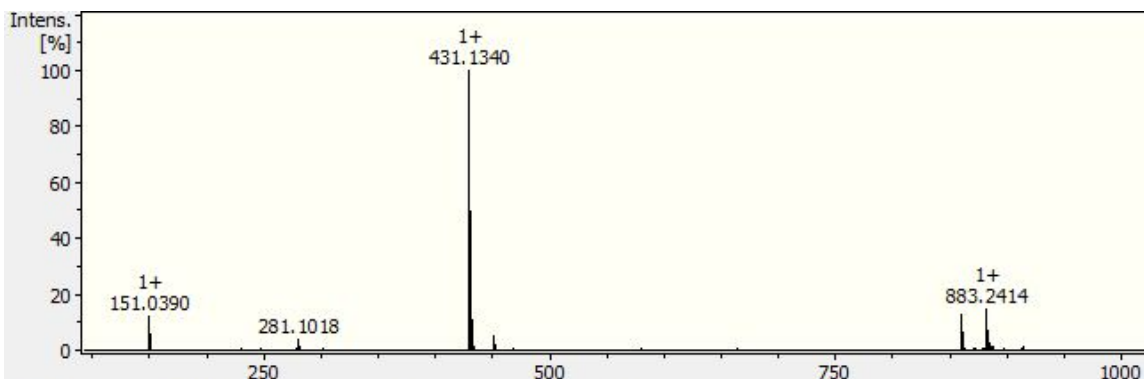
Πίνακας 68. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **5** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα *J* σε Hz)

Θέση	δ _H
1	7,95, s
4	5,67, s
5	6,27, s
7-CH ₃	1,65, s
1'	6,22, d (15,8)
2'	6,55, td (15,8, 5,3)
3'	4,75, dd (5,3, 1,5)
3''-OH	10,74, s
4''	6,10, m
6''	6,10, m
7''- CH ₃	2,52, s
OAc	2,12, s

Μεταβολίτης 6

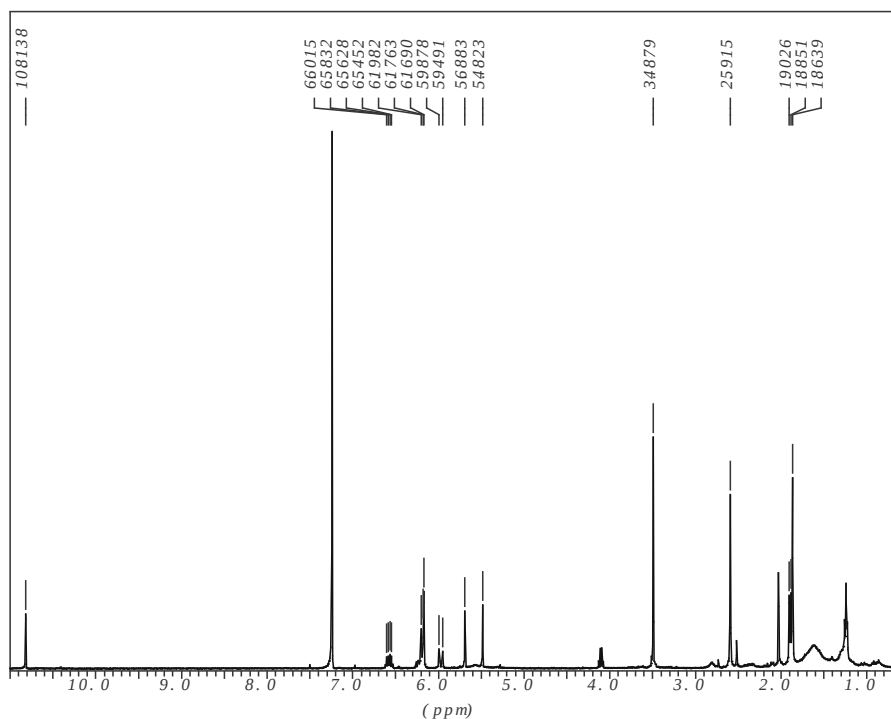


Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα μάζας 1,3 mg. Στο φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HR-ESI-MS) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 431.1340 (Εικόνα 67), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{22}H_{22}O_9$.



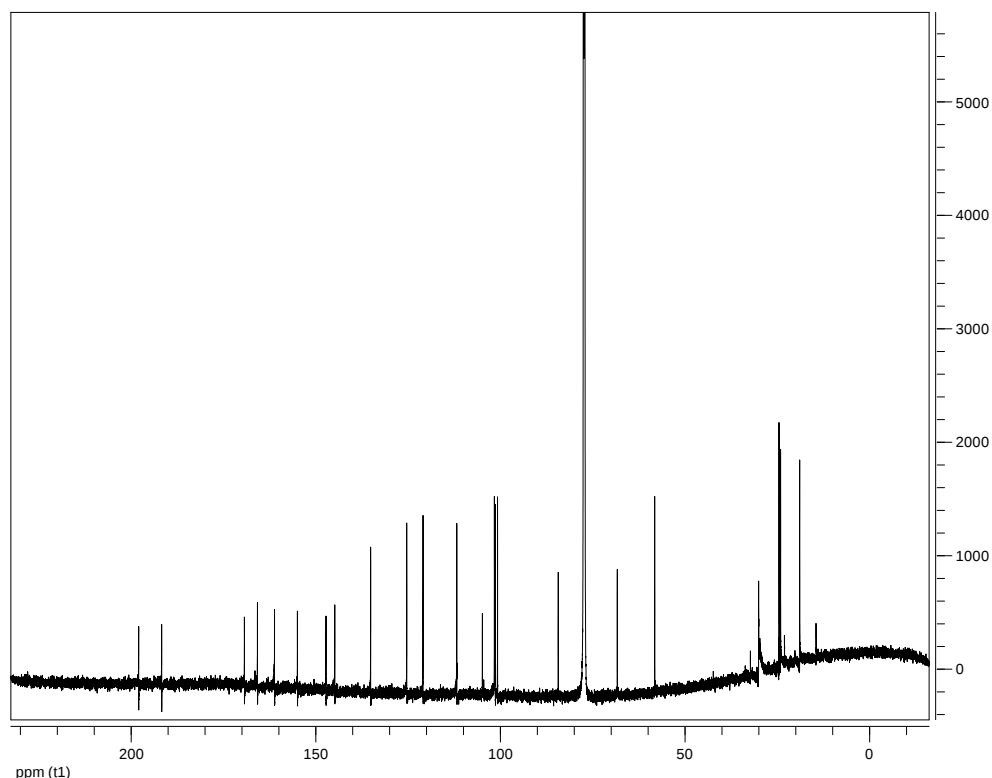
Εικόνα 67. Φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HR-ESI-MS) του μεταβολίτη **6**

Το φάσμα 1H NMR εμφάνισε ομοιότητες με το μεταβολίτη **3** οι οποίες παρέπεμπαν σε αζαφιλονικό παράγωγο. Παρατηρήθηκαν κορυφές στα 5,69, 6,16, 5,96 και 6,56 ppm που αντιστοιχούν στα ολεφινικά πρωτόνια H-4, H-5, H-1' και H-2'. Τα αρωματικά πρωτόνια H-4'' και H-6'' εμφανίστηκαν ως δύο διπλές κορυφές σε δ 6,17 και 6,20 αντίστοιχα, ενώ το πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 3'' συντονιζόταν στα 10,81 ppm. Το πρωτόνιο H-1 του οξυγονωμένου C-1 έδωσε μία απλή κορυφή σε δ 5,48 και τα μεθυλικά πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας μία απλή κορυφή στα 3,48 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου εμφανίστηκαν ως απλή κορυφή στα 2,59 ppm, του βινυλικού μεθυλίου ως διπλή κορυφή στα 1,87 ppm, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7 συντονιζόνταν σε δ 1,85 (Εικόνα 68).



Εικόνα 68. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **6** παρατηρήθηκαν συνολικά 22 κορυφές, η πλήρης απόδοση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 69. Οι κορυφές των καρβονυλικών ανθράκων C-6 και C-8 εμφανίστηκαν αποθωρακισμένες στα 197,8 και 191,5 ppm αντίστοιχα, ενώ του καρβονυλικού άνθρακα C-1” εμφανίστηκε στα 169,1 ppm. Στην αρωματική-ολεφινική περιοχή εμφανίστηκαν 12 κορυφές ανθράκων σε δ 101,1 έως 165,6, ενώ οι οξυγονωμένοι αλειφατικοί άνθρακες C-1, C-7 και C-8α συντονίζονταν στα 100,5, 84,0 και 68,0 ppm αντίστοιχα. Ο άνθρακας του μεθοξυλίου εμφανίστηκε στα 57,9 ppm, του αρωματικού μεθυλίου στα 24,2 ppm, του βινυλικού μεθυλίου στα 18,6 ppm και του αλειφατικού μεθυλίου στα 23,7 ppm (Εικόνα 69).



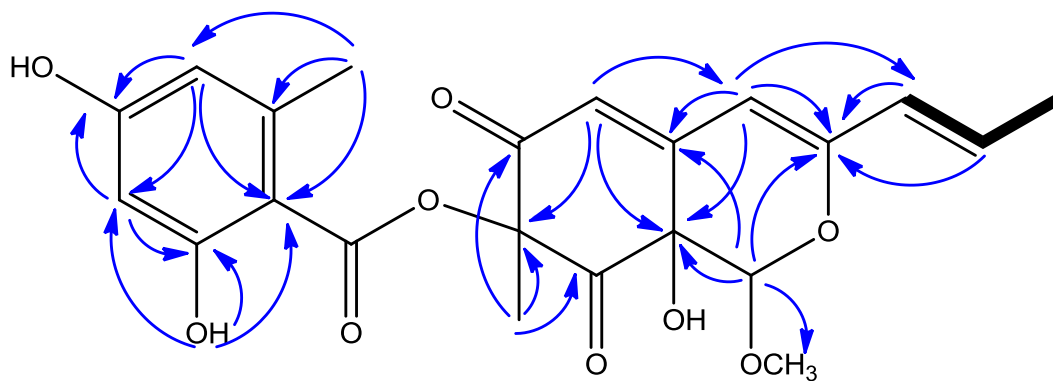
Εικόνα 69. Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

Η απόδοση της δομής του μεταβολίτη **6** έγινε με τη λήψη και ανάλυση των δισδιάστατων φασμάτων ^1H - ^1H COSY, HSQC-DEPT και HMBC (Εικόνες 70-72).

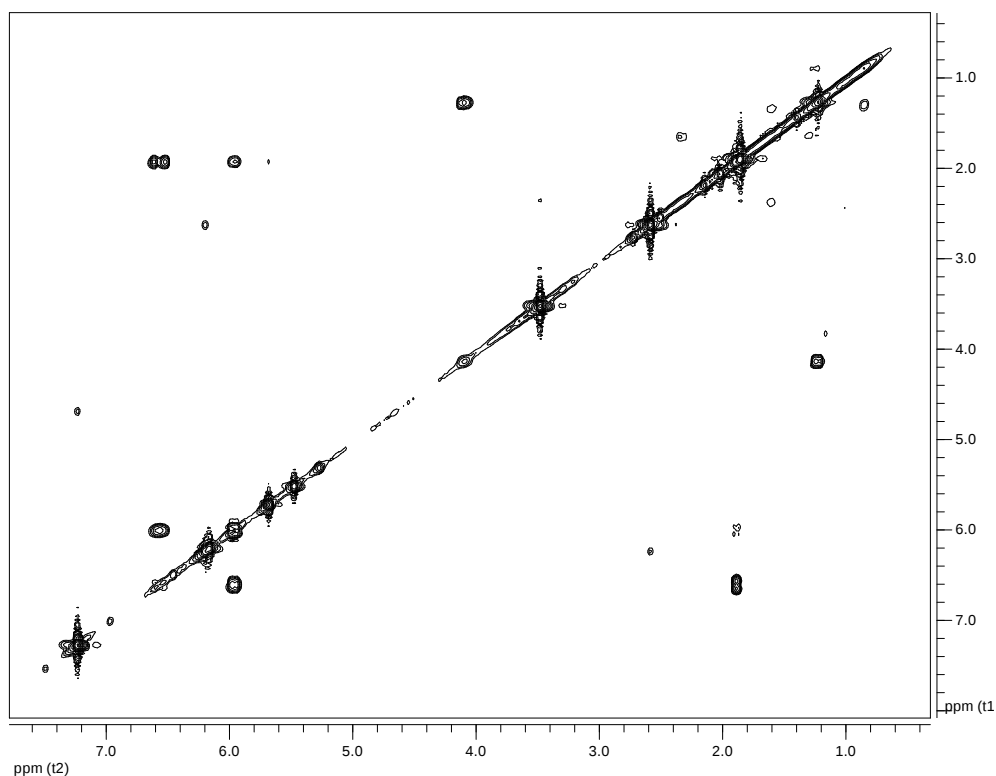
Το ομοπυρηνικό φάσμα ^1H - ^1H COSY εμφάνισε τις συζεύξεις μεταξύ των ολεφινικών πρωτονίων των θέσεων 1' και 2', καθώς και του πρωτονίου H-2' με το μεθύλιο της θέσης 3 (Σχήμα 3).

Σύγκριση με τα φάσματα του μεταβολίτη **3** κατέστησε εμφανή την απουσία διπλού δεσμού μεταξύ των C-1 και C-8a, καθώς και την ύπαρξη ενός επιπλέον υδροξυλίου και ενός μεθοξυλίου στο μόριο. Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα σήματα στο φάσμα HMBC μεταξύ του H-1 και των C-3, C-4a και C-8a, καθώς υποδεικνύουν την παρουσία του πρωτονίου στον C-1 και του υδροξυλίου στον C-8a. Επιπλέον, η συσχέτιση ανάμεσα στο H-1 και τον άνθρακα του μεθοξυλίου επιβεβαιώνουν την παρουσία του τελευταίου στη θέση 1 του μορίου. Άλλες σημαντικές συσχετίσεις παρουσιάστηκαν μεταξύ του πρωτονίου H-4 και των C-3, C-4a, C-8a, C-1', του πρωτονίου H-5 και των C-4, C-7, C-8a, των πρωτονίων του μεθυλίου της θέσης 7 και των C-6, C-7, C-8, των πρωτονίων H-1', H-2' και του C-3, του πρωτονίου του υδροξυλίου της θέσης 3'' και των C-2'', C-3'', C-4'', του

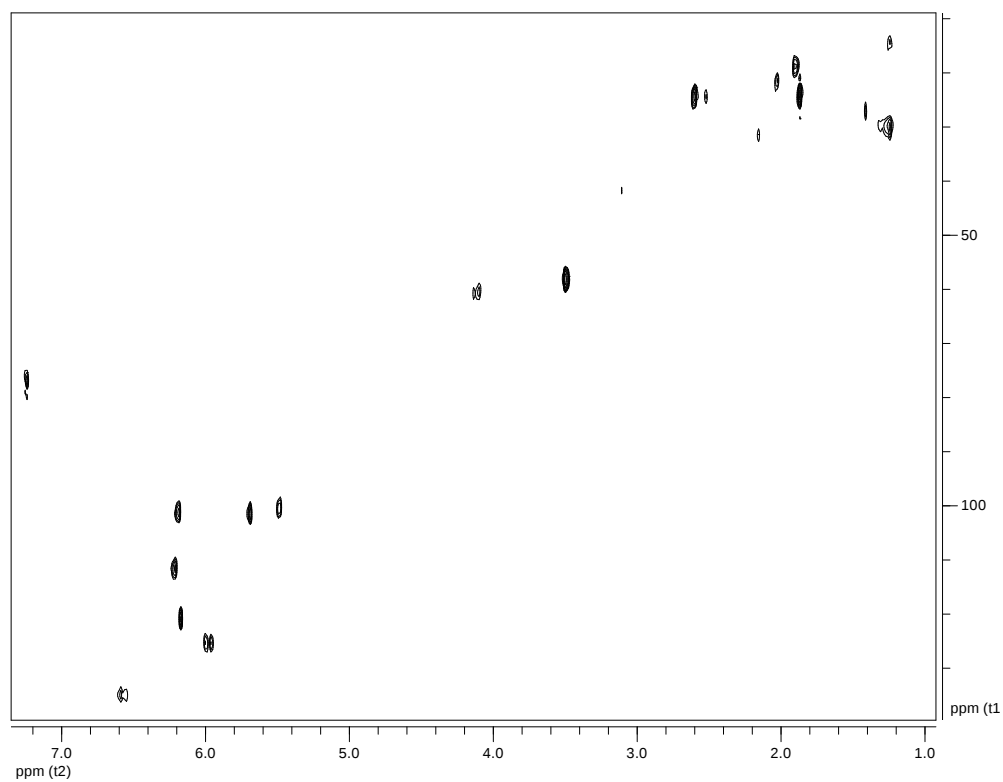
πρωτονίου H-4'' και των C-3'', C-5'', του πρωτονίου H-6'' και των C-2'', C-4'', C-5'' και τέλος των πρωτονίων του αρωματικού μεθυλίου της θέσης 7'' και των C-2'', C-6'', C-7'' (Σχήμα 3).



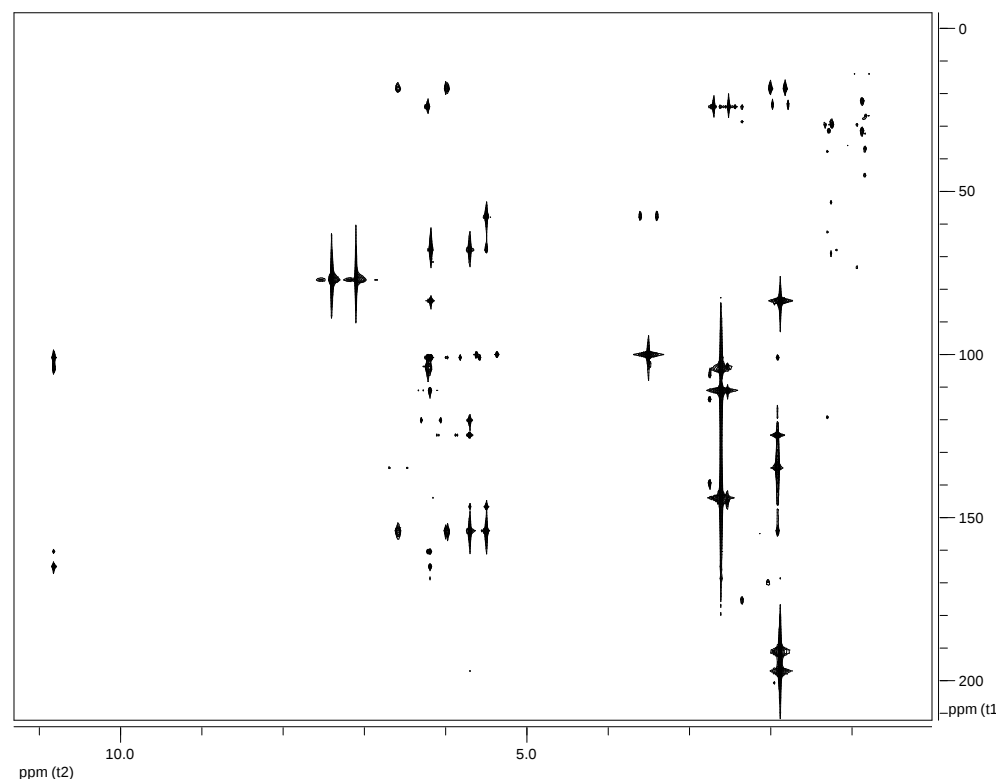
Σχήμα 3. Συζεύξεις $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ HMBC (βέλη) και $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ COSY (έντονοι δεσμοί) του μεταβολίτη **6**



Εικόνα 70. Φάσμα $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

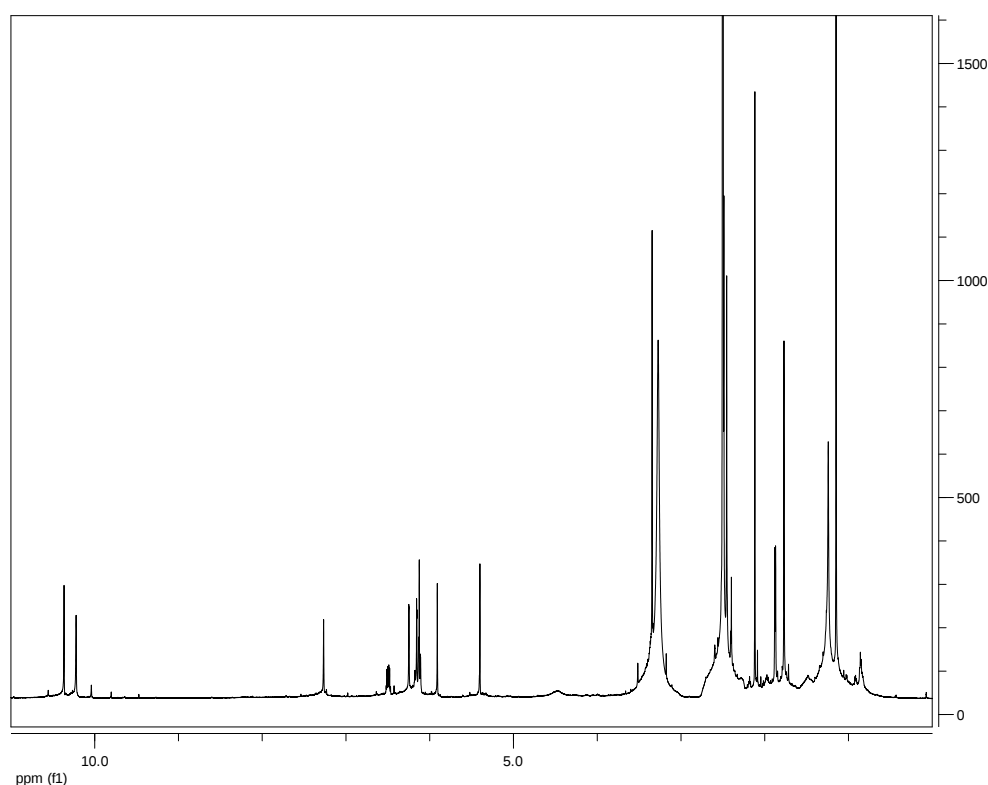


Εικόνα 71. Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

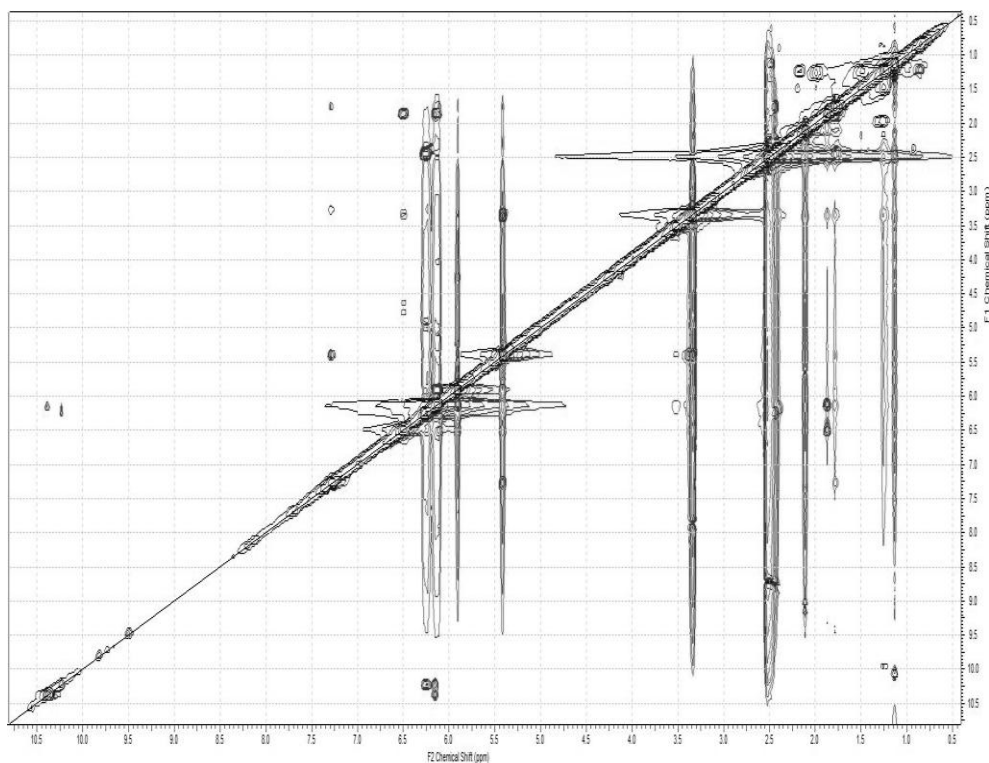


Εικόνα 72. Φάσμα HMBC (CDCl_3) του μεταβολίτη **6**

Η απόδοση της σχετικής στεreoχημείας των ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **6** πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του φάσματος ROESY, η λήψη του οποίου έγινε σε DMSO- d_6 ώστε να καταστεί εμφανές το σήμα για το ευκίνητο πρωτόνιο του 8α-OH (Εικόνες 73 & 74). Οι συσχετίσεις ROE που παρατηρήθηκαν μεταξύ του πρωτονίου του 8α-OH (δ 7,27) και των πρωτονίων 7-CH $_3$ (δ 1,77) και H-1 (δ 5,40) καθόρισαν τη σχετική στεreoχημεία στα ασύμμετρα κέντρα C-1, C-7 και C-8α ως 1*R**,7*S**,8α*R**. Επιπλέον, η γεωμετρία του διπλού δεσμού στον C-1' προσδιορίστηκε ως *E* με βάση τη μεγάλη σταθερά σύζευξης που παρατηρήθηκε μεταξύ των H-1' και H-2' (J = 15,2 Hz).



Εικόνα 73. Φάσμα ^1H NMR (DMSO- d_6) του μεταβολίτη **6**



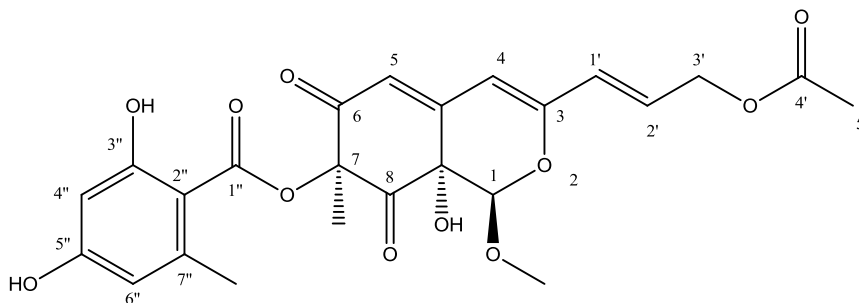
Εικόνα 74. Φάσμα ROESY (DMSO-d₆) του μεταβολίτη **6**

Σύμφωνα με την βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **6** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 69.

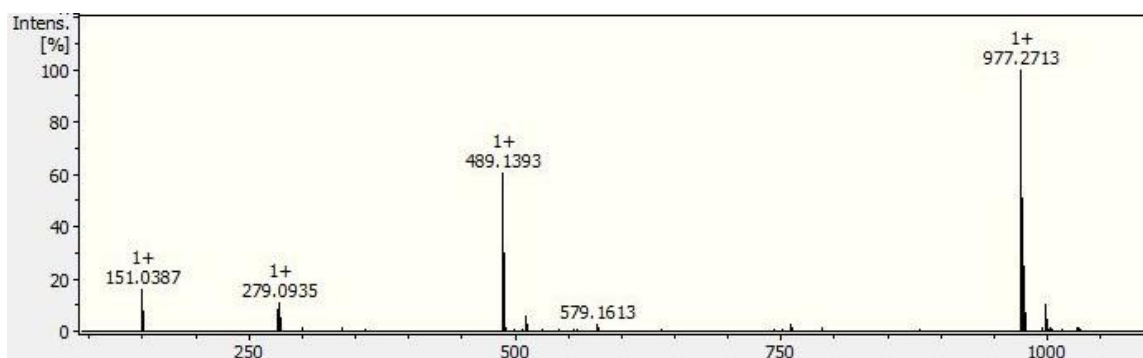
Πίνακας 69. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα J σε Hz)

Θέση	δ_H	δ_C
1	5,48, s	100,5
1-OCH ₃	3,48, s	57,9
3	-	154,8
4	5,69, s	101,3
4a	-	147,0
5	6,16, s	120,7
6	-	197,8
7	-	84,0
7-CH ₃	1,85, s	23,7
8	-	191,5
8a	-	68,0
1'	5,96, dd (15,2, 1,5)	125,1
2'	6,56, m	134,9
3'	1,87, d (6,7)	18,6
1''	-	169,1
2''	-	104,6
3''	-	165,6
3''-OH	10,81, s	-
4''	6,17, d (2,4)	101,1
5''	-	161,0
6''	6,20, d (2,4)	111,5
7''	-	144,6
7''- CH ₃	2,59, s	24,2

Μεταβολίτης 7



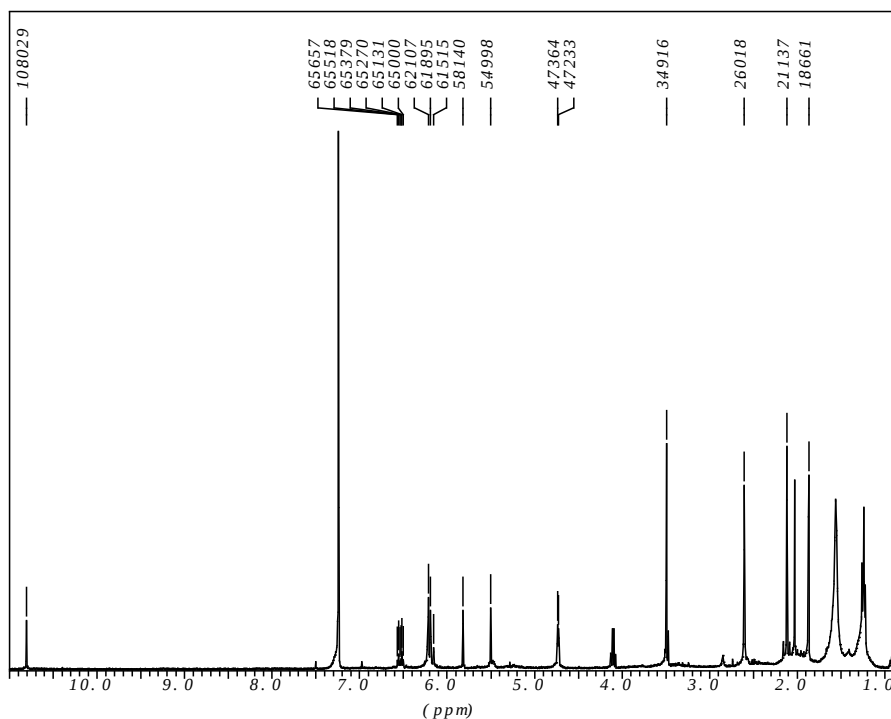
Ο μεταβολίτης **7** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα μάζας 0,9 mg. Στο φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HR-ESI-MS) εμφάνισε ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ σε m/z 489.1393 (Εικόνα 75), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{24}H_{24}O_{11}$.



Εικόνα 75. Φάσμα μάζας υψηλής ευκρίνειας (HR-ESI-MS) του μεταβολίτη **7**

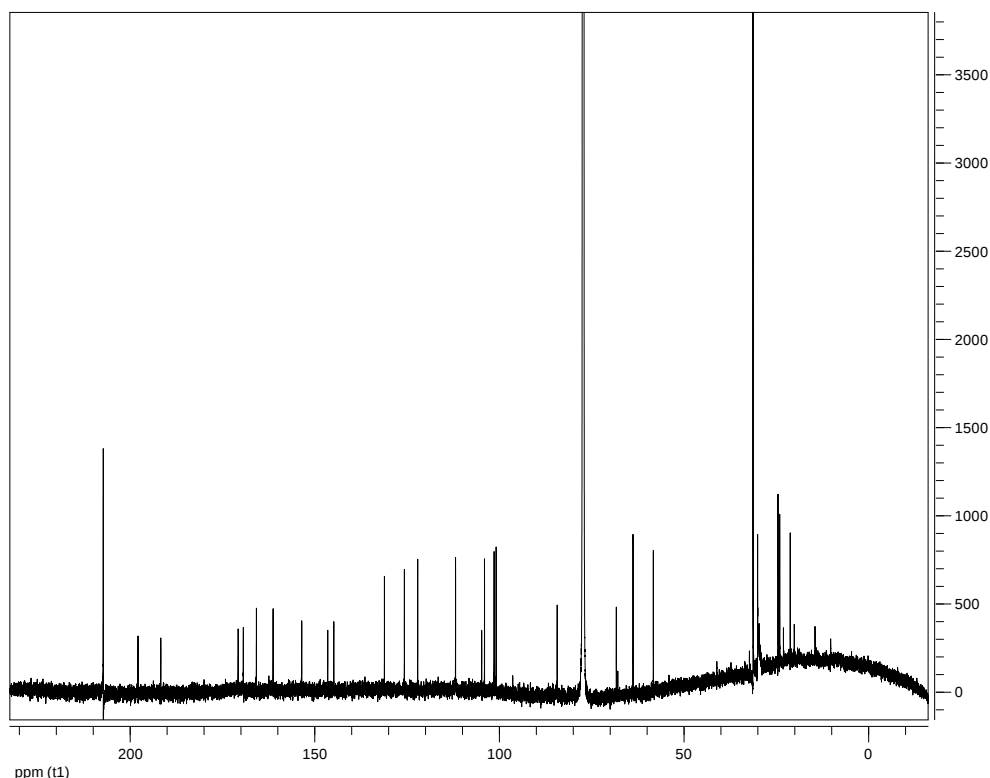
Το φάσμα 1H NMR παρουσίαζε ομοιότητες με τους μεταβολίτες **5** και **6** οι οποίες παρέπεμπαν σε αζαφιλονικό παράγωγο. Εμφανίστηκαν τα ολεφινικά πρωτόνια H-4, H-5, H-1' και H-2' που συντονίζονταν σε δ 5,79, 6,21, 6,16 και 6,52. Τα πρωτόνια H-4'' και H-6'' του αρωματικού πυρήνα έδωσαν δύο διπλές κορυφές στα 6,18 και 6,22 ppm αντίστοιχα και το πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 3'' παρατηρήθηκε στα 10,80 ppm. Το πρωτόνιο H-1 του οξυγονωμένου C-1 συντονιζόταν σε δ 5,50, ενώ τα μεθυλικά πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας έδωσαν μία απλή κορυφή στα 3,48 ppm. Σε σύγκριση με το μεταβολίτη **6**, ο μεταβολίτης **7** διέθετε μια επιπλέον ακετοξυ-ομάδα στη θέση 3'. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H_2-3' παρουσιάστηκαν ως διπλές διπλών κορυφές στα 4,71 και 4,73 ppm και τα μεθυλικά πρωτόνια της ακετοξυ-ομάδας ως μία απλή κορυφή στα 2,11 ppm.

Τέλος, τα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου εμφανίστηκαν ως απλή κορυφή στα 2,60 ppm και τα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 7 ως απλή κορυφή σε δ 1,86 (Εικόνα 76).



Εικόνα 76. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**

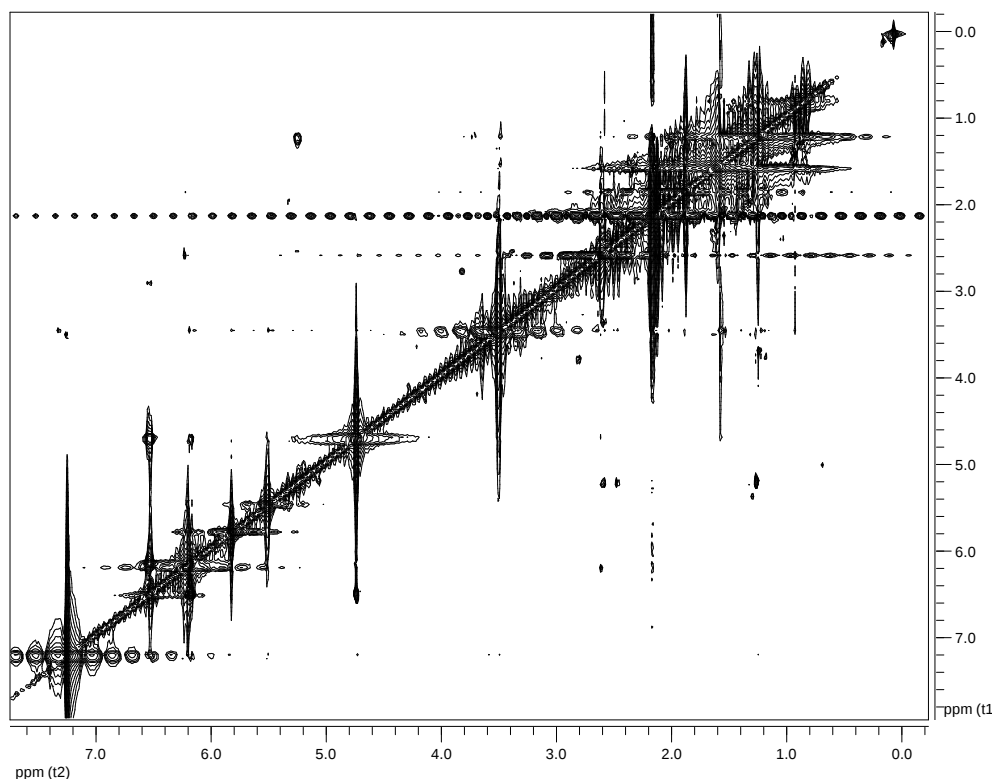
Στο φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **7** παρατηρήθηκαν συνολικά 24 κορυφές, η πλήρης απόδοση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 70. Οι κορυφές ήταν ανάλογες με εκείνες του μεταβολίτη **6**. Παρατηρήθηκε μία επιπλέον κορυφή καρβονυλικού άνθρακα στα 170,4 ppm και άνθρακα μεθυλίου στα 20,7 ppm που αντιστοιχούσαν σε αυτούς της ακετοξυ-ομάδας, ενώ ο άνθρακας του μεθυλενίου της θέσης 3' συντονιζόταν στα 63,5 ppm. (Εικόνα 77).



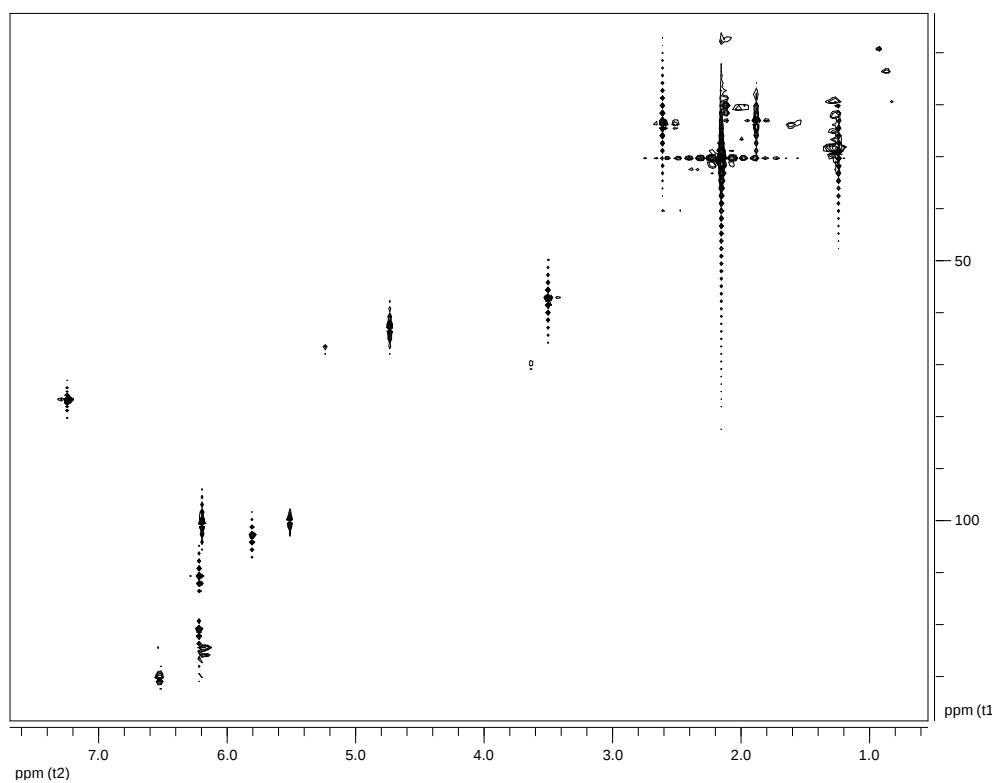
Εικόνα 77. Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**

Η απόδοση της δομής του μεταβολίτη **7** έγινε με τη λήψη και ανάλυση των δισδιάστατων φασμάτων ^1H - ^1H COSY, HSQC-DEPT και HMBC (Εικόνες 78-80).

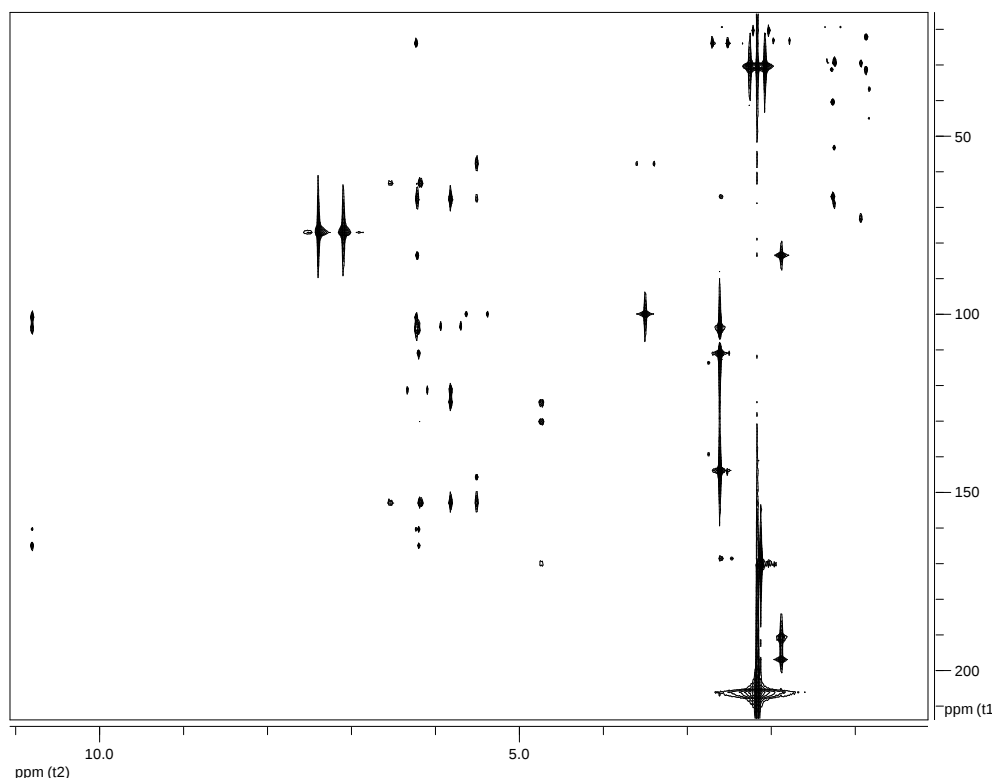
Τα σήματα που παρατηρήθηκαν στα φάσματα COSY και HMBC ήταν ανάλογα με αυτά του μεταβολίτη **6**, υποδεικνύοντας και ανάλογη μοριακή δομή. Επιπρόσθετη σημαντική συσχέτιση είναι αυτή ανάμεσα στα μεθυλικά πρωτόνια και τον καρβονυλικό άνθρακα της ακετόξυ-ομάδας. Επιπλέον, η συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων H_2 -3' και του καρβονυλικού άνθρακα της ακετοξυ-ομάδας, επιβεβαιώνουν την παρουσία της στη θέση 3' του μορίου.



Εικόνα 78. Φάσμα ^1H - ^1H COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**

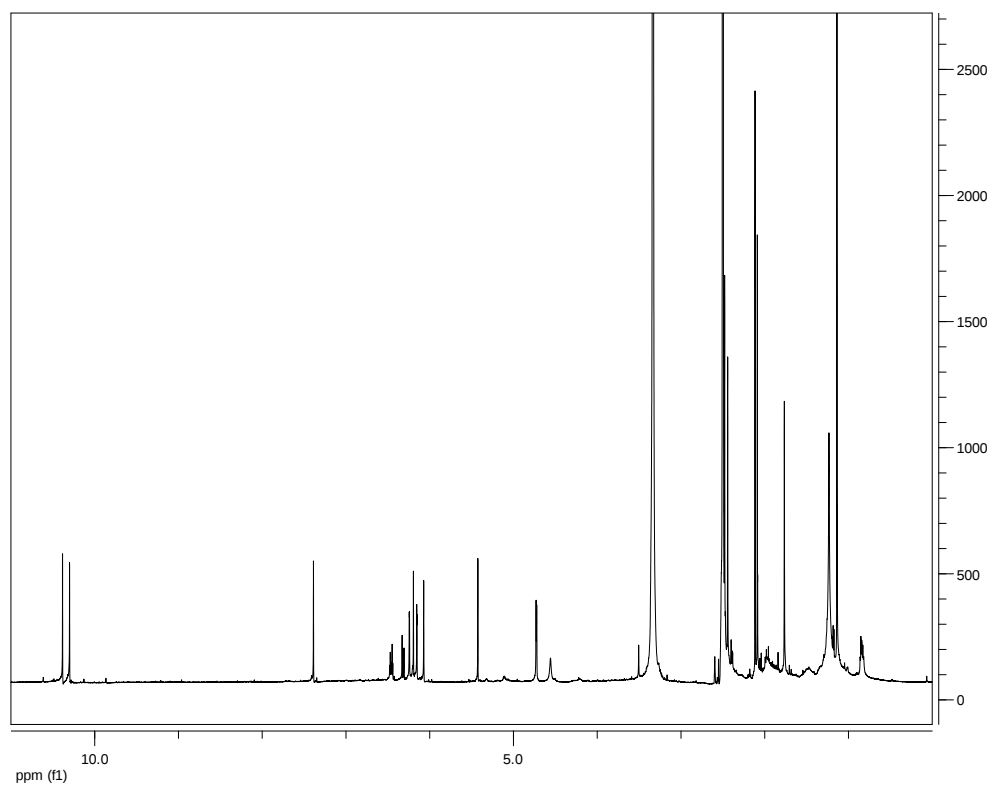


Εικόνα 79. Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **7**

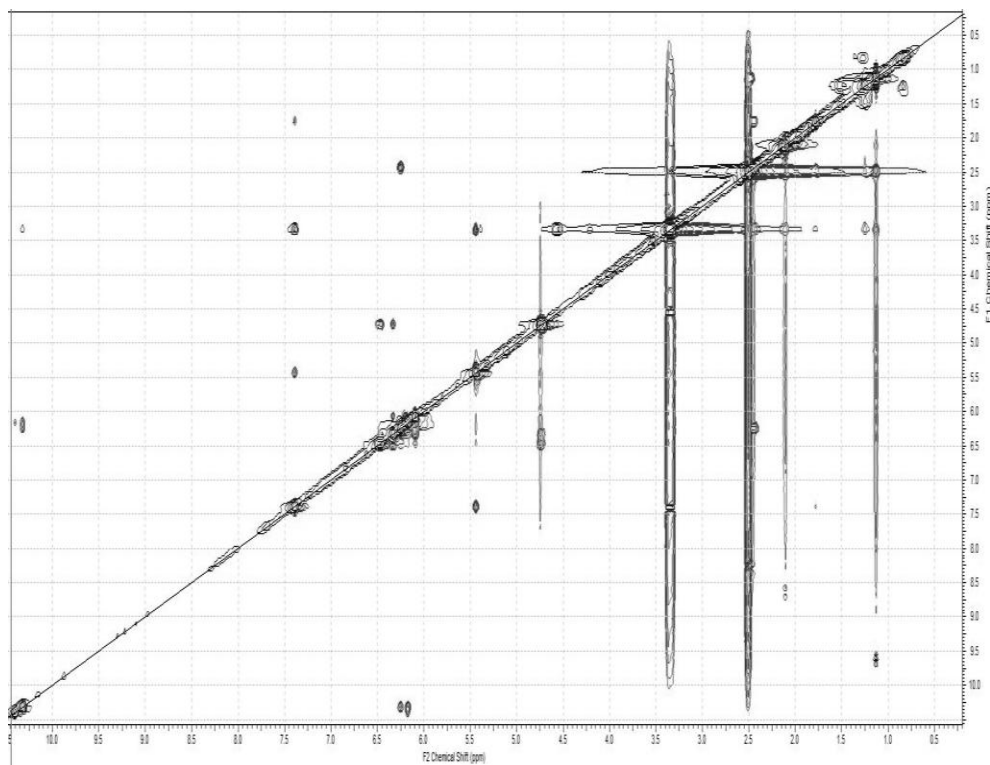


Εικόνα 80. Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **7**

Η απόδοση της σχετικής στερεοχημείας των ασύμμετρων κέντρων του μεταβολίτη **7** πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του φάσματος ROESY, η λήψη του οποίου έγινε σε DMSO-d₆ ώστε να καταστεί εμφανές το σήμα για το ευκίνητο πρωτόνιο του 8α-OH (Εικόνες 81 & 82). Όπως και στην περίπτωση του μεταβολίτη **6**, παρατηρήθηκαν συσχετίσεις ROE μεταξύ του πρωτονίου του 8α-OH (δ 7,39) και των πρωτονίων 7-CH₃ (δ 1,77) και H-1 (δ 5,42), με βάση τις οποίες η σχετική στερεοχημεία στα ασύμμετρα κέντρα C-1, C-7 και C-8α καθορίστηκε ως 1*R**, 7*S**, 8α*R**. Ακόμη, με βάση τη μεγάλη σταθερά σύζευξης που παρατηρήθηκε μεταξύ των H-1' και H-2' (J = 15,4 Hz) η γεωμετρία του διπλού δεσμού στον C-1' προσδιορίστηκε ως *E*.



Εικόνα 81. Φάσμα ^1H NMR (DMSO-d_6) του μεταβολίτη **7**



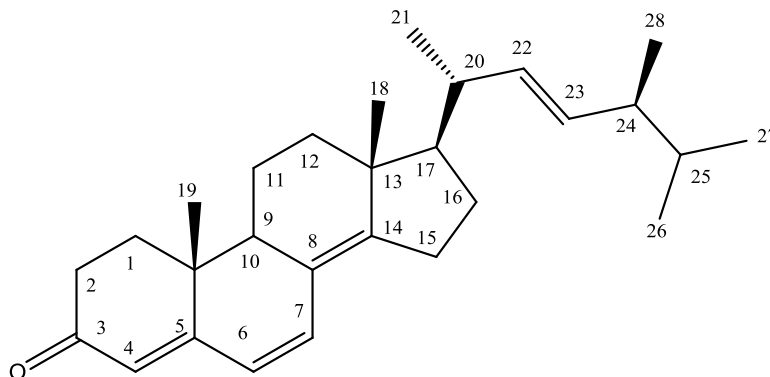
Εικόνα 82. Φάσμα ROESY (DMSO-d_6) του μεταβολίτη **7**

Σύμφωνα με την βιβλιογραφική αναζήτηση, ο μεταβολίτης **7** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, τα φασματοσκοπικά δεδομένα του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 70.

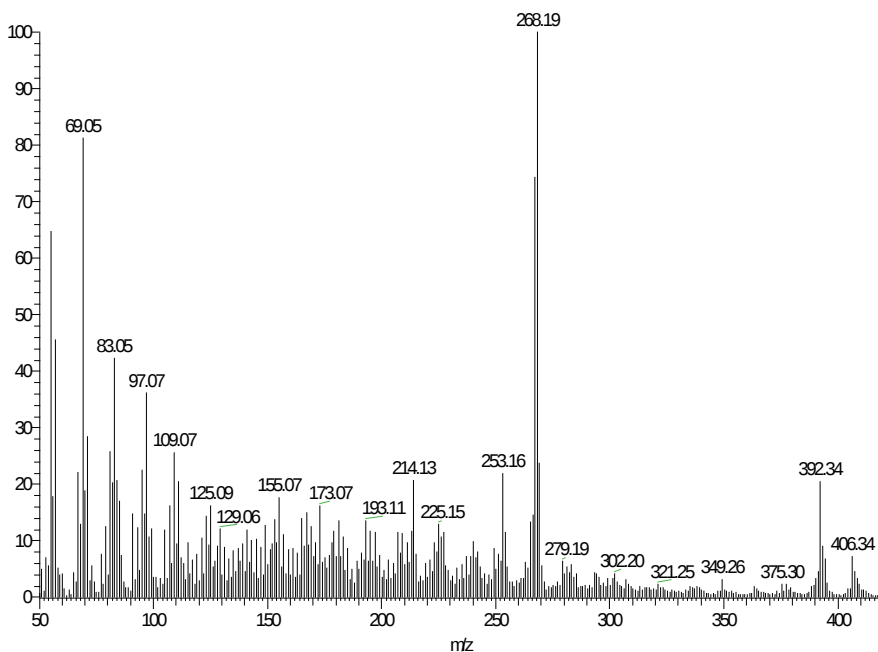
Πίνακας 70. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα *J* σε Hz)

Θέση	δ _H	δ _C
1	5,50, s	100,6
1-OCH ₃	3,48, s	58,0
3	-	153,3
4	5,79, s	103,8
4a	-	146,3
5	6,21, s	121,9
6	-	197,7
7	-	84,0
7-CH ₃	1,86, s	23,7
8	-	191,5
8a	-	68,0
1'	6,16, d (15,4)	125,5
2'	6,52, dt (15,4, 5,6)	130,9
3'-a	4,71, dd (5,6, 1,7)	63,5
3'-b	4,73, dd (5,6, 1,7)	
4'	-	170,4
5'	2,11, s	20,7
1''	-	169,2
2''	-	104,5
3''	-	165,6
3''-OH	10,80, br s	-
4''	6,18, d (2,3)	101,1
5''	-	161,1
6''	6,22, d (2,3)	111,6
7''	-	144,6
7''- CH ₃	2,60, s	24,2

Μεταβολίτης 8: (22*E*)-Εργόστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη



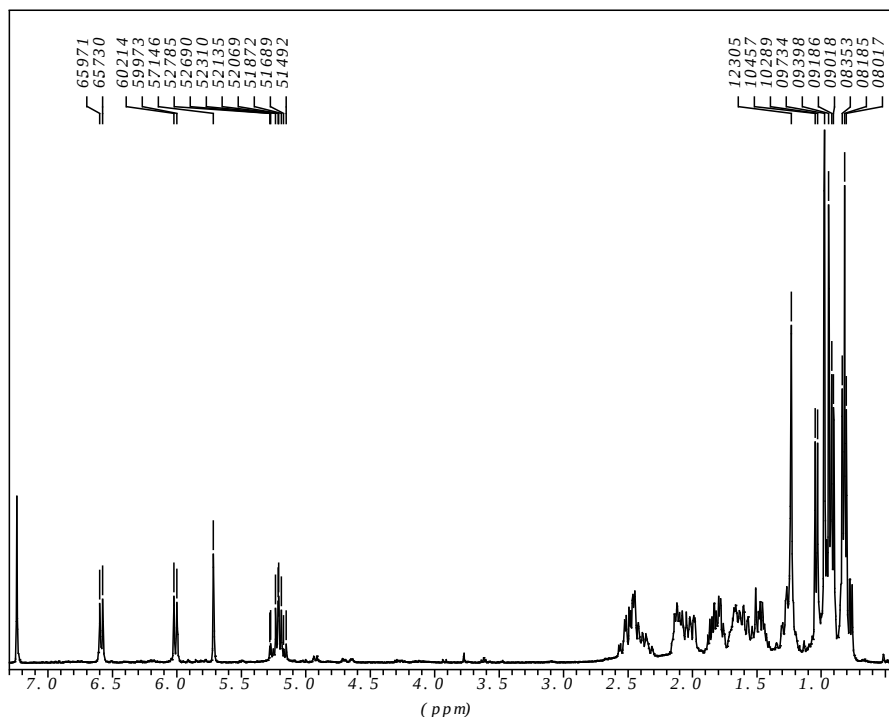
Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε ως κίτρινο ίζημα συνολικής μάζας 6,2 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 392 (Εικόνα 83), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{28}H_{40}O$.



Εικόνα 83. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **8**

Το φάσμα 1H NMR παρέπεμπε σε στεροειδές. Παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικά σήματα στην ολεφινική περιοχή όπου συντονίζονταν τα πρωτόνια H-4 σε δ 5,71, H-6 σε δ 6,00, H-7 σε δ 6,58, H-22 σε δ 5,18 και H-23 σε δ 5,24. Στην περιοχή των μεθυλίων εμφανίστηκαν ως απλές κορυφές τα πρωτόνια H_3 -18

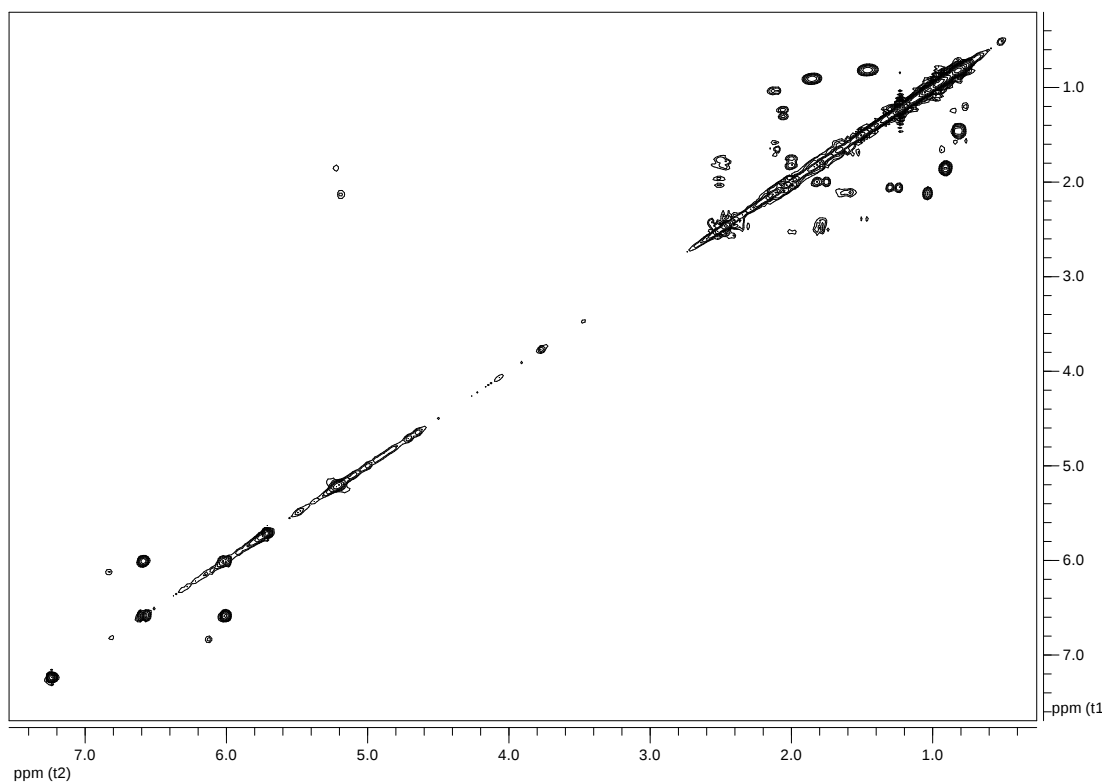
και H₃-19 στα 0,94 και 0,97 ppm αντίστοιχα, ενώ ως διπλές κορυφές τα πρωτόνια H₃-21, H₃-26, H₃-27 και H₃-28 στα 1,04, 0,81, 0,83 και 0,91 ppm αντίστοιχα (Εικόνα 84).



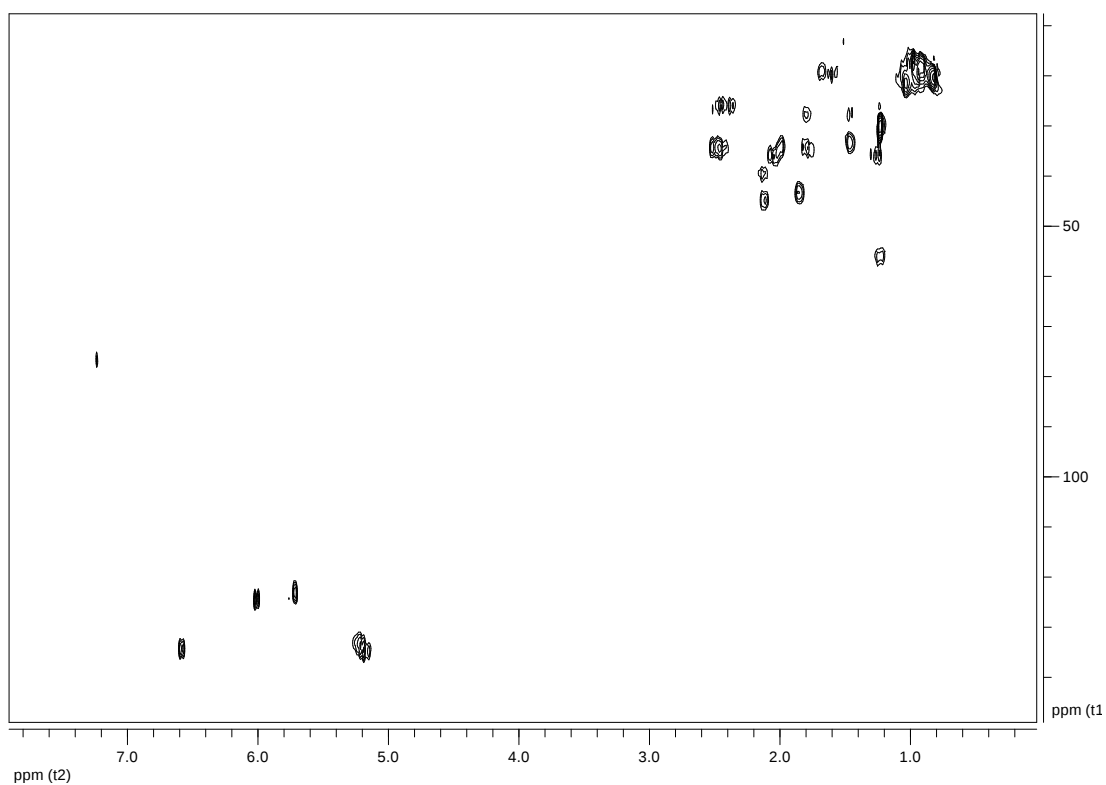
Εικόνα 84. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃) του μεταβολίτη **8**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **8** ταυτοποιήθηκε ως το στεροειδές (22*E*)-εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη.

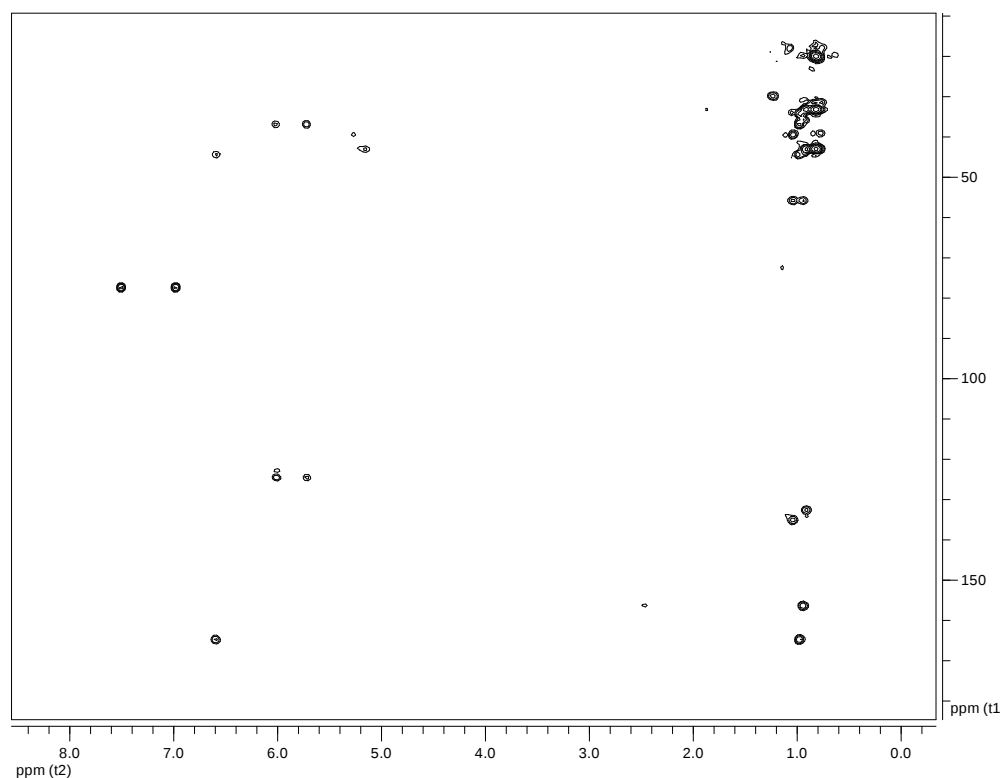
Η επαλήθευση της δομής του μεταβολίτη **8** και η απόδοση των χαρακτηριστικών φασματοσκοπικών δεδομένων (Πίνακας 71) έγινε με τη λήψη και ανάλυση των δισδιάστατων φασμάτων ¹H-¹H COSY, HSQC-DEPT και HMBC (Εικόνες 85-87).



Εικόνα 85. Φάσμα ^1H - ^1H COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **8**



Εικόνα 86. Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **8**



Εικόνα 87. Φάσμα HMBC (CDCl₃) του μεταβολίτη **8**

Η (22*E*)-εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη συναντάται ευρέως σε φαρμακευτικούς μύκητες, λειχήνες και ανώτερα φυτά όπως *Polyporus umbellatus*, *Russula cyanoxantha*, *Cordyceps sinensis*, *Vietnamese xylaria* και *Zopfiella longicaudata* (Zhao *et al* 2010). Έχει απομονωθεί επίσης από τους μύκητες *Gymnopilus spectabilis* (Lee *et al* 2008), *Annulohypoxylon squamulosum* (Cheng *et al* 2012a), *Biscogniauxia formosana* (Cheng *et al* 2012b), το σπόγγο *Dysidea herbacea* (Kobayashi *et al* 1992) και το φυτό *Piper philippinum* (Chen *et al* 2007). Είναι η πρώτη αναφορά που γίνεται για την (22*E*)-εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη στο γένος *Hypoxylon*.

Η (22*E*)-εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνη αποτελεί ένα πολύ γνωστό βιοδραστικό στεροειδές. Διαθέτει διουρητική, κυτταροτοξική, ανοσοκατασταλτική δράση και αποτελεί αναστολέα παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (Zhao *et al* 2010a). Η διουρητική δράση που διαθέτει οφείλεται στον ανταγωνισμό με το μόριο της αλδοστερόνης για σύνδεση στους υποδοχείς (Yuan *et al* 2004).

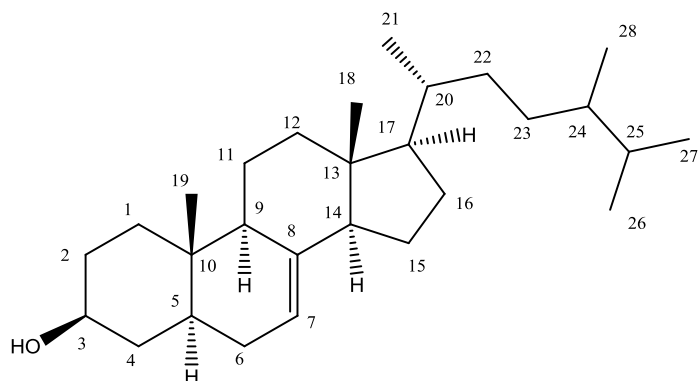
Έχει δείξει ισχυρή αντικαρκινική δράση έναντι κυτταρικών σειρών ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HepG2, Hep-2, Hela). Αξίζει να

σημειωθεί ότι η κυτταροτοξική επίδραση της (22*E*)-εργοστα-4,6,8(14),22-τετραεν-3-όνης σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα (HUVEC) ήταν μικρότερη από αυτή στα καρκινικά (Zhao *et al* 2010b). Επίσης, αποτελεί σημαντικό ανταγωνιστή της οιστραδιόλης στη σύνδεση με τους υποδοχείς οιστρογόνων στη σειρά ανθρώπινων μαστικών επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων T47D (Fangkrathok *et al* 2012).

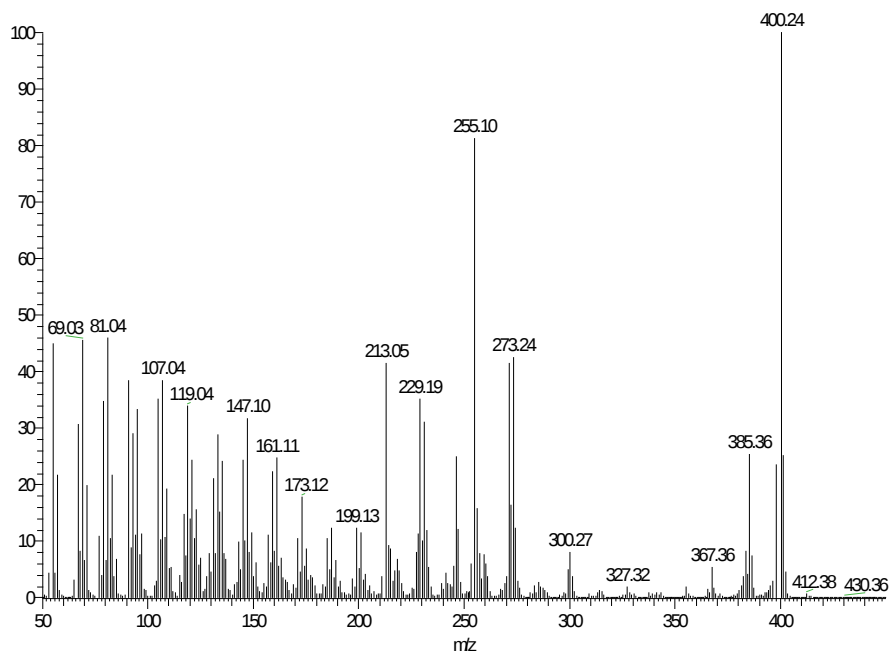
Πίνακας 71. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα *J* σε Hz)

Θέση	δ_H
4	5,71, s
6	6,00, d (9,5)
7	6,58, d (9,5)
18	0,94, s
19	0,97, s
21	1,04, d (6,7)
22	5,18, dd (15,2 ,7,6)
23	5,24, dd (15,2, 7,3)
26	0,81, d (6,7)
27	0,83, d (6,7)
28	0,91, d (6,7)

Μεταβολίτης 9: Εργοστ-7-εν-3-όλη



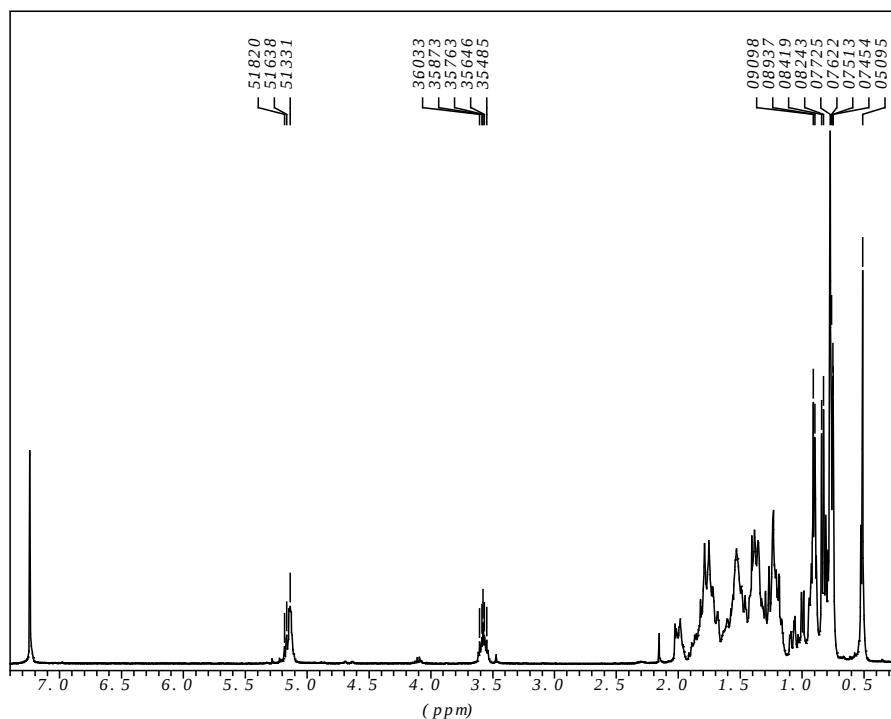
Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε ως λευκό ίζημα μάζας 2,2 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 400 (Εικόνα 88), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{28}H_{48}O$.



Εικόνα 88. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **9**

Το φάσμα 1H NMR παρέπεμπε επίσης σε στεροειδές. Χαρακτηριστικά ήταν τα σήματα του ολεφινικού πρωτονίου H-7 στα 5,15 ppm και του οξυγονωμένου μεθινίου στα 3,58 ppm που εμφανίστηκαν ως δύο πολλαπλές κορυφές. Επίσης

παρατηρήθηκαν δύο απλές κορυφές σε δ 0,51 και 0,77 που αντιστοιχούσαν στα μεθυλικά πρωτόνια H₃-18 και H₃-19, καθώς και τέσσερις διπλές κορυφές στα 0,90, 0,83, 0,76 και 0,75 ppm που αντιστοιχούσαν στα μεθυλικά πρωτόνια H₃-21, H₃-26, H₃-27 και H₃-28 (Εικόνα 89).



Εικόνα 89. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃) του μεταβολίτη **9**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **9** ταυτοποιήθηκε ως το στεροειδές εργοστ-7-εν-3-όλη. Η απόδοση των χαρακτηριστικών φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** φαίνεται στον Πίνακα 72.

Η εργοστ-7-εν-3-όλη συναντάται σε πολλά είδη εδώδιμων μυκήτων όπως *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus* (Phillips *et al* 2011). Επιπλέον έχει απομονωθεί από τους μύκητες *Ganoderma lucidum* (Akihisa *et al* 2007), *Ganoderma annulare* (Smania *et al* 2003), *Ganoderma applanatum* (Smania *et al* 1999), *Amanita subjunquillea* (Kim *et al* 2008), *Candida curvata* (Lognay *et al* 1987), *Suillus sibiricus* (Kapil *et al* 1994), από τα χλωροφύκη *Dunaliella tertiolecta* και *Dunaliella salina* (Francavilla *et al* 2010), από τις ανθοταξίες του *Carthamus tinctorius* L.

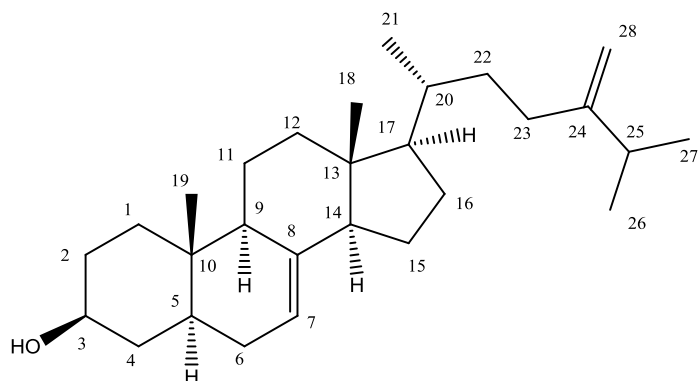
(Kasahara *et al* 1994) και τα σπέρματα του *Helianthus annuus* (Matsumoto *et al* 1984) της οικογένειας *Asteraceae* και από τα ετερότροφα πρώτιστα *Oxyrrhis marina* και *Gyrodinium dominans* (Chu *et al* 2008). Είναι η πρώτη αναφορά που γίνεται για την εργοστ-7-εν-3-όλη στο γένος *Hypoxylon*.

Η εργοστ-7-εν-3-όλη αποτελεί ισχυρό αναστολέα έκφρασης του πρώιμου αντιγόνου του ιού *Epstein-Barr* ο οποίος σχετίζεται με μορφές καρκίνου όπως το λέμφωμα Hodgkin's και Burkitt's και το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (Akihisa *et al* 2007). Έχει δείξει μέτρια ανασταλτική δράση έναντι κυτταρικής σειράς ανθρώπινου πνευμονικού αδενοκαρκινώματος-A549, κυτταρικής σειράς ανθρώπινου καρκινώματος ωοθηκών-SKOV3, κυτταρικής σειράς ανθρώπινου μελανώματος-SK-MEL-2 και κυτταρικής σειράς ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος ορθού-HCT-15 (Kim *et al* 2008). Επιπλέον, έχει δείξει αντιβακτηριακή δράση ευρέως φάσματος, με τα Gram (+) βακτήρια να είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram (-) (Smania *et al* 1999).

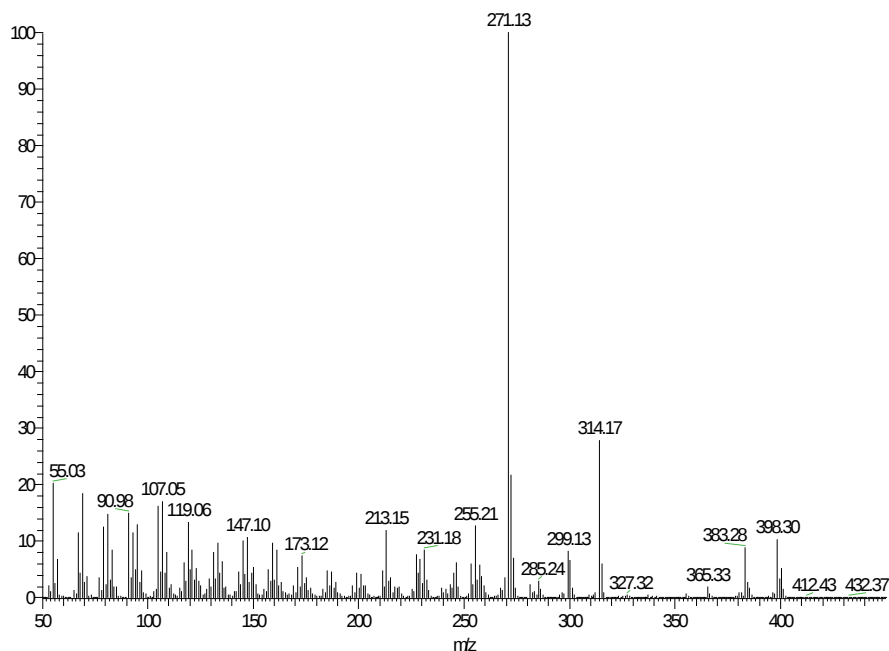
Πίνακας 72. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα J σε Hz)

Θέση	δ _H
3	3,58, m
7	5,15, m
18	0,51, s
19	0,77, s
21	0,90, d (6,7)
26	0,83, d (6,4)
27	0,76, d (7,0)
28	0,75, d (6,7)

Μεταβολίτης **10**: 5α-Εργοστ-7,24(28)-διεν-3β-όλη



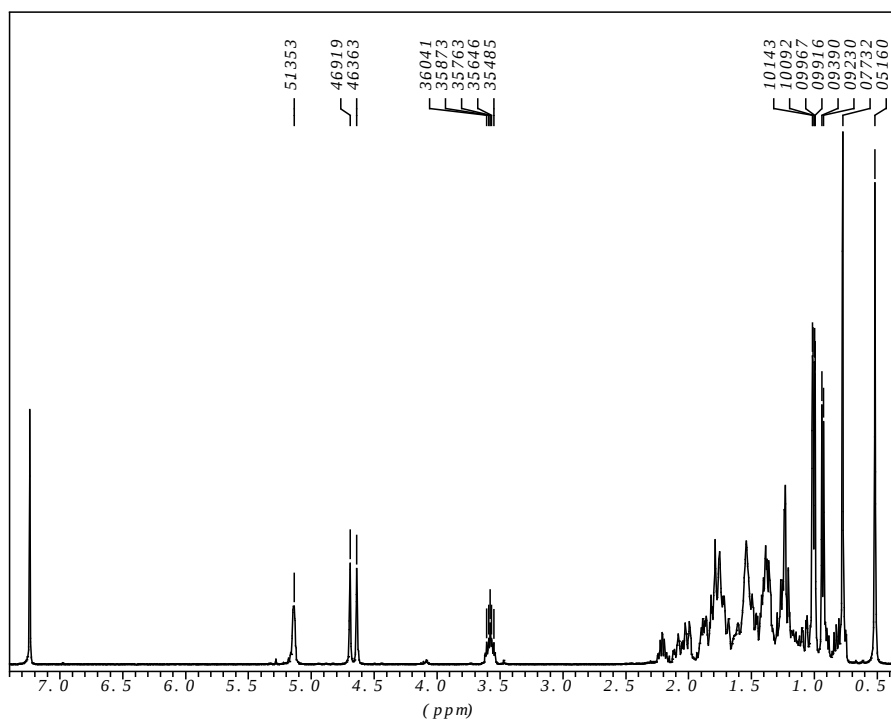
Ο μεταβολίτης **10** απομονώθηκε ως λευκό ίζημα μάζας 1,6 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 398 (Εικόνα 90), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{28}H_{46}O$.



Εικόνα 90. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **10**

Το φάσμα 1H NMR παρέπεμπε επίσης σε στεροειδές. Εμφάνισε χαρακτηριστικά σήματα στην ολεφινική περιοχή όπου συντονιζόταν το πρωτόνιο H-7 σε δ 5,14, καθώς και τα πιο θωρακισμένα πρωτόνια του εξωμεθυλενίου της

θέσης 28 σε δ 4,63 και 4,69. Το οξυγονωμένο μεθίνιο παρουσιάστηκε στα 3,58 ppm. Στην περιοχή των μεθυλίων εμφανίστηκαν ως απλές κορυφές τα πρωτόνια H₃-18 και H₃-19 στα 0,52 και 0,74 ppm αντίστοιχα, ενώ ως διπλές κορυφές τα πρωτόνια H₃-21, H₃-26 και H₃-27 στα 0,93, 1,00 και 1,01 ppm αντίστοιχα (Εικόνα 91).



Εικόνα 91. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃) του μεταβολίτη **10**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **10** ταυτοποιήθηκε ως το στεροειδές 5α-εργοστ-7,24(28)-διεν-3β-όλη. Η απόδοση των χαρακτηριστικών φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **10** φαίνεται στον Πίνακα 72.

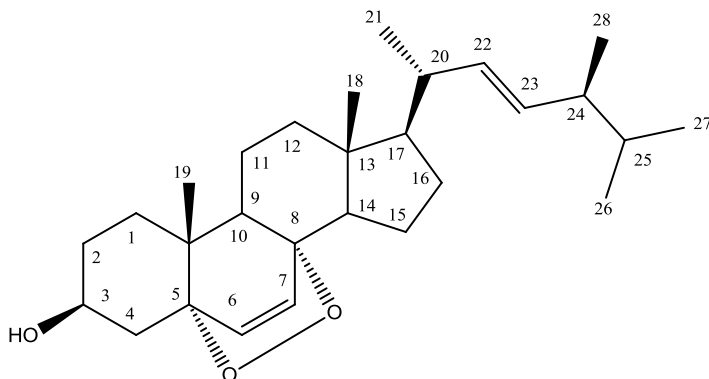
Η 5α-εργοστ-7,24(28)-διεν-3β-όλη έχει απομονωθεί από μύκητες όπως *Phellinus pini* (Hong *et al* 2012), *Penicillium digitatum* (Ariza *et al* 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Nkinin *et al* 2011), *Aspergillus flavus* (Qiao *et al* 2011), *Erysiphe graminis* (Engels & Waard 1998), *Uncinula necator* (Debieu *et al* 1995), *Eutypa lata* (Chapuis *et al* 1996) και στο διάτομο *Ditylum brightwellii* (Giner & Wikfors 2011). Είναι η πρώτη αναφορά που γίνεται για την 5α-εργοστ-7,24(28)-διεν-3β-όλη στο γένος *Hypoxylon*.

Έχει βρεθεί ότι η 5α-εργοστ-7,24(28)-διεν-3β-όλη αναστέλλει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε RAW 264.7 κύτταρα και επιπλέον καταστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών και του m-RNA των ενζύμων κυκλοοξυγενάση 2 (COX-2) και της ισομορφής iNOS της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Συνεπώς αποτελεί πιθανό αντιφλεγμονώδη παράγοντα (Hong *et al* 2012).

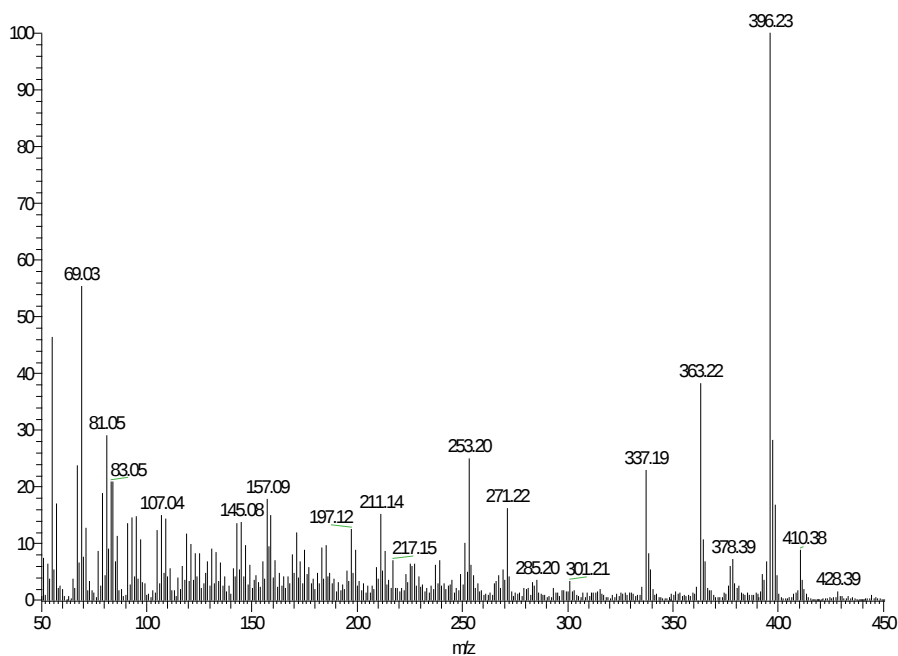
Πίνακας 73. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα J σε Hz)

Θέση	δ_H
3	3,58, m
7	5,14, m
18	0,52, s
19	0,74, s
21	0,93, d (6,4)
26	1,00, d (6,7)
27	1,01, d (6,7)
28	4,69, s/4,63, d (1,2)

Μεταβολίτης 11: (22*E*,24*S*)-5*a*,8*a*-Επιδιοξυ-24-μεθυλο-χολεστα-6,22-διεν-3*β*-όλη



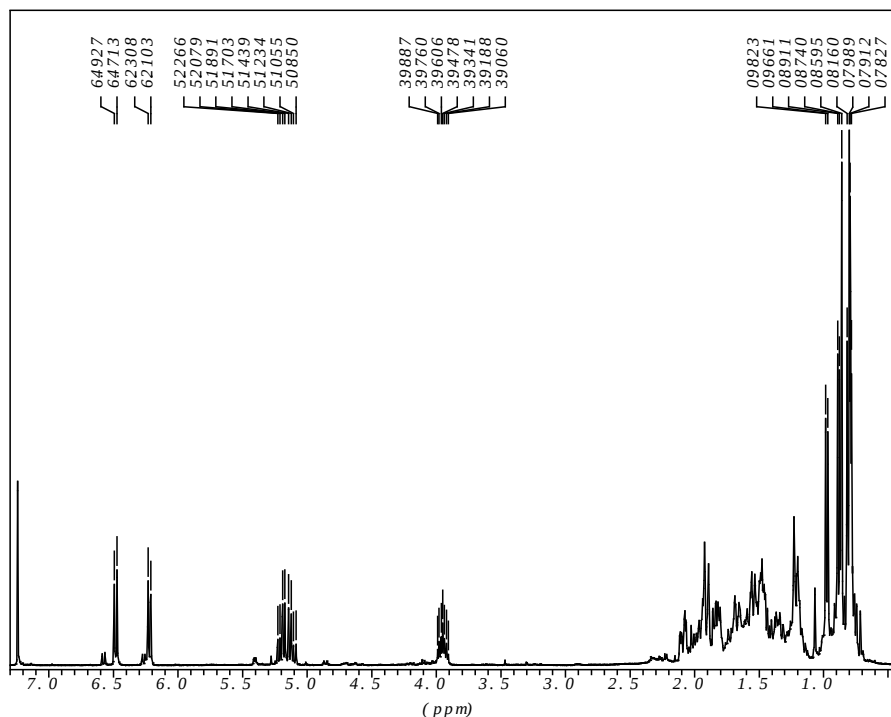
Ο μεταβολίτης **11** απομονώθηκε ως υποκίτρινο ίζημα συνολικής μάζας 10,4 mg. Στο φάσμα μάζας (EI-MS) εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 428 (Εικόνα 92), που σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR οδήγησε στο μοριακό τύπο $C_{28}H_{44}O_3$.



Εικόνα 92. Φάσμα μάζας (EI-MS) του μεταβολίτη **11**

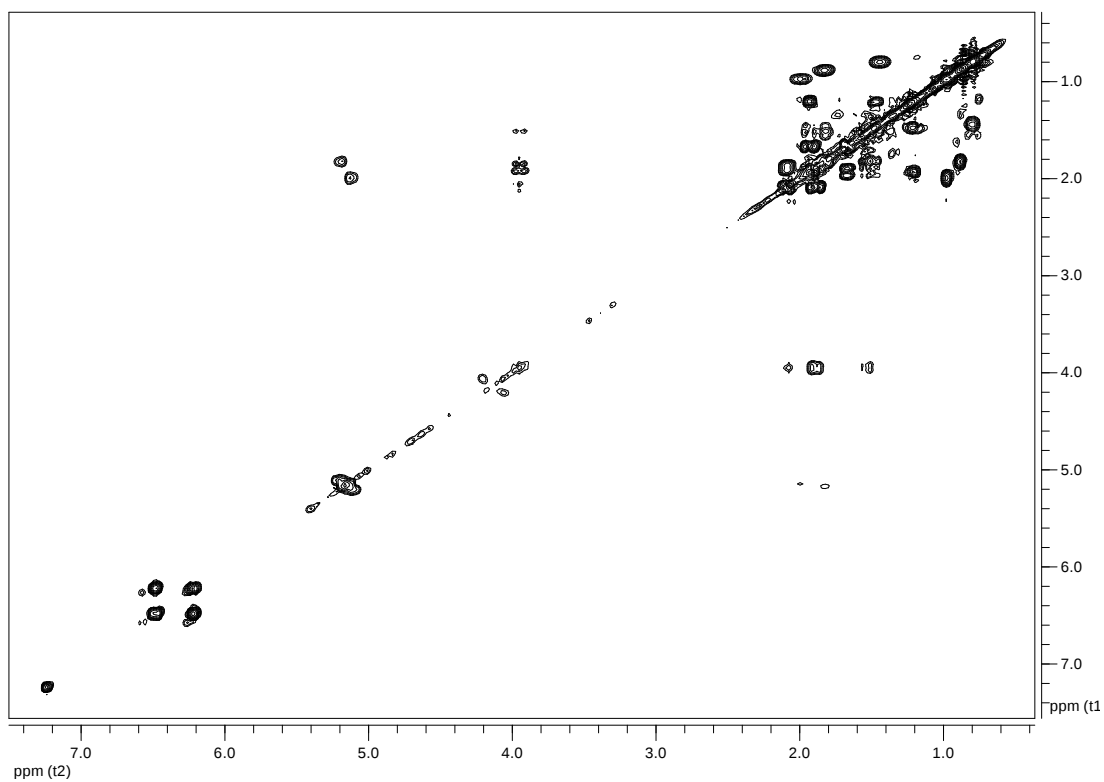
Το φάσμα 1H NMR παρέπεμπε επίσης σε στεροειδές. Στην ολεφινική περιοχή τα πρωτόνια H-22 και H-23 έδωσαν δύο διπλές διπλών κορυφές στα 5,11 και 5,20 ppm αντίστοιχα. Εξαιτίας του υπεροξειδικής γέφυρας, τα ολεφινικά πρωτόνια H-6

και H-7 εμφανίστηκαν πιο αποθωρακισμένα σε δ 6,22 και 6,48 αντίστοιχα, ενώ το οξυγονωμένο μεθίνιο συντονιζόταν στα 3,94 ppm. Τέλος, παρατηρήθηκαν δύο απλές κορυφές σε δ 0,80 και 0,86 που αντιστοιχούσαν στα μεθυλικά πρωτόνια H₃-18 και H₃-19, καθώς και τέσσερις διπλές κορυφές στα 0,97, 0,79, 0,81 και 0,88 ppm που αντιστοιχούσαν στα μεθυλικά πρωτόνια H₃-21, H₃-26, H₃-27 και H₃-28 (Εικόνα 93).

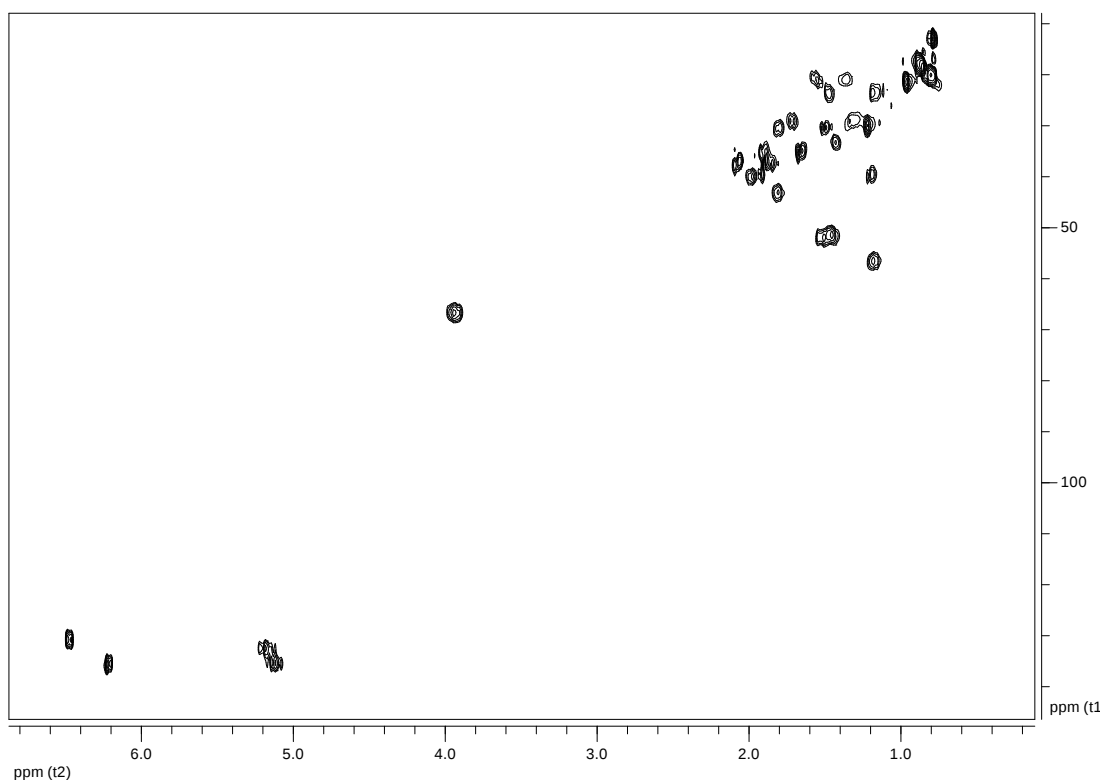


Εικόνα 93. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃) του μεταβολίτη **11**

Κατόπιν βιβλιογραφικής έρευνας που ακολούθησε ο μεταβολίτης **11** ταυτοποιήθηκε ως το στεροειδές (22*E*,24*S*)-5*α*,8*α*-επιδιοξυ-24-μεθυλο-χολεστα-6,22-διεν-3*β*-όλη. Η επαλήθευση της δομής του μεταβολίτη **11** και η απόδοση των χαρακτηριστικών φασματοσκοπικών δεδομένων (Πίνακας 74) έγινε με τη λήψη και ανάλυση των διοδιάστατων φασμάτων ¹H-¹H COSY και HSQC-DEPT (Εικόνες 94 & 95).



Εικόνα 94. Φάσμα ^1H - ^1H COSY (CDCl_3) του μεταβολίτη **11**



Εικόνα 95. Φάσμα HSQC-DEPT (CDCl_3) του μεταβολίτη **11**

Η (22*E*,24*S*)-5*a*,8*a*-επιδιοξυ-24-μεθυλο-χολεστα-6,22-διεν-3*β*-όλη συναντάται ευρέως σε μύκητες όπως *Hericium erinaceus* (Ma *et al* 2012), *Pleurotus eryngii* (Yokoyama *et al* 2012), *Ganoderma lucidum* (Zheng *et al* 2009), *Phomopsis archeri* (Hemtasin *et al* 2011), *Taiwanofungus camphoratus* (Shi *et al* 2011), *Sarcodon aspratus* (Takei *et al* 2005), *Armillariella mellea* (Kim *et al* 1999), *Paecilomyces tenuipes* (Nam *et al* 2001) και *Polyporus umbellatus* (Zhao *et al* 2010).

Έχει απομονωθεί επίσης από τα υπέργεια τμήματα του φυτού *Ajuga remota* της οικογένειας *Labiatae* (Cantrell *et al* 1999), *Andrographis paniculata* της οικογένειας *Acanthaceae* (Chao *et al* 2010) και *Vernonia anthelmintica* της οικογένειας *Asteraceae* (Hua *et al* 2012), από τις ανθοταξίες του φυτού *Erigeron annuus* L. της οικογένειας *Asteraceae* (Kim *et al* 2005), καθώς και από το ασκίδιο *Trididemnum inarmatum* και το κοράλι *Eunicella cavolini* (Ioannou *et al* 2009). Είναι η πρώτη αναφορά που γίνεται για την (22*E*,24*S*)-5*a*,8*a*-επιδιοξυ-24-μεθυλοχολεστα-6,22-διεν-3*β*-όλη στο γένος *Hypoxylon*.

Η (22*E*,24*S*)-5*a*,8*a*-επιδιοξυ-24-μεθυλο-χολεστα-6,22-διεν-3*β*-όλη διαθέτει ανοσοκατασταλτική, αντιϊκή, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση (Nam *et al* 2001). Σημαντική είναι επίσης η αντιβακτηριακή της δράση έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (Wen *et al* 2012) και *Mycobacterium tuberculosis* (Cantrell *et al* 1999). Επιπλέον, αποτελεί ισχυρό αναστολέα λιπιδικής υπεροξειδωσης και η αντιοξειδωτική της δράση είναι υψηλότερη από αυτή γνωστών αντιοξειδωτικών όπως η α-τοκοφερόλη και η θειουρία (Kim *et al* 1999),

Έχει δείξει ανασταλτική δράση έναντι κυτταρικής σειράς ανθρώπινου μαστικού αδενοκαρκινώματος (MCF-7). Η αναστολή της ανάπτυξης γίνεται μέσω κυτταρικής απόπτωσης, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται όσο τα καρκινικά (Zheng *et al* 2009). Επιπλέον, η (22*E*,24*S*)-5*a*,8*a*-επιδιοξυ-24-μεθυλοχολεστα-6,22-διεν-3*β*-όλη αναστέλλει την ανάπτυξη ανθρώπινων προμυελωτικών λευχαιμικών κυττάρων-HL60 (Takei *et al* 2005), ανθρώπινων γαστρικών καρκινικών κυττάρων (SNU-1), ανθρώπινων ηπατικών καρκινικών κυττάρων (SNU-354), ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου και ορθού (SNU-C4), κυττάρων σαρκώματος μυός-180 (Nam *et al* 2001), κυττάρων πνευμονικού

αδενοκαρκινώματος (A549), κυττάρων μεγαλοκυτταρικού πνευμονικού καρκινώματος-H460 (Wu *et al* 2011) και κυττάρων ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος-HepG2 (Zhao *et al* 2010b).

Πίνακας 74. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **11** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα J σε Hz)

Θέση	δ_H
3	3,94, m
6	6,22, d (8,5)
7	6,48, d (8,5)
18	0,80, s
19	0,86, s
21	0,97, d (6,8)
22	5,11, dd (15,4, 8,2)
23	5,20, dd (15,4, 7,2)
26	0,79, d (6,7)
27	0,81, d (6,8)
28	0,88, d (6,8)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση του οργανικού εκχυλίσματος ώριμων και νεαρών στρώματων του ασκομύκητα *Hypoxylon fragiforme* που συλλέχθηκαν από δασύλλια της περιοχής Braunschweig στη Γερμανία.

Από το οργανικό του εκχύλισμα απομονώθηκαν με χρωματογραφικούς διαχωρισμούς 16 δευτερογενείς μεταβολίτες, 11 εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS.

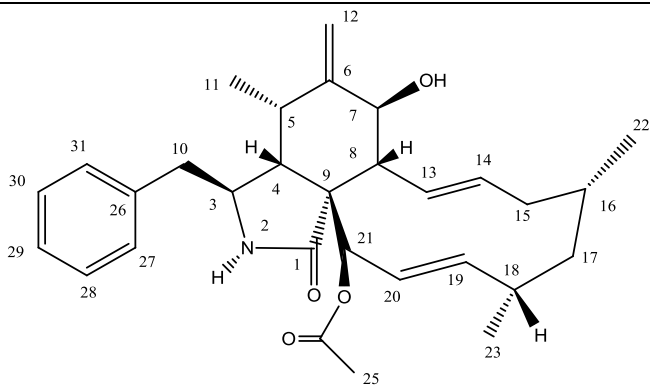
Συνολικά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν δύο κυτοχαλασίνες (μεταβολίτες **1**, **2**), πέντε παράγωγα μιτορουμπρίνης (μεταβολίτες **3**, **4**, **5**, **6**, **7**) και τέσσερα στεροειδή (μεταβολίτες **8**, **9**, **10**, **11**). Οι μεταβολίτες **6** και **7** αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

Οι μεταβολίτες **2**, **3**, **5**, **8** και **11** ήταν παρόντες τόσο στα ώριμα, όσο και στα νεαρά στρώματα, οι μεταβολίτες **1**, **6**, **7**, **9** και **10** απομονώθηκαν από τα ώριμα στρώματα, ενώ ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε μόνο από τα νεαρά στρώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταβολίτες **3** και **5** ήταν παρόντες στα νεαρά στρώματα σε αναλογικά μεγαλύτερη ποσότητα από ότι στα ώριμα, ενώ η ποσότητα των μεταβολιτών **2**, **8** και **11** στα νεαρά στρώματα ήταν αντίστοιχη με αυτή στα ώριμα στρώματα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι απομονωθέντες μεταβολίτες συγκεντρωτικά.

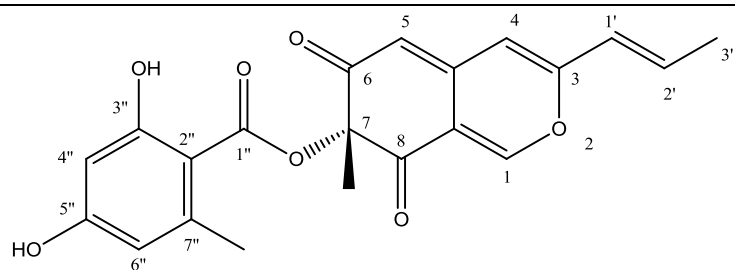
Μεταβολίτης	Δομή
Κυτοχαλασίνες	
1 Κυτοχαλασίνη Η	

2
18-Δεϋδροξυ-
κυτοχალασίνη Η

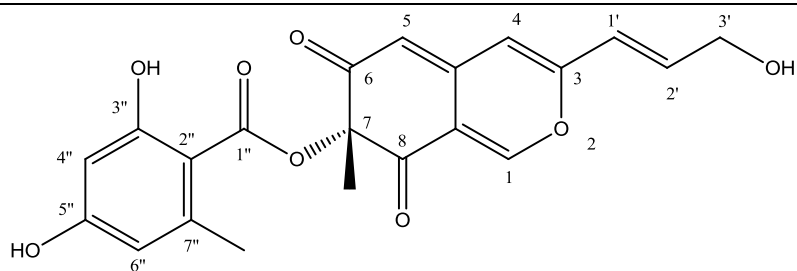


Παράγωγα μιτορουμπρίνης

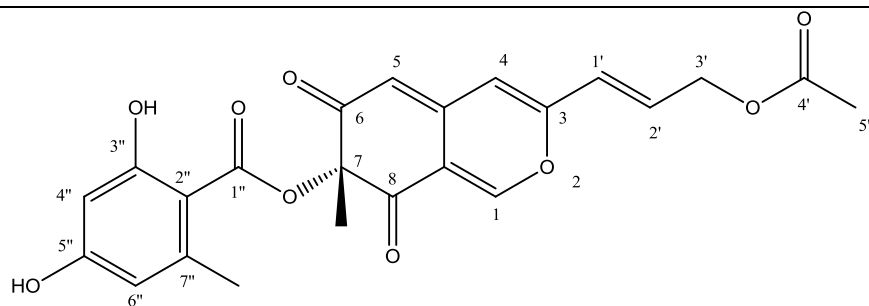
3
Μιτορουμπρίνη



4
Μιτορουμπρινόλη

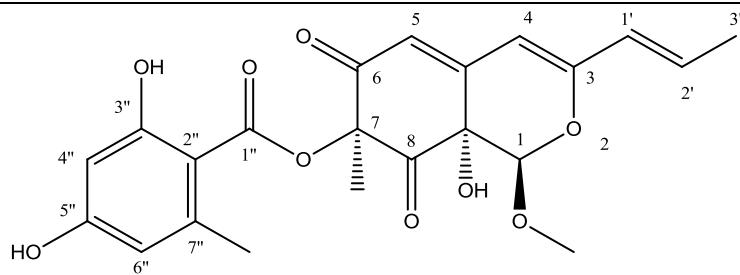


5
3'-Ακετυλο-
μιτορουμπρινόλη



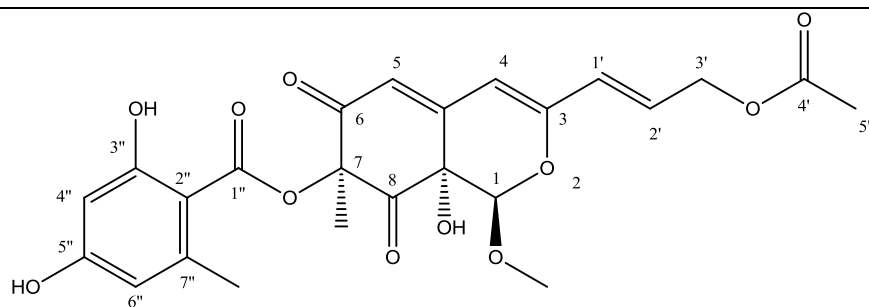
6

Νέο φυσικό
προϊόν



7

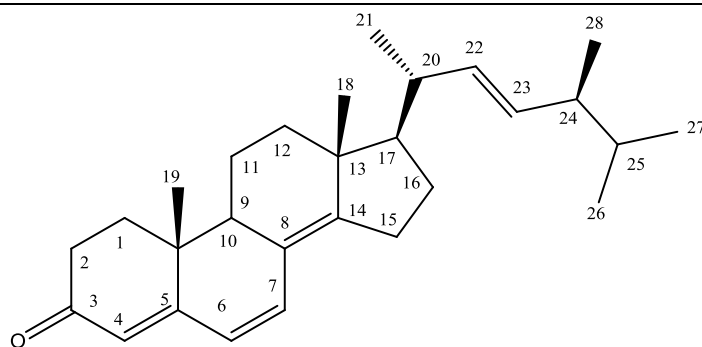
Νέο φυσικό
προϊόν



Στεροειδή

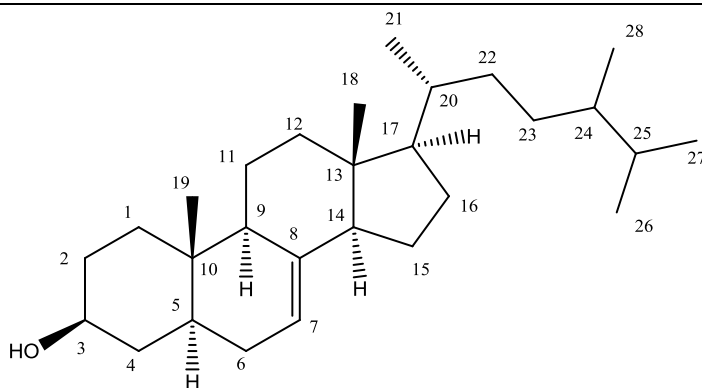
8

(22*E*)-Εργοστα-
4,6,8(14),22-
τετραεν-3-όνη



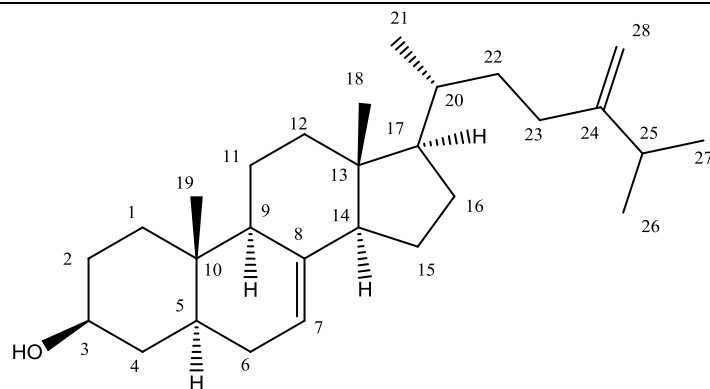
9

Εργοστ-7-εν-3-όλη



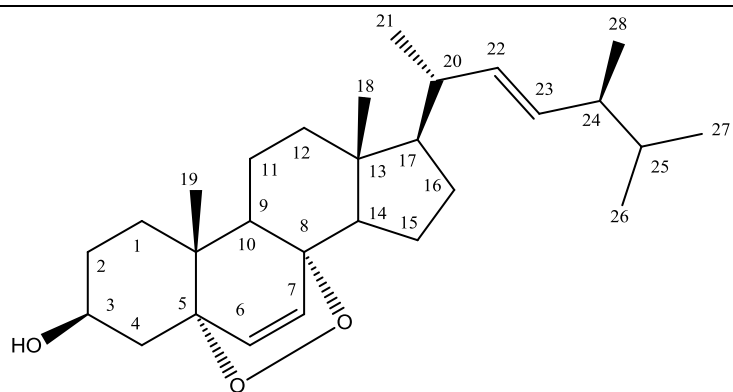
10

5 α -Εργοστ-
7,24(28)-διεν-3 β -
όλη



11

(22*E*,24*S*)-5 α ,8 α -
Επιδιοξυ-24-
μεθυλο-χολεστα-
6,22-διεν-3 β -όλη



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akihisa T., Nakamura Y., Tagata M., Tokuda H., Yasukawa K., Uchiyama E., Suzuki T. and Kimura Y., Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*, *Chemistry and Biodiversity*, **2007**, 4, 224-231.
2. Albaugh D., Albert G., Bradford P., Cotter V., Froyd J., Gaughran J. and Kirsch D., Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. III. Biological properties of 15G256y, *Journal of Antibiotics*, **1998**, 51(3), 317-322.
3. Anderson R.L. and Anderson G.W., Hypoxylon Canker of Aspen, Forest Insect & Disease, Leaflet 6, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, **1997**.
4. Anke H., Stadler M., Mayer A. and Sterner O., Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes, *Canadian Journal of Botany*, **1995**, 73, 932-939.
5. Ariza M. R., Larsen T. O., Petersen B. O., Duus J. Ø. and Barrero A. F., *Penicillium digitatum* metabolites on synthetic media and citrus fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 6361-6365.
6. Arnone A., Assante G., Nasini G. and Vajna de Pava O., Chrysanthones B and C, secondary metabolites produced by the fungus *Ascochyta chrysanthemi*, *Phytochemistry*, **1990**, 29, 2499-2502.
7. Bills G. F., Peláez F., Polishook J. D., Diez-Matas M. T., Harris G. H., Clapp W. H., Dufresne C., Byrne K. M., Nallin-Omstead M., Jenkins R. G., Mojena M., Huang L. and Bergstrom J. D., Distribution of zaragozic acids (squalestatins) among filamentous Ascomycetes, *Mycological Research*, **1994**, 98, 733-739.
8. Bills G. F., González-Menéndez V., Martín J., Platas G., Fournier J., Peršoh D. and Stadler, M., *Hypoxylon pulicicidum* sp. nov. (Ascomycota, Xylariales), a pantropical insecticide-producing endophyte, *Plos One*, **2012**, 7(10), e46687, 1-19.
9. Bodo B., Tih R. G., Davoust D. and Jacquemin H., Hypoxylone, a naphthyl-naphthoquinone pigment from the fungus *Hypoxylon sclerophaeum*, *Phytochemistry*, **1983**, 22, 2579-2581.

10. Borgschulte K., Rebuffat S., Trowitzsch-Kienast W., Schomburg D., Pinon J. and Bodo B., Isolation and structure elucidation of hymatoxins B-E and other phytotoxins from *Hypoxylon mammatum* fungal pathogen of leuce poplars, *Tetrahedron*, **1991**, 47(39), 8351-8360.
11. Budavari S., O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E. and Kinneary J. F., The Merck Index, Twelfth Edition, Merck Research Laboratories, United States of America, **1996**.
12. Cantrell C. L., Rajab M. S., Franzblau S. G., Fronczek F. R. and Fischer N. H., Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*, *Planta Medica*, **1999**, 65(8), 732-734.
13. Chao W. W., Kuo Y. H. and Lin B. F., Anti-inflammatory activity of new compounds from *Andrographis paniculata* by NF-KB transactivation inhibition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 2505–2512.
14. Chapuis L., Corio-Costet M. F. and Malosse C., Sterol composition of the woody plant pathogenic fungus *Eutypa lata*, *Phytochemistry*, 42(6), **1996**, 1599-1601.
15. Chen Y.-C., Liao C.-H. and Chen I.-S., Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*, *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2101–2111.
16. Cheng M.-J., Wu M.-D., Chen I.-S., Hsieh S.-Y. and Yuan G.-F., Chemical constituents from the endophytic fungus *Annulohypoxylon squamulosum*, *Chemistry of Natural Compounds*, **2012a**, 48(2).
17. Cheng M.-J., Wu M.-D., Yanai H., Su Y.-S., Chen I.-S., Yuan G.-F., Hsieh S.-Y. and Chen J.-J., Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity, *Phytochemistry Letters*, **2012b**, 5, 467–472.
18. Chu F. L. E., Lund E. D., Littreal P. R., Ruck K. E., Harvey E., Le Coz J. R., Marty Y., Moal J. and Soudant P., Sterol production and phytosterol bioconversion in two species of heterotrophic protists, *Oxyrrhis marina* and *Gyrodinium dominans*, *Marine Biology*, **2008**, 156, 155–169.
19. Conway K. E. and Andrews M. W., Hypoxylon Canker of Oaks. Diseases of trees in the Great Plains, 2(31), 68-69, **1986**.

20. Daferner M., Mensch S., Anke T. and Sterner O., Hypoxysordarin, a new sordarin derivative from *Hypoxylon croceum*, *Zeitschrift für Naturforschung*, **1999**, 54c, 474-480.
21. Debbab A., Aly A. H., Edrada-Ebel R., Wray V., Müller W. E. G., Totzke F., Zirrgiebel U., Schächtele C., Kubbutat M. H. G., Lin W. H., Mosaddak M., Hakiki A., Proksch P. and Ebel R., Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphyllium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*, *Journal of Natural Products*, **2009**, 72, 626-631.
22. Debieu D., Corio-Costet M. F., Steva H., Malosse C and Leroyx P., Sterol composition of the vine powdery mildew fungus, *Uncinula necator*. Comparison of triadimenol-sensitive and resistant strains, *Phytochemistry*, **1995**, 39(2), 293-300.
23. Debieu D., Bach J., Lasserone A., Malosse C and Leroyx P., Effects of sterol biosynthesis inhibitor fungicides in the phytopathogenic fungus, *Nectria haematococca*: Ergosterol depletion versus precursor or abnormal sterol accumulation as the mechanism of fungitoxicity, *Pesticide Science*, **1998**, 54, 157-167.
24. Dombrowski A. W., Bills G. F., Sabnis G., Koupal L. R., Meyer R., Ondeyka J.G., Giacobbe R. A., Monaghan R. L. and Lingham R. B., L-696,474, A novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. I. The producing organism and its fermentation, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45(5), 671-678.
25. Edwards R. L., Anderson J. R. and Whalley A. J. S., Chestersiene, 4-(4-methoxyphenoxy)buta-1,2-diene: an allenic ether from the fungus *Hypoxylon chestersii*, *Phytochemistry*, **1982**, 21(7), 1721-1723.
26. Edwards L. E., Maitland J. D. and Whalley J. S., Metabolites of the higher fungi. Part 24. Cytochalasin N, O, P, Q and R. New cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1989**, 1, 57-65.
27. Edwards R. L., Fawcett V., Maitland D. J., Nettleton R., Shields L. and Whalley J. S., Hypoxyxylone. A novel green pigment from the fungus

- Hypoxylon fragiforme* (Pers.: Fries) Kickx, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1991**, 15, 1009-1010.
28. Engels A. J. G. and De Waard M. A., Sterol composition of isolates of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* differing in sensitivity to fenpropimorph, *Pesticide Science*, **1998**, 52, 258-262.
 29. Fangkrathok N., Sripanidkulchai B., Umehara K. and Noguchi H., Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells, *Natural Product Research*, **2012**, iFirst article, 1-9.
 30. Francavilla F., Trotta P. and Luque R., Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application, *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 4144-4150.
 31. Fu J., Zhou Y., Li H. F., Ye Y. H. and Guo J. H., Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*, *African Journal of Microbiology Research*, **2011**, 5(10), 1231-1236.
 32. Fukai M., Tsukada M., Miki K., Suzuki T., Sugita T., Kinoshita K., Takahashi K., Shiro M. and Koyama K., Hypoxylonols C-F, benzo-[j]-fluoranthenes from *Hypoxylon truncatum*, *Journal of Natural Products*, **2012**, 75, 22-25.
 33. Ghaskadbi S. and Mulherkar L., Effects of cytochalasin H on chick embryo explants cultured in vitro, *Toxicology*, **1984**, 33(3-4), 323-330.
 34. Giner J. L. and Wikfors G. H., "Dinoflagellate Sterols" in marine diatoms, *Phytochemistry*, **2011**, 72, 1896-1901.
 35. Gu W., Ge H. M., Song Y. C., Ding H., Zhu H. L., Zhao X. A., and Tan R. X., Cytotoxic benzo[j]fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an endophyte of *Artemisia annua*, *Journal of Natural Products*, **2007**, 70, 114-117.
 36. Gu W., Bioactive metabolites from *Alternaria brassiciola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*, *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2009**, 25, 1677-1683.
 37. Hellwig V., Ju Y.M., Rogers J.D., Fournier J. and Stadler M., Hypomiltin, a novel azaphilone from *Hypoxylon hypomiltum*, and chemotypes in

- Hypoxylon* sect. *Hypoxylon* as inferred from analytical HPLC profiling, *Mycological Progress*, **2005**, 4(1), 39-54.
38. Hemtasin C., Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Hahnvajanawong C., Soyotong K., Prabpai S. and Kongsaree P., Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*, *Journal of Natural Products*, **2011**, 74(4), 609–613.
 39. Hong Y. J., Jang A. R., Jang H. J. and Yang K. S., Inhibition of nitric oxide production, iNOS and COX-2 expression of ergosterol derivatives from *Phellinus pini*, *Natural Product Sciences*, **2012**, 18, 147-152.
 40. Hsieh H.M., Ju Y.M. and Rogers J.D., Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera, *Mycologia*, **2005**, 97(4), 844-865.
 41. Hua L., Li L., Wang F., Lu D. F., Gao K., Hyun J. W. and Kim H. W., Biologically active steroids from the aerial parts of *Vernonia anthelmintica* Will, *Fitoterapia*, **2012**, 83, 1036–1041.
 42. Ioannou E., Abdel-Razik A. F., Zervou M., Christofidis D., Alexi X., Vagias C., Alexis M. N. and Roussis V., 5,8-Epidioxysterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity, *Steroids*, **2009**, 7(4), 73–80.
 43. Jossang A., Mbeminack B., Pinon J. and Bodo B., Hymatoxins K and L, novel phytotoxins from *Hypoxylon mammatum*, fungal pathogen of aspen, *Natural Product Letters*, **1995**, 6, 37-42.
 44. Jůzlová P., Martíníková L. and Křen V., Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review, *Journal of Industrial Microbiology*, **1996**, 16, 163-170.
 45. Kapil A., Shah R. and Sharma S., Immunopotentiating and anticomplementary activity of fungisterol from mushroom *Suillus sibiricus*, *Indian Drugs-Bombay*, **1994**, 31, 525-525.
 46. Kasahara Y., Kumaki K., Katagiri S., Yasukawa K., Yamanouchi S., Takido M., Akihisa T. and Tamura T., Carthami flos extract and its component, stigmasterol, inhibit tumour promotion in mouse skin two-stage carcinogenesis, *Phytotherapy Research*, **1994**, 8, 327-331.
 47. Kim D. H., Jung S. J., Chung I. S., Lee Y. H., Kim D. K., Kim S. H., Kwon B. M., Jeong T. S., Park M. H., Seoung N. S. and Baek N. I., Ergosterol

- peroxide from flowers of *Erigeron annuus* L. as an anti-atherosclerosis agent, *Archive of Pharmacal Research*, **2005**, 28(5), 541-545.
48. Kim K. H., Choi S. U., Park K. M., Seok S. J. and Lee K. R., Cytotoxic constituents of *Amanita subjunquillea*, *Archive of Pharmacal Research*, **2008**, 31(5), 579-586.
 49. Kim S. W., Park S. S., Min T. J. and Yu K. H., Antioxidant activity of ergosterol peroxide (5,8-epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol) in *Armillariella mellea*, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **1999**, 20(7), 819-823.
 50. Kimura Y., Mizuno T., Nakajima H. and Hamasaki T., Altechromones A and B, new plant growth regulators produced by the *Alternaria* sp., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1992**, 56(10), 1664-1665.
 51. Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W. & Stalpers J. A., Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, UK: CAB International, **2008**.
 52. Kobayashi M, Krishna M.M., Ishida K. and Anjaneyulu V., Marine sterols. XXII. Occurrence of 3-oxo-4,6,8(14)-triunsaturated steroids in the sponge *Dysidea herbacea*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1992**, 40(1), 72-74.
 53. Krohn K., Dai J., Flörke U., Aust H. J, Dräger S., and Schulz B., Botryane metabolites from the fungus *Geniculosporium* sp. isolated from the marine red alga *Polysiphonia*, *Journal of Natural Products*, **2005**, 68(3), 400-405.
 54. Læssøe T., Srikitikulchai P., Fournier J., Köpcke B. and Stadler M., Lepraric acid derivatives as chemotaxonomic markers in *Hypoxylon aeruginosum*, *Chlorostroma subcubisporum* and *C. cyaninum*, sp. nov., *Fungal Biology*, **2010**, 114, 481-489.
 55. Lee I.-K., Cho S.-M., Seok S.-J. and Yun B.-S., Chemical constituents of *Gymnopilus spectabilis* and their antioxidant activity, *Mycobiology*, **2008**, 36(1), 55-59.
 56. Lešová K., Šturdíková M. and Rosenberg M., Factors affecting the production of (-)-mitorubrinic acid by *Penicillium funiculosum*, *Journal of Basic Microbiology*, **2000**, 40, 369-375.

57. Li Y., Lu C., Huang Y. and Shen Y., Cytochalasin H₂, a new cytochalasin, isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. A23, *Records of Natural Products*, **2012**, 6(2), 121-126.
58. Lin J., Chen X., Cai X., Yu X., Liu X., Cao Y. and Che Y., Isolation and characterization of aphidocolin and chlamydosporol derivatives from *Tolypocladium inflatum*, *Journal of Natural Products*, **2011**, 74, 1798-1804.
59. Lingham R. B., Hsu A., Silverman K. C., Bills G. F., Dombrowski A. W., Goldman M. E., Darke P. L., Huang L., Koch G., Ondeyka J.G. and Goetz M. A., L-696,474, A novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. III. Biological activity, *The Journal of Antibiotics*, **1992**, 45(5), 686-691.
60. Liu J., Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity, *Drug Discoveries & Therapeutics*, **2007**, 1, 94-103.
61. Lognay G., Marlier M., Crahay F., Mampuy J. P., Severin M. and Thonart P., Sterol composition of *Candida curvata* yeast, *Biotechnology Letters*, **1987**, 9(7), 467-470.
62. Ma B. J., Wen C. N., Wu T. T., Shen J. W., Ruan Y., Zhou H., Yu H. Y. and Zhao X., Study on the anti-bacterial activity of ergosterol peroxide, *Food Research and Development/Shipin Yanjiu Yu Kaifa*, **2012**, 33(7), 42-44.
63. Mapari S. A. S., Nielsen K. F., Larsen T. O., Frisvad J. C., Meyer A. S. and Thrane U., Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants, *Current Opinion in Biotechnology*, **2005**, 16, 231-238.
64. Matsumoto T., Nakagawa M. and Itoh T., 24 α -Methyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol from seed oil of *Helianthus annuus*, *Phytochemistry*, **1984**, 23(4), 921-923.
65. Miller J., A monograph of the world species of *Hypoxylon*, University of Georgia Press, Athens, 1-8, 14, 19, 24, 28, 39, 46-48, 53, 91 & 97, **1961**.
66. Mühlbauer A., Triebel D., Persoh D., Wollweber H., Seip S. and Stadler M., Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species, *Mycological progress*, **2002**, 1(3), 235-248.
67. Müller E. and Loeffler W., Mycology: An Outline for Science and Medical Students, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1-7 & 108-114, **1976**.

68. Nam K. S., Jo Y. S. and Kim Y. H., Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*, *Life Sciences*, **2001**, 69, 229–237.
69. Natarajan P., May J. A., Sanderson H. M., Zabe M., Spangenberg P. and Heptinstall S., Effects of cytochalasin H, a potent inhibitor of cytoskeletal reorganisation, on platelet function, *Platelets*, **2000**, 11, 467-476.
70. Natsume M., Takahashi Y. and Marumo S., (-)-Mitorubrinic acid, a morphogenic substance inducing chlamydospore-like cells, and its related new metabolite, (+)-mitorubrinic acid B, isolated from *Penicillium funiculosum*, *Agricultural and Biological Chemistry*, **1985**, 49(8), 2517-2519.
71. Nkinin S. W., Stringer J. R., Keely S. P., Setchell K. D. R., Giner J. L. and Kaneshiro E. S., *Pneumocystis carinii* sterol 14a-demethylase activity in *Saccharomyces cerevisiae* erg11 knockout mutant: Sterol biochemistry, *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **2011**, 58(4), 383–392.
72. Osmanova N., Schultze W. and Ayoub N., Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities, *Phytochemistry Reviews*, **2010**, 9, 315-342.
73. Ostry M.E. and Anderson N.A., Genetics and ecology of the *Entoleuca mammata* - *Populus* pathosystem: Implications for aspen improvement and management, *Forest Ecology and Management*, **2009**, 257, 390-400.
74. Qiao M. F., Ji N. Y., Miao F. P. and Yin X. L., Steroids and an oxylipin from an algicolous isolate of *Aspergillus flavus*, *Magnetic Resonance Chemistry*, **2011**, 49, 366-369.
75. Quang D. N., Hashimoto T., Tanaka M., Stadler M. and Asakawa Y., Cyclic azaphilones daldinins E and F from the ascomycete fungus *Hypoxylon fuscum* (Xylariaceae), *Phytochemistry*, **2004a**, 65, 469-473.
76. Quang D. N., Hashimoto T., Stadler M. and Asakawa Y., New azaphilones from the inedible mushroom *Hypoxylon rubiginosum*, *Journal of Natural Products*, **2004b**, 67, 1152-1155.
77. Quang D. N., Hashimoto T., Nomura Y., Wollweber H., Hellwig V., Fournier J., Stadler M. and Asakawa Y., Cohaeirins A and B, azaphilones from the

- fungus *Hypoxylon cohaerens* and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*, *Phytochemistry*, **2005a**, 66, 797-809.
78. Quang D. N., Hashimoto T., Stadler M., Radulović N. and Asakawa Y., Antimicrobial azaphilones from the fungus *Hypoxylon multifforme*, *Planta Medica*, **2005b**, 71, 1058-1062.
 79. Quang D. N., Hashimoto T., Radulović N., Stadler M., and Asakawa Y., Antimicrobial azaphilones from the *Xylariaceae* inedible mushrooms, *Planta Medica*, **2005c**, 71, 1058-1062.
 80. Quang D. N., Stadler M., Fournier J., Asakawa Y., Carneic Acids A and B, chemotaxonomically significant antimicrobial agents from the Xylariaceae Ascomycete *Hypoxylon carneum*, *Journal of Natural Products*, **2006a**, 69, 1198-1202.
 81. Quang D. N., Stadler M. Fournier J., Tomita A. and Hashimoto T., Coharins C-F, four azaphilones from the xylariaceae fungus *Annulohypoxylon cohaerens*, *Tetrahedron*, **2006b**, 62, 6349-6354.
 82. Quang D. N., Harinantenaina L., Nishizawa T., Hashimoto T., Kohchi C., Soma G. I. and Asakawa Y., Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 cells by azaphilones from xylariaceae fungi, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2006c**, 29(1), 34-37.
 83. Quang D. N., Harinantenaina L., Nishizawa T., Hashimoto T., Kohchi C., Soma G. I. and Asakawa Y., Inhibitory activity of nitric oxide production in RAW 264.7 cells of daldinins A-C from the fungus *Daldinia childiae* and other metabolites isolated from inedible mushrooms, *Journal of Natural Medicines*, **2006d**, 60, 303-307.
 84. Phillips K. M., Ruggio D. M., Horst R. L., Minor B., Simon R. R., Feeney M. J., Byrdwell W. C. and Haytowitz D. B., Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 7841-7853.
 85. Rukachaisirikul V., Sommart U., Phongpaichit S., Hutadilok-Towatana N., Rungjindamai N. and Sakayaroj J., Metabolites from the xylariaceae fungus PSU-A80, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2007**, 55(9), 1316-1317.

86. Rukachaisirikul V., Sommart U., Phongpaichit S., Sakayaroj J and Kirtikara K., Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15, *Phytochemistry*, **2008**, 69, 783-787.
87. Schlingmann G., Milne L., Williams D. R., Carter G. T., Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. II. Isolation and structure determination, *The Journal of Antibiotics*, **1998**, 51(3), 303-316.
88. Schlingmann G., Milne L. and Carter G. T., Isolation and identification of antifungal polyesters from the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 6825-6835.
89. Schulz B., Sucker J., Aust H. J., Krohn K., Ludewig K., Jones P. G. and Döring D., Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species, *Mycological Research*, **1995**, 99, 1007-1015.
90. Schuster A. and Schmoll M., Biology and biotechnology of *Trichoderma*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2010**, 87, 787-799.
91. Shan R., Anke H., Stadler M. and Sterner O., Papyracillic acid, a new penicillic acid analogue from the Ascomycete *Lachnum papyraceum*, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 10249-10254.
92. Shi L. S., Chao C. H., Shen D. Y., Chan H. H., Chen C. H., Liao Y. R., Wu S. J., Leu Y. L., Shen Y. C., Kuo Y. H., Lee E. J., Qian K., Wu T. S. and Lee K. H., Biologically active constituents from the fruiting body of *Taiwanofungus camphorates*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 677-683.
93. Singh S. B., Kelly R., Guan Z., Polishook J.D., Domrowski A. W., Collado J., Gonzalez A., Pelaez F., Register E., Kelly T. M., Bonfiglio C. and Williamson J. M., New fungal metabolite geranylgeranyltransferase inhibitors with antifungal activity, *Natural Product Research*, **2005**, 19(8), 739-747.
94. Smania A. Jr., Delie Monache F., Smania E.F.A. and Cuneo R.S., Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (*Aphylllophoromycetideae*) fruit body, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **1999**, 1(4), 325-330.

95. Smania E.F.A., Delie Monache F., Smania A. Jr., Yunes R.A. and Cuneo R.S., Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*, *Fitoterapia*, **2003**, 74, 375-377.
96. Song R. and Gao H., Antifungal activities and stability of extracts from culture liquid of *Hypoxylon perforatum* to *Sphaeropsis sapinea*, *Acta Microbiologica Sinica*, **2009**, 49(7), 910-917.
97. Stadler M., Wollweber H., Mühlbauer A., Henkel T., Asakawa Y., Hashimoto T., Ju Y. M., Rogers J. D., Wetzstein H. G. and Tichy H. V. , Secondary metabolite profiles, genetic fingerprints and taxonomy of *Daldinia* and allies, *Mycotaxon*, **2001**, 77, 379-429.
98. Stadler M. and Fournier J., Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the *Hypoxylidae* (*Xylariaceae*), *Revista Iberoamericana de Micología*, **2006**, 23, 160-170.
99. Stadler M., Quang D. N., Tomita A., Hashimoto T. and Asakawa Y., Changes in secondary metabolism during stromatal ontogeny of *Hypoxylon fragiforme*, *Mycological research*, **2006**, 110, 811-820.
100. Svilar L., Stankov-Jovanovic V., Lesage D., Dossmann H. and Tabet J. C., High-resolution mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange study of mitorubrin azaphilones and nitrogenized analogues, *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, 47, 969-977.
101. Takei T., Yoshida M., Ohnishi-Kameyama M and Kobori M., Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berck.) S. Ito, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **2005**, 69(1), 212-215.
102. Talbot P. H. B., Principles of Fungal Taxonomy, The Macmillan Press, London and Basingstoke, 15-20 & 150-151, **1971**.
103. Tang A.M.C., Jeewon R. and Hyde K.D., A re-evaluation of the evolutionary relationships within the *Xylariaceae* based on ribosomal and protein-coding gene sequences, *Fungal Diversity*, **2009**, 34, 127-155.
104. Tao Y., Zeng X., Mou C., Li J., Cai X., She Z., Zhou S. and Lin Y., ¹H and ¹³C NMR assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08), *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2008**, 46, 501-505.

105. Thines E., Arendholz W. R., Anke H. and Sterner O., Benesudon a new antibiotic fungal metabolite from cultures of *Mollisia benesuada* (Tul.) phill, *Journal of Antibiotics*, **1997**, 50, 1300-1700.
106. Tomsheck A. R., Strobel G. A., Booth E., Geary B., Spakowicz D., Knighton B., Floerchinger C., Sears J., Liarzi O. and Ezra D., *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential, *Microbial ecology*, **2010**, 60, 903-914.
107. Urbanik E. and Ware B. R., Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1989**, 269(1), 181-187.
108. Wang G. J., Liang W. L., Ju Y. M., Yang W. B., Chang Y. W. and Lee T. H., Inhibitory effects of terpenoids from the fermented broth of the ascomycete *Stilbohypoxyton elaeicola* YMJ173 on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages, *Chemistry and Biodiversity*, **2012**, 9, 131-138.
109. Webster J. and Weber R., Introduction to fungi, Third Edition, Cambridge University Press, New York, 332-336, **2007**.
110. Wei D. L., Chang S. C., Wei Y. H., Lin Y. W., Chuang C. L. and Jong S. C., Production of cellulolytic enzymes from the *Xylaria* and *Hypoxylon* species of *Xylariaceae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **1992**, 8, 141-146.
111. Wu S. B., Bao Q. Y., Wang W. X., Zhao Y., Xia G., Zhao Z., Zeng H. and Hu J. F., Cytotoxic triterpenoids and steroids from the Bark of *Melia azedarach*, *Planta Medica*, **2011**, 77, 922-928.
112. Wu Y., Shan L., Yang S. and Ma A., Identification and antioxidant activity of melanin isolated from *Hypoxylon archeri*, a companion fungus of *Tremella fuciformis*, *Journal of Basic Microbiology*, **2008**, 48, 217-221.
113. Xu S., Ge H. M., Song Y. C., Shen Y., Ding H. and Tan R. X., Cytotoxic cytochalasin metabolites of endophytic *Endothia gyrosa*, *Chemistry and Biodiversity*, **2009**, 6, 739-745.
114. Yokoyama S., Bang T. H., Shimizu K. and Kondo R., Osteoclastogenesis inhibitory effect of ergosterol peroxide isolated from *Pleurotus eryngii*, *Natural Product Communications*, **2012**, 7(9), 1163-1164.

115. Yuan D., Mori J., Komatsu K.-I., Makino T., and Kano Y., An anti-aldosteronic diuretic component (drain dampness) in *Polyporus sclerotium*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2004**, 27(6), 867—870.
116. Zhang C., Ondeyka J. G., Zink D. L., Basilio A., Vicente F., Collado J., Platas G., Huber J., Dorso K., Motyl M., Byrne K. and Singh S. B., Isolation, structure and antibacterial activity from a pleosporalean ascomycete discovered by using antisense strategy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 2162-2166.
117. Zhang X., Li G., Ma J., Zeng Y., Ma W. and Zhao P., Endophytic fungus *Trichothecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi in vitro and its secondary metabolites, *The Journal of Microbiology*, **2010**, 48, 784-790.
118. Zhao Y.-Y., Qin X.-Y.,¹, Cheng X.-L., Liu X.-Y., Lin R.-C., Zhang Y., Li X.-Y., Sun X.-L. and Sun W.-J., Rapid resolution liquid chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for metabolism and pharmacokinetic studies of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, *Analytica Chimica Acta*, **2010a**, 675, 199–206.
119. Zhao Y.-Y., Chao X., Zhang Y., Lin R.-C. and Sun W.-J., Cytotoxic steroids from *Polyporus umbellatus*, *Planta Medica*, **2010b**, 76, 1755–1758.
120. Zheng L., Si J. and Wong Y. S., Ergosterol peroxide and 9,11-dehydroergosterol peroxide from Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (*Aphyllphoromycetideae*) mycelia inhibit the growth of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **2009**, 11(3). 249-257.
121. Γαλάτης Β., Αποστολάκος Π. και Κατσαρός Χ., Εισαγωγή στη Βοτανική, Εκδόσεις Σταμούλης Α., Αθήνα, 205, **1998**.
122. Γιαννίτσaros Α. και Καφανάκη-Γκότση Ε., Χερσαία φυτά και μύκητες, Μέρος Α, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμικής, Αθήνα, 2-35, **2002**.
123. Γιαννίτσaros Α. και Τζάκου Ό., Φαρμακευτική Βοτανική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 44-58, **2003**.
124. Λουκής Α., Κουλάδη Μ. και Τζάκου Ό., Σημειώσεις Φαρμακογνωσίας ΙΙΙ, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής,

Τομέας Φαρμακογνώσις και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα, 29-34,
2008.

125. www.galinos.gr