

Sinteza, analiza fizikalno-kemijskih svojstava i biološka aktivnost novih heteroaromatskih derivata rezveratrola

Bulava, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:859998>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Bulava

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Karla Bulava**

Predala je izrađen završni rad dana: 30. kolovoza 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Sandra Babić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 4. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Bulava

**SINTEZA, ANALIZA FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST NOVIH HETEROAROMATSKIH
DERIVATA REZVERATROLA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Zagreb, rujan 2023.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Irene Škorić i predan kao završni rad u akademskoj godini 2022./2023.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na pruženoj prilici, hvalevrijednim savjetima i izvrsnom stručnom vodstvu tijekom rada na Zavodu za organsku kemiju.

Zahvaljujem se doktorandici mag. appl. chem. Mileni Mlakić na svojoj pomoći tijekom boravka u laboratoriju i izrade eksperimentalnog dijela te na prenesenom znanju, strpljenju i podršci kroz cijelo vrijeme.

Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su od prvoga dana vjerovali u mene.

Zahvaljujem se svim prijateljicama koje su bile zaista velika podrška.

Veliko hvala mojoj kolegici i imenjakinji Karli K. uz koju su sati i sati u laboratoriju brže i ljepše prolazili.

Sažetak

Tijekom izrade završnog rada provedena je sinteza novih heteroaromatskih derivata rezveratrola kao potencijalnih antioksidansa. Spojevi **2-6** sintetizirani su Wittigovom reakcijom odgovarajućeg aldehida i fosfonijeve soli kao smjese izomera, iz kojih su kasnije tankoslojnom, kolonskom i preparativnom kolonskom kromatografijom izdvojeni čisti izomeri. Spojevi **3** i **4** uspješno su dobiveni u *cis*- i *trans*-konfiguraciji, dok je kod ostalih nastajao uglavnom samo *trans*-izomer. Svi su spojevi spektroskopski okarakterizirani tehnikama UV te ^1H i ^{13}C NMR. Ispitivanja biološke aktivnosti provedena su u smislu istraživanja njihove antioksidacijske aktivnosti na stabilizaciju DPPH radikala i mogućnost inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

Ključne riječi: antioksidacija, inhibicija kolinesteraza, rezveratrol, spektroskopija, Wittigova reakcija

Summary

Synthesis, analysis of physico-chemical properties and biological activity of new heteroaromatic derivates of resveratrol

During the preparation of the final thesis, the synthesis of new heteroaromatic derivatives of resveratrol as potential antioxidants was conducted. Compounds **2-6** were synthesized through the Wittig reaction of the corresponding aldehyde and phosphonium salt as mixtures of isomers, from which pure isomers were later separated using thin-layer, column and preparative column chromatography. Compounds **3** and **4** were successfully obtained in *cis*- and *trans*-configurations, while the others were obtained in the reaction mainly as *trans*-isomers. All compounds were spectroscopically characterized using UV and ^1H and ^{13}C NMR techniques. Biological activity testing was conducted to explore their antioxidant activity in stabilizing DPPH radicals and the potential inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

Key words: antioxidation, cholinesterases inhibition, resveratrol, spectroscopy, Wittig reaction

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. SINTEZA STILBENA	2
2.1.1. Wittigova reakcija	2
2.1.2. Julijina olefinacija	3
2.1.3. Petersonova olefinacija	3
2.1.4. Dekarboksilne reakcije unakrsnog spajanja	4
2.1.5. Mizoroki-Heckova reakcija	5
2.1.6. McMurryjeva reakcija	6
2.1.7. Perkinova reakcija	6
2.1.8. Suzuki-Miyaura reakcija	6
2.2. REZVERATROL	8
2.2.1. Opći podaci	8
2.2.2. Apsorpcija i metabolizam	9
2.2.3. Vino i rezveratrol	10
2.2.4. Kardiovaskularni sustav	11
2.2.5. Kemopreventivno djelovanje	12
2.2.6. Protuupalno djelovanje	12
2.2.7. Antivirusno djelovanje	13
2.3. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE	14
2.3.1. Općenito	14
2.3.2. Alzheimerova bolest	15
2.3.3. Beta-amiloidni peptid	15
2.3.4. Utjecaj rezveratrola na Alzheimerovu bolest	17
3. REZULTATI I RASPRAVA	19
3.1. Uvod	19
3.2. Sintaza i spektroskopska svojstva (E)-4-(2-(furan-2-il)vinil)fenola 2	20
3.3. Sintaza i spektroskopska svojstva tiofenskih derivata rezveratrola 3-6	21
3.4. UV spektrofotometrija	27
3.5. Kristalna struktura spojeva <i>trans</i> -3 i <i>trans</i> -6	28

3.6. Antioksidativna aktivnost i inhibicija kolinesteraze novih derivata rezveratrola	31
3.7. Genotoksičnost	34
3.8. Fizikalno-kemijska svojstva	36
4. EKSPERIMENTALNI DIO	41
4.1. Opće napomene	41
4.2. Sintaza 2-metiltiofenske soli 1	41
4.3. Sintaza novih rezveratrolnih derivata 2-6	42
5. ZAKLJUČAK	47
6. LITERATURA	48

1. UVOD

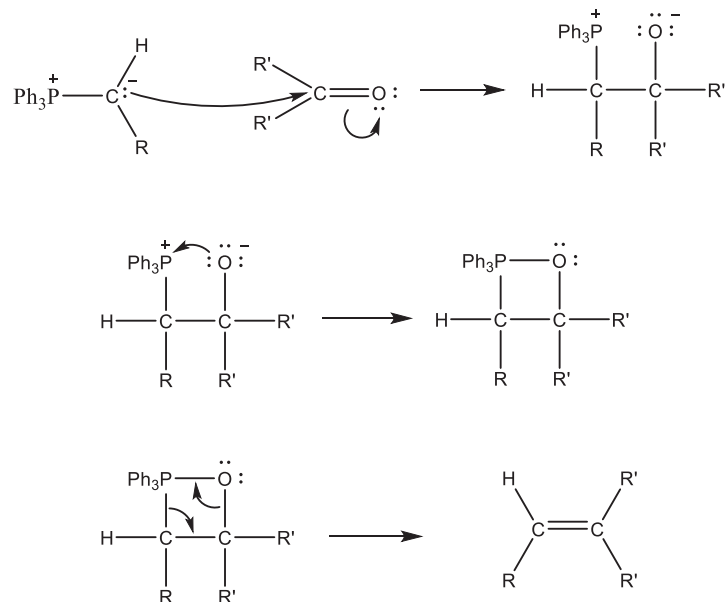
Stilbeni su konjugirani aromatski spojevi koji se pojavljuju u obliku *cis*- i *trans*-izomera. Pripadaju obitelji prirodnih polifenola koji su široko rasprostranjeni u hrani i ljekovitom bilju. Posljednjih se godina stilbenima posvećuje velika pozornost kao aktivnim molekulama koje se nalaze u prirodnim lijekovima. Do sada je iz biljaka izoliran 1041 stilben, a najviše biljaka dolazi iz porodica *Dipterocarpaceae*, *Moraceae*, *Gnetaceae*, *Orchidaceae*, *Polygonaceae*, *Euphorbiaceae*, *Stemonaceae*, *Cyperaceae*, *Vitaceae* i *Asparagaceae*. Stilbeni posjeduju niz bioloških aktivnosti uključujući antioksidacijska, antikancerogena, protuupalna, antibakterijska, anti-HIV i druga. Najpoznatiji je predstavnik rezveratrol, spoj prisutan u više od 70 biljnih vrsta poput grožđa, bobičastog voća i kikirikija. Rezveratrol ima vrlo važnu ulogu u prevenciji i liječenju neurodegenerativnih bolesti, dijabetesa i raka. Osim toga, kao funkcionalna aktivna molekula u crnom vinu smanjuje utjecaj oksidativnog stresa na kardiovaskularni sustav neutralizirajući slobodne kisikove radikale i reaktivne dušikove radikale [46].

2. OPĆI DIO

2.1. SINTEZA STILBENA

2.1.1. Wittigova reakcija

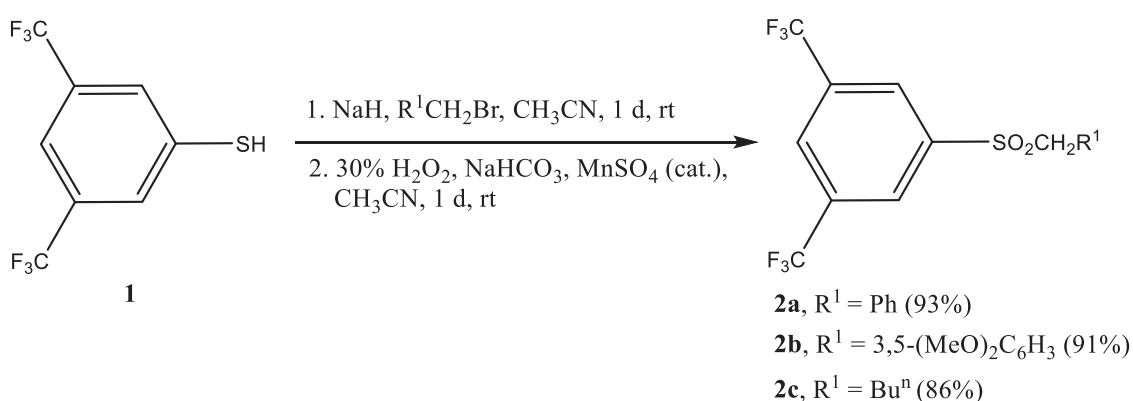
Wittigova reakcija jedna je od najistaknutijih i najkorištenijih načina sinteze stilbena i njegovih derivata. Georg Wittig otkrio je 1954. godine reakciju u kojoj se karbonilna skupina ketona i aldehida pretvara u novu dvostruku ugljik-ugljik vezu. U prvom stupnju fosforov ilid, zbog svojeg nukleofilnog ugljikovog atoma, napada karbonilni ugljikov atom i daje betain (Shema 1). Betain je međuprodukt s razdvojenim nabojem, gdje negativno nabijen kisikov i pozitivno nabijen fosforov atom tvore vrlo jake veze. To privlačenje u drugom stupnju dovodi do zatvaranja betaina i nastajanja četveročlanog oksafosfetanskog prstena. Treći stupanj koji karakterizira raspadanje oksafosfetana odvija se vrlo brzo. Nastaje stabilan trifenilfosfin-oksid i alken (Shema 1) [1]. U mnogim slučajevima nastaje smjesa *cis*-izomera i *trans*-izomera alkena, čiji omjeri variraju ovisno o vrsti ilida. *Cis*-izomeri dominiraju u situacijama kada reagiraju nestabilni ilidi, koji u svojoj strukturi nemaju elektron-akceptorske skupine. S druge strane, stabilni ilidi sadrže elektron-akceptorske skupine, manje su bazični i reaktivni od nestabilnih ilida te kao produkt daju isključivo *trans*-izomer [2].



Shema 1. Mehanizam Wittigove reakcije

2.1.2. Julijina olefinacija

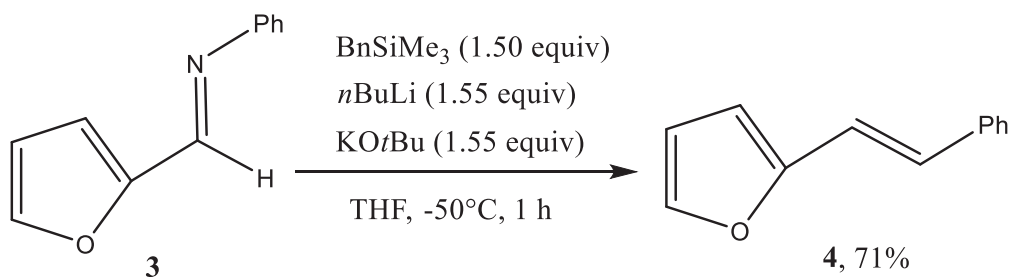
Julijina olefinacija, poznata kao Julia-Lythgoe olefinacija, prvi je put provedena prije otprilike 30 godina, a temelji se na reduktivnoj eliminaciji β -aciloksi-fenil-sulfona. U moderno doba, novija inačica Julijine olefinacije, Julia-Kocienski olefinacija, postala je vrlo popularna metoda u sintezi olefina u kojoj se fenil-sulfon zamijenio s heteroarilnim sulfonima. Osobito je važna njezina primjena u sintezi stilbenskih derivata, posebice rezveratrola (Shema 2) [3].



Shema 2. Reakcija Julia-Kocienski olefinacije (nastajanje sulfona)

2.1.3. Petersonova olefinacija

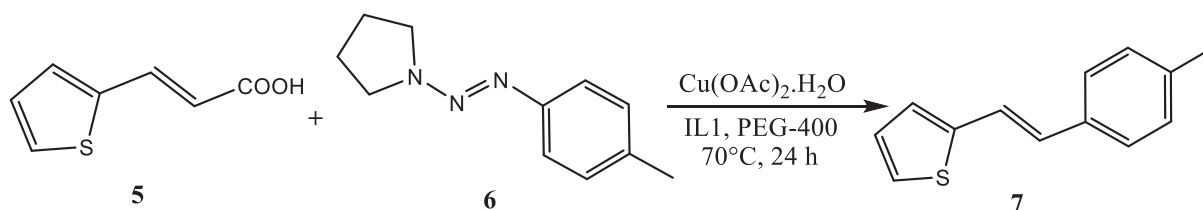
Jedna od najistaknutijih sintetskih reakcija za dobivanje derivata alkena i stilbena je Petersonova reakcija. Prvi je put izvedena 1968. godine, referirajući se na Wittigovu reakciju, a u kojoj je uključen α -sililkarbanion i spojevi koji sadrže karbonilnu skupinu (Shema 3). Na taj je način osiguran alken kao produkt reakcije. Reakcija olefinacije važna je reakcija u području sintetske kemije, a njezina glavna prednost je mogućnost uklanjanja hlapljivih silicijevih nusprodukata. U reakciji imina **3** i benzil-trimetilsilana dobiva se 2-stirilfuran **4**, koji se tretira s *n*Bu₄NF kako bi se sililacija dogodila na poziciji 2 furanskoga prstena u dobrom iskorištenju [4].



Shema 3. aza-Petersonova olefinacija za dobivanje stilbenskog derivata

2.1.4. Dekarboksilne reakcije unakrsnog spajanja

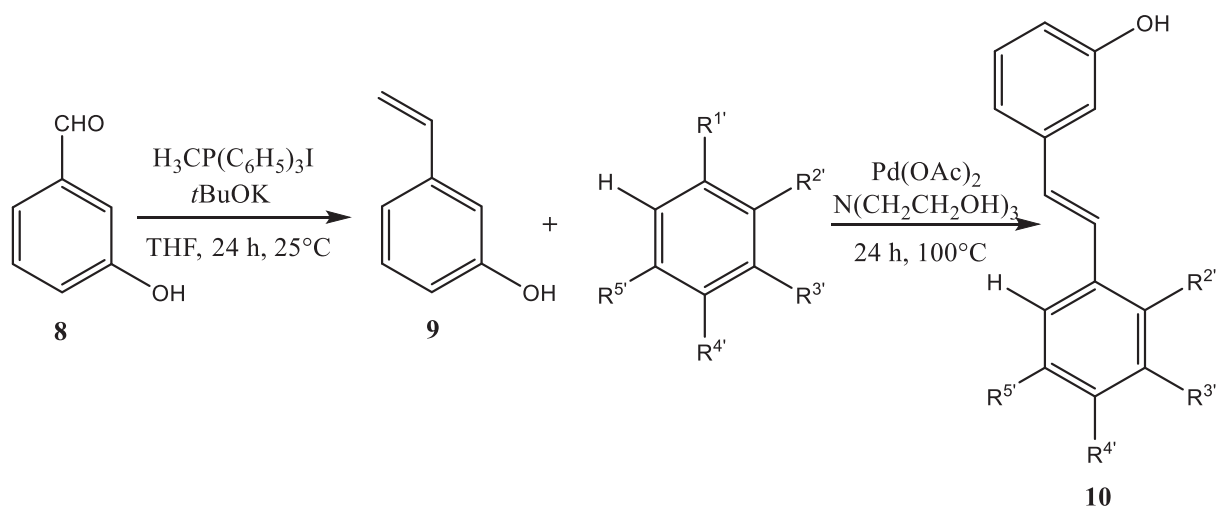
Reakcije dekarboksilacije uz unakrsno spajanje pokazale su se vrlo uspješnima u stvaranju C-C veza i C-heteroatom veza, a njihova je primjena moguća u ekološki prihvatljivoj te regio- i stereoselektivnoj sintezi. Reakcija je provedena korištenjem raznih cimetnih kiselina i aril-triazena supstituiranih na razne načine. U prikazanoj reakciji heteroaromatska (*E*)-3-(tiofen-2-il) akrilna kiselina **5** i *p*-supstituirani aril triazen **6** daju stilbensi produkt **7** u iskorištenju od 78%. Kao katalizator se koristi 20 mol% $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, dok je promotor ionska tekućina IL1 koja pomaže stvaranju arendiazonijevog kationa iz aril-triazena (Shema 4) [5].



Shema 4. Dekarboksilacija uz unakrsno spajanje

2.1.5. Mizoroki-Heckova reakcija

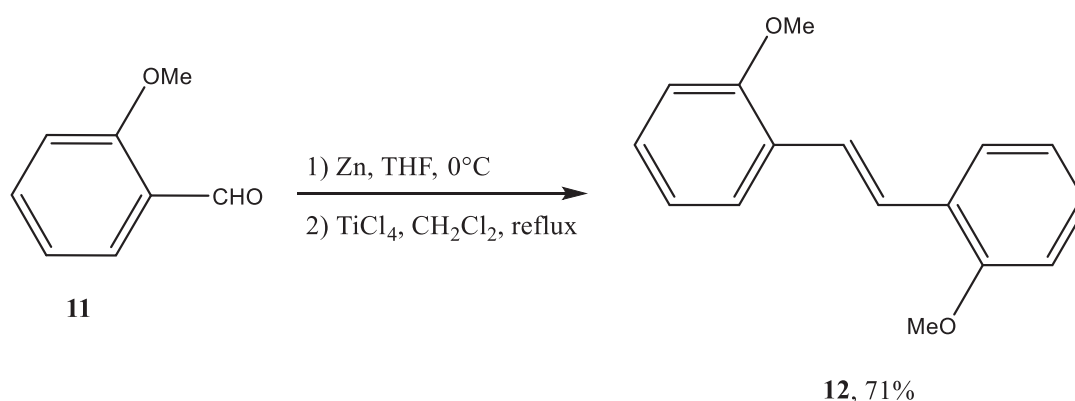
Mizoroki-Heckova reakcija još je jedan način sinteze stilbenskih derivata, a do prvih se saznanja došlo već ranih 60-ih godina 20. stoljeća. To je najučinkovitija metoda za vinilaciju aril/vinilhalida ili triflata. Kako bi nastala nova C-C veza, potrebna je baza i katalizator dodan *in situ* u reakcijsku smjesu. Paladijeve nanočestice pokazale su se najboljima u reakciji ariliranja alkena već 1971. godine, a i danas slove kao vrlo uspješan aktivni katalizator [6]. I danas Mizoroki-Heckova reakcija privlači pozornost sintetskih kemičara. Intenzivno se koristi u sintezi farmaceutika te agrokemijskih i prirodnih proizvoda. Mnogi stilbeni i heterostilbeni dobiveni su u odličnim iskorištenjima, počevši od aril-bromida i raznih olefina [7]. Kao primjer dana je sinteza 3-hidroksisupstituiranog stilbena (Shema 5). 3-Hidroksibenzaldehid **8** najprije služi za sintezu 3-hidroksistirena **9** Wittigovom olefinacijom, koji potom ulazi u Mizoroki-Heckovu sintezu stilbena **10** [8].



Shema 5. Sintaza supstituiranog stirena Wittigovom olefinacijom i 3-hidroksisupstituiranog stilbena uzastopnom Mizoroki-Heckovom reakcijom

2.1.6. McMurryjeva reakcija

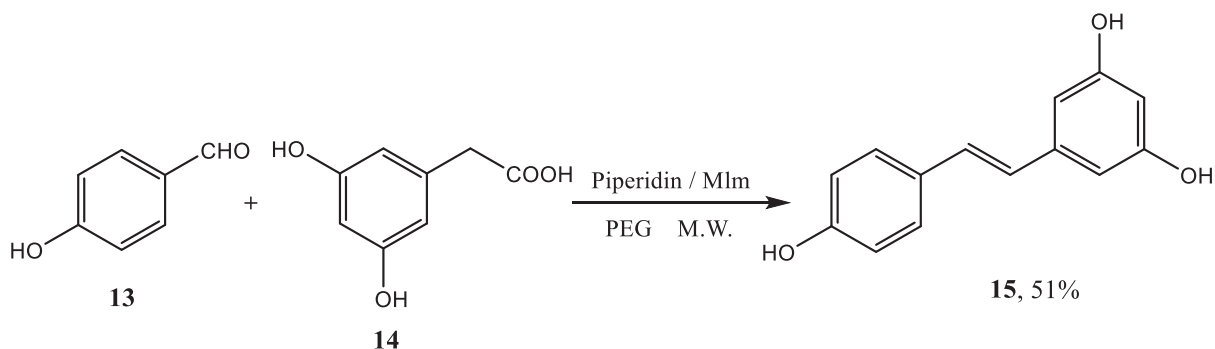
McMurryjeva reakcija prvi je put izvedena 1980. godine za sintezu poli (p-fenilen vinilena), PPV-a [9]. Aldehidi i ketoni podliježu reduktivnoj dimerizaciji uz korištenje niskovalentnog titanijevog reagensa, TiCl_4 i cinka, gdje nastaje odgovarajući alken. Iako se McMurryjevom reakcijom obično dobivaju *E*-izomeri stilbenskih derivata, ne isključuje se mogućnost dobivanja *Z*-izomera ukoliko geometrijska ograničenja kontroliraju orijentaciju oba karbonilna ostatka. Tako, reakcijom 2-metoksibenzaldehida **11** s reducirajućim agensima nastaje 2,2'-dimetoksistilben **12** (Shema 6) [10].



Shema 6. McMurryjeva reakcija *E*-stilbena

2.1.7. Perkinova reakcija

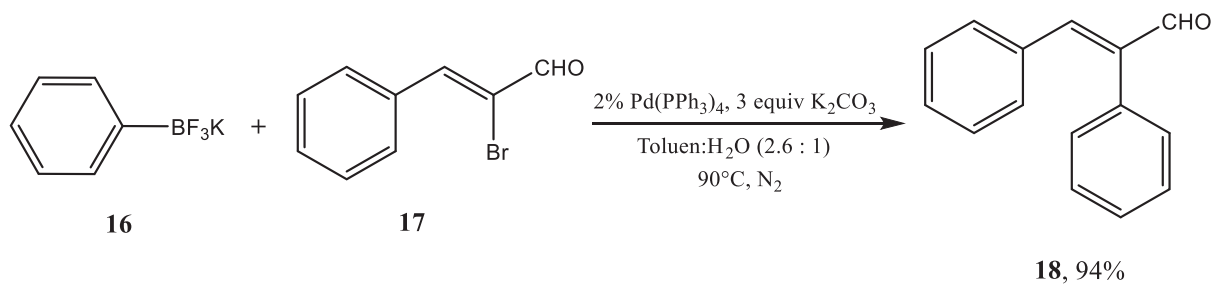
Godine 1868. W. H. Perkin opisao je sintezu kumarina koja se provodila zagrijavanjem natrijeve soli salicilaldehida s anhidridom octene kiseline. Kasnije se došlo do novih otkrića vezanih za sintezu cimetne kiseline i njezinih analoga, a upravo je ta reakcija postala poznata pod nazivom Perkinova reakcija [11]. Vrlo je važan sintetski put bioaktivnih stilbena, između ostalih i rezveratrola **15**. Provodi se još od 1941. godine, a reakcija je benzaldehida i feniloctene kiseline u prisutnosti anhidrida octene kiseline i baze, nakon koje slijedi dekarboksilacija s kinolin-Cu soli. Zbog svoje toksičnosti i lošeg iskorištenja reakcije, kinolin-Cu sol izbačena je iz uporabe, a sinteza se počela provoditi korištenjem mikrovalnog zračenja, što je ekološki puno prihvatljivija i sigurnija opcija (Shema 7) [12].



Shema 7. Perkinova reakcija rezveratrola

2.1.8. Suzuki-Miyaura reakcija

Suzuki-Miyaura reakcija jedna je od najblažih metoda za stvaranje nove C-C veze uz posredovanje određenog metala. Organoborovi spojevi uključeni su u reakciju unakrsnog spajanja, gdje su borne kiseline i boronatni esteri najčešće korišteni derivati [13]. U reakciji polikondenzacije spajaju se s aril- ili alkenil-halidima, a kao katalitički prekursor se obično koristi tetrakis-(trifenilfosfin)paladij(0) (Shema 8) [14].

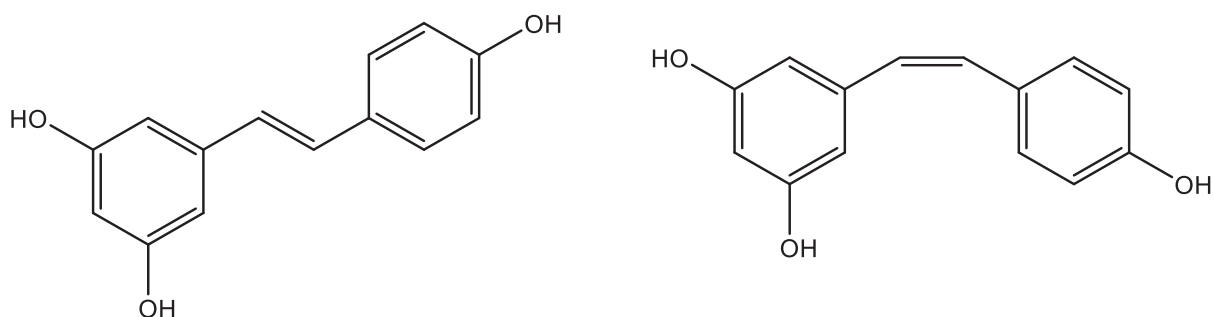


Shema 8. Suzuki-Miyaura reakcija

2.2 REZVERATROL

2.2.1 Opći podatci

Rezveratrol, poznat i pod nazivom *trans*-3, 4', 5-trihidroksistilben, monomer je stilbena s molekulskom formulom C₁₄H₁₂O₃ i molekulskom masom od 228.25 g/mol. Molekula rezveratrola sastavljena je od dva aromatska prstena međusobno povezana dvostrukom vezom, a može se nalaziti u *cis*- i *trans*-konfiguraciji (Slika 1). Nije planaran zbog steričnih utjecaja aromatskih prstenova. Oba izomera stabilna su u području pH od 3 do 8, ali se pri pH 10 ili više mogu razgraditi [15].



Slika 1. *Trans*- (lijevo) i *cis*-izomer (desno) rezveratrola

Rezveratrol je zapravo prirodni fitoaleksin kojeg proizvode briofiti i više biljke, kao odgovor na različite podražaje, primjerice napad patogenih gljivica ili UV zrake [16]. Godine 1939. Dr. Michio Takaoka, japanski istraživač, prvi je došao do otkrića rezveratrola i to iz otrovne ljekovite biljke *Veratrum grandiflorum* [15]. Kasnije je sintetiziran iz korijena biljke *Polygonum cuspidatum* („Kojokon“ na japanskom) koja se dugo koristila u tradicionalnoj istočnjačkoj medicini. *Trans*-rezveratrol prvi su otkrili Langcake i Pryce 1976. godine u vinovoj lozi (*Vitis vinifera*). U tkivu lista vinove loze došlo je do sinteze *trans*-rezveratrola kao odgovor na prisutnu gljivičnu infekciju, uglavnom *Botrytis cinerea* ili zbog izlaganja ultraljubičastom zračenju [17]. Rezveratrol je pronađen u više od 70 biljnih vrsta, uključujući ljubičasto grožđe, crveno vino, borovnice, dud, rabarbaru, kikiriki, brusnice, čokoladu i borove [15].

2.2.2. Apsorpcija i metabolizam

Farmakologija rezveratrola bila je podvrgnuta opsežnim ispitivanjima tijekom proteklog stoljeća. Farmakokinetička ispitivanja također su se provodila u prekliničkim ispitivanjima, kao i onima na ljudima. Pokazalo se da njegova farmakokinetička svojstva nisu jednako dobra u usporedbi s dobrom farmakološkom aktivnosti. Nove studije dokazuju visoku oralnu apsorpciju rezveratrola te brz i opsežan metabolizam bez štetnih učinaka. Kod ljudi, oko 70% oralno primijenjenog rezveratrola (25 mg) rapidno se (< 30 min) apsorbira i metabolizira s vrlo malom razinom u plazmi, oko 2 µM rezveratrolnih metabolita i poluživotom od 9 do 10 sati. Količina rezveratrola koju debelo crijevo kod čovjeka može apsorbirati i metabolizirati ovisi o funkciji jetre i o metaboličkoj aktivnosti lokalne crijevne mikroflore [18]. Metabolizam rezveratrola dijeli se u dvije faze koje uključuju različite klase enzima. Faza I sastoji se od citokroma P450 (CYP) i flavin-monooksigenaze, koji oksidiraju, reduciraju ili hidroliziraju strane molekule i čine ih polarnijima kako bi se olakšalo njihovo izlučivanje. Faza II sastoji se od konjugirajućih i antioksidativnih enzima koji na koordiniran način potiču detoksikaciju štetnih molekula, uključujući toksične produkte/nusprodukte faze I. Ljudski rezveratrol brzo prolazi fazu II konjugacije, zajedno s glukoronidacijom i sulfatacijom, i to na više mjesta na molekuli. To čini metabolizam rezveratrola vrlo kompleksnim [19]. I *cis*- i *trans*-izomeri podliježu konjugaciji glukoronida uridin 5'-difosfoglukoronoziltransferazom (UGT), kako bi se formirala dva odgovarajuća glukoronida, rezveratrol-3-*O*-glukoronid i rezveratrol-4'-*O*-glukoronid. Također, dolazi i do konjugacije sulfata pomoću sulfotransferaza (SULTs) iz jetre, gdje nastaje *trans*-rezveratrol 3-*O*-sulfat, *trans*-rezveratrol-4'-*O*-sulfat i *trans*-rezveratrol-3-*O*-4'-*O*-disulfat. *Cis*-oblici metabolita identificirani u ljudskom urinu su *cis*-rezveratrol-4'-*O*-sulfat, *cis*-rezveratrol-3-*O*-glukoronid i *cis*-rezveratrol-4'-*O*-glukoronid [15].

2.2.3. Vino i rezveratrol

Uzrečica *In vino veritas* bila je poznata još starim Grcima, ali u vinu nije samo istina, puno je više benefita koje nudi.

Naime, u sjemenu i kožici grožđa te u samom soku i vinu pronađen je upravo rezveratrol. Koncentracija rezveratrola u crnom vinu (Slika 2) veća je nego u rosé i bijelom vinu, a sve je to zbog načina proizvodnje crnog vina, gdje su mošt, kožica i sjemenke cijelo vrijeme u kontaktu tijekom fermentacije. Količina samog rezveratrola ovisi o mnogim čimbenicima, poput sorte grožđa, zemljopisnoj regiji, klimatskim i argonomskim čimbenicima te enološkoj praksi. U vinu je najviše prisutan *trans*-rezveratrol, nakon kojeg slijedi *trans*-piceid. Općenito, *trans*-oblici spojeva prevladavaju nad *cis*-oblicima. Prisutnost rezveratrola u grožđu ovisit će o izloženosti biotičkom ili abiotičkom stresu. Razni patogeni napadi, kemijski tretmani (BTH) i UVC zračenje razlozi su zbog kojih raste koncentracija rezveratrola u grožđu [20]. Osim rezveratrola, u vinu su prisutni još mnogi polifenoli, kao na primjer kutarna kiselina, kvercetin, hidroksicimetna kiselina, elagična kiselina, ferulična kiselina, kafeinska kiselina, kaftarna kiselina, katehin, miricetin i drugi [21]. U crnom je grožđu 44% kvercentina, 37% miricetina, 6,4% kemferola, 5,4% laricitrina, 3,9% izorhamnetina i 3,2% siringetina, a u bijelom grožđu 81% kvercetina, 17% kemferola i 1,7% izorhamnetina. Brojna su istraživanja pokazala da spojevi u crnim vinima, posebno polifenoli, alkohol i rezveratrol, igraju važnu ulogu u sprječavanju razvoja i napredovanja ateroskleroze, na način da pospješuju inhibiciju lipidne peroksidacije (lipoproteini, membrane), djeluju na keliranje bakra, hvatanje slobodnih radikala, sintezu eikosanoida, inhibiraju agregaciju trombocita, djeluju protuupalno, poboljšavaju endotelne funkcije, snižavaju krvni tlak, reguliraju metabolizam lipoproteina, aktiviraju proteine koji sprječavaju starenje stanica te imaju estrogeno i antikancerogeno djelovanje [22].

Glavna biološka svojstva rezveratrola su antioksidacijsko djelovanje, kemopreventivno djelovanje, antivirusno djelovanje, antiagregacija trombocita, protuupalno djelovanje i zaštita kardiovaskularnog sustava [23].



Slika 2. Crno vino kao izvor rezveratrola

2.2.4. Kardiovaskularni sustav

Pretpostavlja se da polifenoli, kojima pripada i rezveratrol, imaju mogućnost zaštite kardiovaskularnog sustava. Naime, znanstvenici su zapazili pojavu zvanu „French paradox“. Francusko stanovništvo ima smanjenu učestalost koronarne bolesti srca, usprkos velikoj sklonosti ka korištenju duhanskih proizvoda i prehrani bogatoj mastima. Ta se pojava pripisuje povećanoj konzumaciji crnog vina koje je bogato polifenolima [24].

Kardioprotektivni učinak rezveratrola nije dovoljno klinički ispitan, ali razne *in vitro* studije i eksperimenti na životinjama sugeriraju dobru zaštitu od koronarnih bolesti srca nizom mehanizama: inhibicija oksidacije lipoproteina, inhibicija agregacije trombocita, sinteza proaterogenih eikosanoida i ekspresija prokoagulantnog tkivnog faktora, inhibicija proliferacije stanica i povećana vazorelaksacija [25]. Najprihvaćeniji mehanizam kardioprotekcije rezveratrolom je inhibicija agregacije trombocita. Trombociti su stanice bez jezgre koje nastaju u koštanoj srži i koje zaustavljaju krvarenje agregacijom na ranjenom mjestu. Mogu se aktivirati pomoću nekoliko različitih faktora, kao što su adenzin-difosfat, kolagen i trombin. Kad aktivirani trombociti promijene morfologiju, agregiraju se i zatvore mjesto oštećenja krvne žile. Pretjerana agregacija može dovesti do pojave kardiovaskularnih bolesti.

Predtretman trombocita s rezveratrolom omogućuje inhibiciju lipopolisaharida te sustava lipopolisaharida i trombina, što odgovara stimuliranoj adheziji trombocita na kolagen i fibrinogen. Koristeći *in vivo* i *in vitro* modele, Wang je dokazao da rezveratrol inhibira adenozin-difosfat, kolagen i trombin, gdje se radi o stimuliranoj agregaciji ljudskih trombocita *in vitro* [26].

2.2.5. Kemopreventivno djelovanje

Kemopreventivno svojstvo rezveratrola potječe od njegove sposobnosti da blokira aktivaciju raznih kancerogenih tvari i/ili stimulira njihovu detoksikaciju, da sprječi oksidativno oštećenje ciljnih stanica DNA, da smanji upalne odgovore i proliferaciju stanica raka. U svojoj su studiji John M. Pezzuto i njegovi kolege izvjestili da je rezveratrol vrlo učinkovit u blokiranju sve tri faze karcinogeneze: inicijacije, promocije i progresije [27]. Mnogi kemopreventivni agensi induciraju apoptozu, uključujući i rezveratrol. On inducira apoptozu u različitim stanicama, kao što su JB6 epidermalne stanice, stanice akutne promijelocitne leukemije HL-60, različite stanične linije raka debelog crijeva, stanične linije raka dojke i stanice raka prostate. U JB6 stanicama rezveratrol inhibira tumorski promotor, TPA ili epidermalni faktor rasta, EGF, koji reducira transformaciju stanica ovisno o dozi (od 2,3-40 M). U tom rasponu, rezveratrol će inducirati apoptozu [28].

2.2.6. Protuupalno djelovanje

Upala je adaptivni odgovor koji može biti potaknut različitim signalima opasnosti, kao što je invazija mikroorganizama ili ozljeda tkiva. Mnoge su studije pokazale da rezveratrol regulira upalni odgovor preko niza signalnih puteva, kao što su put arahidonske kiseline (AA put), gdje je dokazano da rezveratrol uzrokuje smanjenje prostaglandina, PG, kao i ekspresiju ciklooksigenaze, COX-2, na način da se smanji oslobađanje arahidonske kiseline, AA te antioksidativnu indukciju COX-2.

Put nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B) drugi je način regulacije upalnog odgovora u kojem rezveratrol smanjuje proizvodnju interleukina (IL-1 β) i inhibira aktivaciju NF- κ B koja je ovisna o IL-1 β *in vitro*. NF- κ B nuklearni je transkripcijski faktor koji regulira signale za kontrolu staničnog preživljavanja, proliferacije i upalne proizvodnje citokina.

Sljedeći način je put MAPK (protein-kinaza aktivirana mitogenom). Rezveratrol suzbija upalni odgovor blokiranjem ekspresije proteina fosforilacije p65 i I κ B iz NF- κ B signalizacije, kao i fosforilacije p38 i ERK iz MAPK signalizacije kod mastitisa. Posljednji način regulacije je put AP-1, gdje rezveratrol blokira aktivaciju samog AP-1. AP-1 transkripcijski je faktor koji regulira niz staničnih procesa, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, upalu i apoptozu [29].

2.2.7. Antivirusno djelovanje

Antivirusni učinci rezveratrola prikazani su kod brojnih patogenih ljudskih i životinjskih virusa, kao što su influenza ili gripa, Epstein-Barrov virus, herpes simplex (HSV), respiratorni sincicijski virus (RSV), virus humane imunodeficijencije (HIV), hepatitis C, kuga pataka (DVE) i drugi. Inhibicija proliferacije virusa nije bila direktno povezana s njegovim antioksidativnim djelovanjem, već s njegovom sposobnošću inhibiranja proizvodnje virusnih proteina i ekspresije gena [30]. Zanimljivo je da stanični putevi koji dovode do njegove zaštitne aktivnosti i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Također, neki od molekularnih puteva reguliranih rezveratrolom, poput p53, NF- κ B ili PML, uključeni su u antivirusnu obranu stanice. Jedna od interesantnijih virusnih infekcija je HIV-1, za koju je predloženo nekoliko mehanizama terapijske zaštite rezveratrolom. Prvi je induciranje litičkog ciklusa virusa iz latentno zaraženih stanica kako bi se virusne rezerve mogle eliminirati, zatim slijedi sinergijski učinak rezveratrola na inhibiciju replikacije HIV-1 kad se primijeni zajedno s nukleozidnim analogima *in vitro*, a kao posljednji je slabljenje transaktivacije HIV-1 LTR izazvane Tat-om, proteinom koji ima ključnu ulogu u replikaciji HIV-1 u *in vitro* sustavu [31].

2.3. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE

2.3.1. Općenito

U završnom radu ispituje se antioksidativno djelovanje rezveratrola na vanjskoj instituciji. Intenzivna istraživanja tijekom godina dovela su do zaključka da je rezveratrol vrlo moćan antioksidans i izvrstan kandidat u borbi protiv starenja. Utjecaj na starenje imaju i genetski faktori te način prehrane. Sveučilište u Čileu provelo je istraživanje u kojem su uspoređivali antioksidacijski kapacitet plazme, razine DNA leukocita 8-OH-deoksigvanozina i plazmatski 7C-hidroksikolesterol kod skupine dobrovoljaca koji su bili na zapadnjačkoj prehrani s visokim udjelom masti, mediteranskoj prehrani ili mediteranskoj prehrani izokalorično suplementiranoj s crnim vinom ili voćem i povrćem, u razdoblju od tri mjeseca. Prehrana u kojoj je ubačena konzumacija crnog vina bila je i više nego dvostruko učinkovitija u smanjenju serumskih markera oksidativnog stresa od prehrane s dodatkom povrća. Zaključili su da polifenoli prisutni u mediteranskoj prehrani pružaju razne benefite u borbi protiv starenja. Također, u čajevima su prisutni katehini i teafolini, snažni antioksidansi koji uklanjaju slobodne radikale i keliraju redoks-aktivne ione prijelaznih metala [32].

Antioksidativno djelovanje rezveratrola i vitamina C u krvnim zrnima vrlo je interesantno istraživanje provedeno početkom 21. stoljeća. Utjecaj oba spoja na oksidativni stres u trombocitima procijenjen je na sljedeće načine: stvaranjem superoksidnih radikala (O_2^-) i drugih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS): H_2O_2 , singletni kisik i organski radikali (kemiluminiscencija), te proizvodnjom reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS) i konjugiranih diena kao markera lipidne peroksidacije. Kod visokih koncentracija vitamina C (750-3000 μM) dolazi do inhibicije lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa, tj. visoke koncentracije potiču antioksidativno djelovanje vitamina C. Niske koncentracije vitamina C (100 μM) potiču njegovo prooksidativno djelovanje. Dodatkom rezveratrola smanjen je oksidativni stres u trombocitima uzrokovan prooksidativnim djelovanjem vitamina C, dok u antioksidativnoj dozi nije primijećeno sinergističko djelovanje rezveratrola i vitamina C. Rezveratrol je u najvišim koncentracijama uzrokovao smanjenje kemiluminiscencije u puno manjem intenzitetu od vitamina C (tek oko 30%) i slabije je inhibirao lipidnu peroksidaciju. Obje se supstance mogu koristiti za smanjenje oksidativnog stresa, ali nešto učinkovitiji je vitamin C. Značajni su i jer mogu djelomično modulirati ili eliminirati kardiovaskularne bolesti [33].

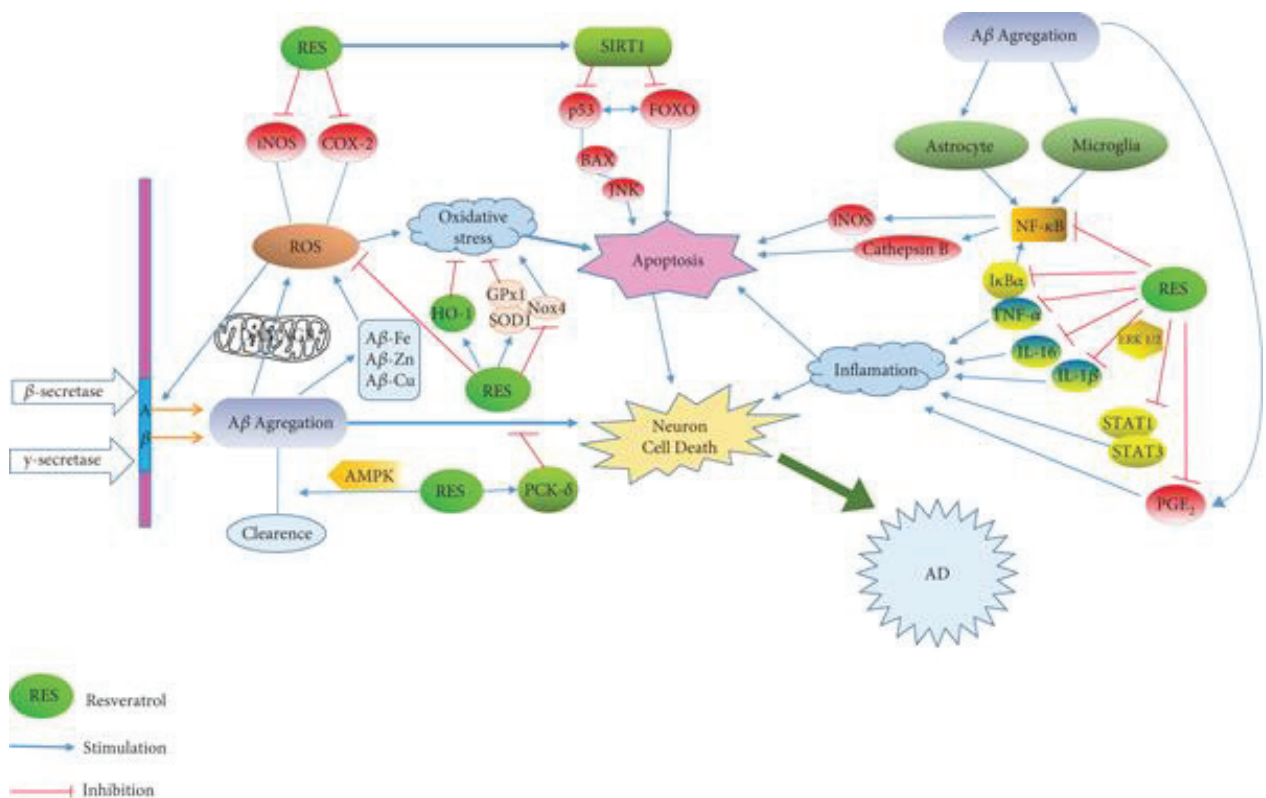
2.3.2. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (AD) neurodegenerativni je poremećaj karakteriziran progresivnom degeneracijom i gubitkom neurona u mozgu, što je povezano s pojavom neurofibrilarnih čvorova i senilnih plakova, dvama neuropatološkim obilježjima AD-a. Smatra se da je za stvaranje neurofibrilarnih čvorova i senilnih plakova u mozgu odgovoran beta-amiloidni peptid [34]. Šezdesetih godina prošlog stoljeća Alzheimerova se bolest dijagnosticirala kao senilna, vaskularna, aterosklerotska demencija te kao kronični organski psihosindrom [35]. Čini više od 65% staračkih demencija, a češća je kod žena zbog duljeg životnog vijeka [36]. Pogađa čak jednog od deset Amerikanaca starijih od 65 godina i gotovo polovicu svih Amerikanaca starijih od 85 godina. Nakon 65. godine života izgledi za razvijanje AD-a udvostručuju se svakih pet godina [37]. Simptomi i znakovi Alzheimerove bolesti uključuju ranu, srednju i kasnu fazu. Gubitak kratkotrajnog pamćenja je najčešći prvi znak bolesti. Iako se o tome još raspravlja, prosječno vrijeme preživljavanja od trenutka postavljanja dijagnoze iznosi sedam godina. Liječenje je zapravo vrlo slično ostalim vrstama demencije. Inhibitori kolinesteraze umjereno poboljšavaju kognitivnu funkciju i pamćenje kod pojedinih bolesnika. Najvažniji inhibitori kolinesteraze koji se koriste u liječenju su donepezil, rivastigmin i galantamin, a nedavno je odobren i memantin [36].

2.3.3. Beta-amiloidni peptid

Beta-amiloidni peptid, A β , nastaje iz amiloidnog prekursorskog proteina (APP) sekvencijalnim cijepanjem pomoću BACE-1 i γ -sekretaze. Znanstvenici su se dugo bavili upravo tim enzimima kako bi razvili lijek za Alzheimerovu bolest, smatrajući da se blokiranjem aktivnosti ovih enzima može smanjiti stvaranje A β -a, a time i njegova stanična toksičnost. Drugi mehanizam odgovoran za kontrolu razine A β -a u mozgu prikazuje protok ili ponovni ulazak u mozak, uglavnom kroz receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije. Stabilna razina moždanog A β -a predstavlja dinamičku ravnotežu između sinteze, ponovnog unosa i uklanjanja. Ukoliko se smanji njegovo uklanjanje, zasigurno će doći do nakupljanja A β -a. Stoga su se putevi uklanjanja A β -a pojavili kao novi terapijski cilj u liječenju Alzheimerove bolesti [38].

Stope sinteze i uklanjanja A β -a u odraslih osoba izmjerene su u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) te su procijenjene na 7,6% odnosno 8,3%. Vjerojatnost nakupljanja vrlo je mala, međutim ukoliko se pojave defekti prilikom uklanjanja A β -a, dolazi do nakupljanja što uzrokuje toksičnost stanice. Mnogi podatci govore da je u središnjem živčanom sustavu proces uklanjanja beta-amiloidnog peptida odgovorniji za razvoj Alzheimerove bolesti od samog procesa sinteze. Nastali defekti prilikom uklanjanja A β -a uzrokuju njegovo nakupljanje na stijenkama krvnih žila koje se nalaze u mozgu, što dovodi do cerebralne amiloidne angiopatije (CAA). To je stanje prisutno u otprilike 90% bolesnika s AD-om i najčešći je uzrok lobarnog intracerebralnog krvarenja. Uklanjanje A β -a iz mozga postiže se pomoću nekoliko mehanizama, uključujući enzimske i neenzimske puteve (Slika 3) [38].



Slika 3. Prikaz glavnih staničnih puteva za mehanizme rezveratrola u Alzheimerovoj bolesti [40]

2.3.4. Utjecaj rezveratrola na Alzheimerovu bolest

Oksidativni stres utječe na patofiziologiju neurodegenerativnih poremećaja, uključujući Alzheimerovu bolest. Reaktivne kisikove vrste, ROS, koje proizvode oštećeni mitohondriji tijekom oksidativnog stresa, mogu oštetiti proteine, nukleinske kiseline i membranu polinezasićenih masnih kiselina, uzrokujući lipidnu peroksidaciju i gubitak integriteta membrane te povećane propusnosti Ca^{2+} u plazma membranu. ROS povećava i proizvodnju $\text{A}\beta$ -a pa tako začarani krug između nakupljanja ROS-a i $\text{A}\beta$ -a može ubrzati napredovanje AD-a. Kronično liječenje rezveratrolom značajno popravlja kognitivno oštećenje izazvano kolhicinom, smanjuje povišeni malondialdehid (MDA) i razine nitrita te obnavlja osiromašeni glutation (GSH) i aktivira sirtuin 1 (SIRT1). Također, modulira važne glijalne funkcije, kao što su aktivni unos glutamata, sadržaj glutationa (GSH) i izlučivanje citosolnog proteina S100B te stimulira aktivnost hem oksigenaze 1 (HO-1) i povećava razinu njegove ekspresije [39].

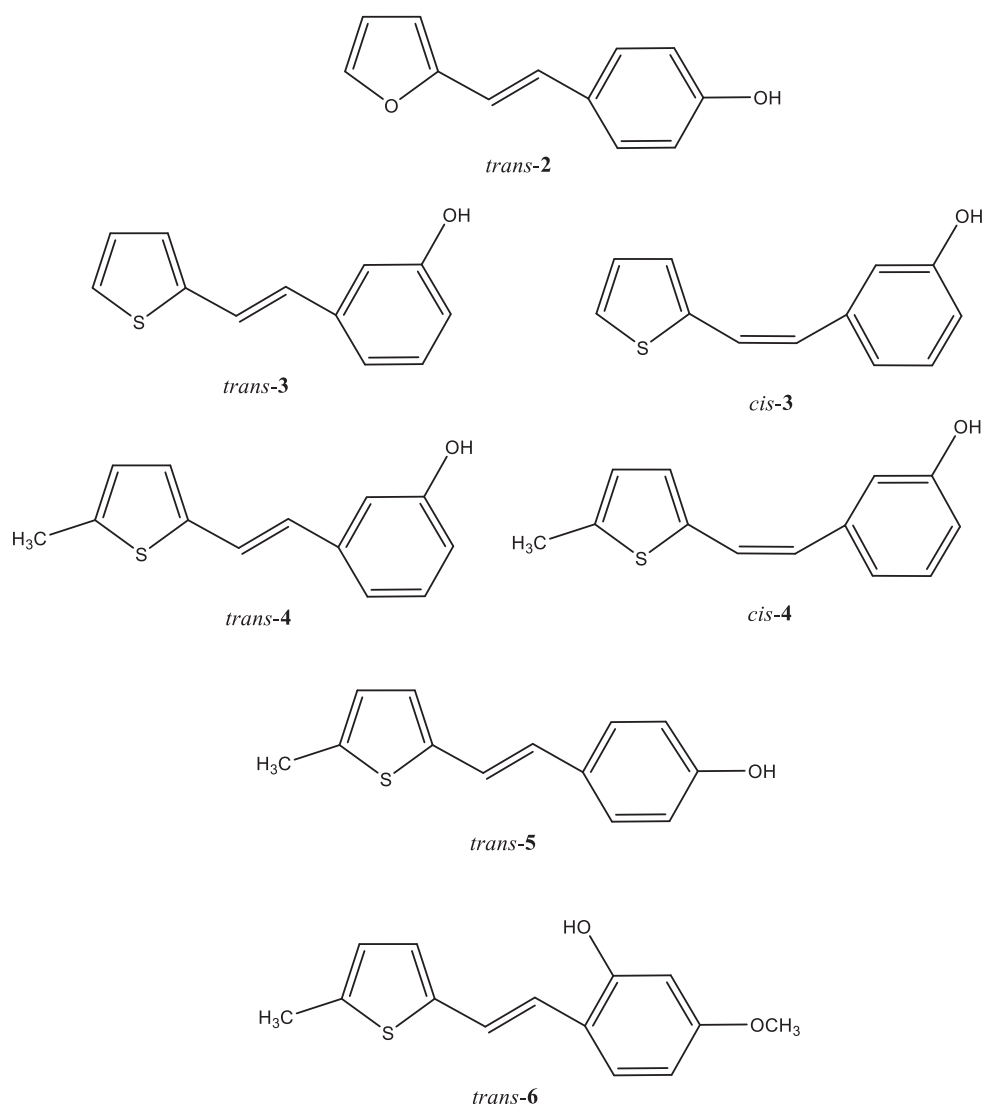
In vitro i *in vivo* eksperimentalni modeli pokazali su neuroprotektivni potencijal rezveratrola. U *in vitro* studijama dokazano je nekoliko važnih funkcija rezveratrola. Može disregulirati metal-ionsku izmjenu (bakar, cink, željezo), a igra ključnu ulogu kod procesa neurodegeneracije koja je povezana s promjenama u radu stanice i disfunkcijom neurona. Metalni ioni vežu $\text{A}\beta$ i neurofibrilarne čvorove te pospješuju njihovo nakupljanje, poboljšavaju proizvodnju ROS-a i doprinose patogenezi AD-a. Rezveratrol je odgovoran za poboljšanje afiniteta vezanja između SIRT-1 i supstrata te se pokazao i kao snažan aktivator enzima AMPK. Aktivacija AMPK bila je moguća, neovisno o SIRT-1 i omogućila je smanjenje acetiliranja PGC-1 α [40]. Istraživanja su pokazala da aktivacija sirtuina, posebice SIRT-1, može zaštititi neurone od apoptoze, upale i oksidativnog stresa. Zahvaljujući tome, ovi bi enzimi mogli biti nove mete za liječenje neuroloških poremećaja, kao što su moždani udar, Alzheimerova i Parkinsonova bolest [41]. U *in vivo* studijama, neuroprotektivno svojstvo koje se pripisuje rezveratrolu je supresija stvaranja ROS-a putem inhibicije prooksidativnih gena, tj. nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat-oksidade. Neuroprotektivno djelovanje rezveratrola uključuje supresiju inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS), koja ima ulogu u $\text{A}\beta$ -induciranoj lipidnoj peroksidaciji i regulaciji HO-1, štiteći tako štakore od $\text{A}\beta$ -inducirane neurotoksičnosti. Također, rezveratrol je izazvao ekspresiju različitih antioksidativnih enzima poput superoksid-dismutaze (SOD), katalaze, tioredoksina i glutation-peroksidaze. Oralna primjena rezveratrola kod miševa smanjila je nakupljanje $\text{A}\beta$ u korteksu zbog

aktivacije AMPK povećanjem citosolnih razina Ca^{2+} u neuronskim kulturama. Rezveratrol, u dozi od 200 mg/kg/dan tijekom osam dana, može djelovati kao adjuvantna terapija kod AD-a nakon transplatacije ljudske matične stanice iz pupkovine. To se dogodilo kao posljedica povećane ekspresije moždanog neurotrofnog čimbenika (BDNF), faktora rasta neurona (NGF) i neurotrofina 3 (NT-3). Pretjerana ekspresija tih čimbenika povezana je sa sposobnošću rezveratrola da poveća aktivnost SIRT-1 [40].

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uvod

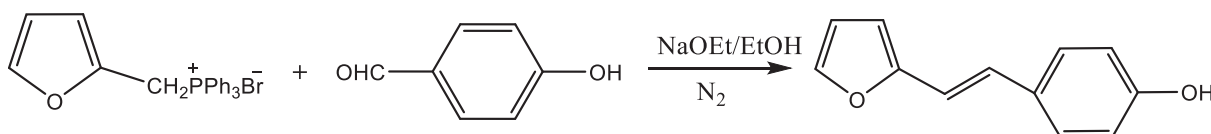
U našem je laboratoriju u okviru ovoga rada sintetiziran niz rezveratrolnih derivata koji se razlikuju po položaju i broju supstituenata na benzenskom i heteroaromatskom prstenu. Produkti nastali Wittigovom reakcijom iz fosfonijeve soli **1** i odgovarajućih aldehida većinski su *trans*-izomeri, što je energijski povoljnije. Provedena su razna biološka ispitivanja njihove antioksidacijske aktivnosti na vanjskoj instituciji. Dobiveni spojevi **2-6** prikazani su na Slici 1.



Slika 1. Novi rezveratrolni derivati

3.2. Sinteza i spektroskopska svojstva (*E*)-4-(2-(furan-2-il)vinil)fenola **2**

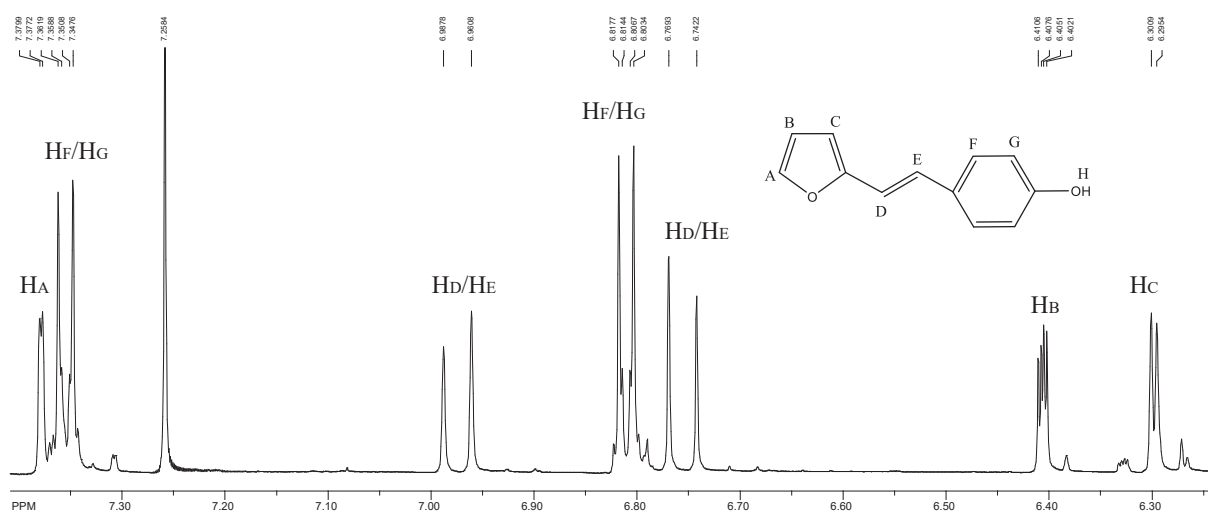
Spoj (*E*)-4-(2-(furan-2-il)vinil)fenola **2** sintetiziran je Wittigovom reakcijom, čiji je mehanizam detaljno opisan u općem dijelu završnog rada (poglavlje 2.1.1.; Wittigova reakcija). Reakcija prethodno pripravljene furanske soli i *p*-hidroksibenzaldehida, uz natrijev etoksid i dušik, provodila se 48 sati. Dobivena je smjesa u kojoj prevladava *trans*-izomer, a reakcija je prikazana na Shemi 1.



Shema 1. Sinteza (*E*)-4-(2-(furan-2-il)vinil)fenola **2**

Produkt je pročišćen postupkom ekstrakcije, a *trans*-izomer odijeljen je kromatografijom na koloni punjenoj silikagelom, gdje je kao eluens korišten sustav petroleter/eter promjenjiva omjera. Također, provedena je i tankoslojna kromatografija na pločici od silikagela u sustavu otapala petroleter/eter te preparativna tankoslojna kromatografija u svrhu dobivanja što čistijeg završnog produkta. Struktura *trans*-izomera potvrđena je spektroskopskim metodama. Snimljen je ¹H NMR spektar prethodno pročišćenog spoja.

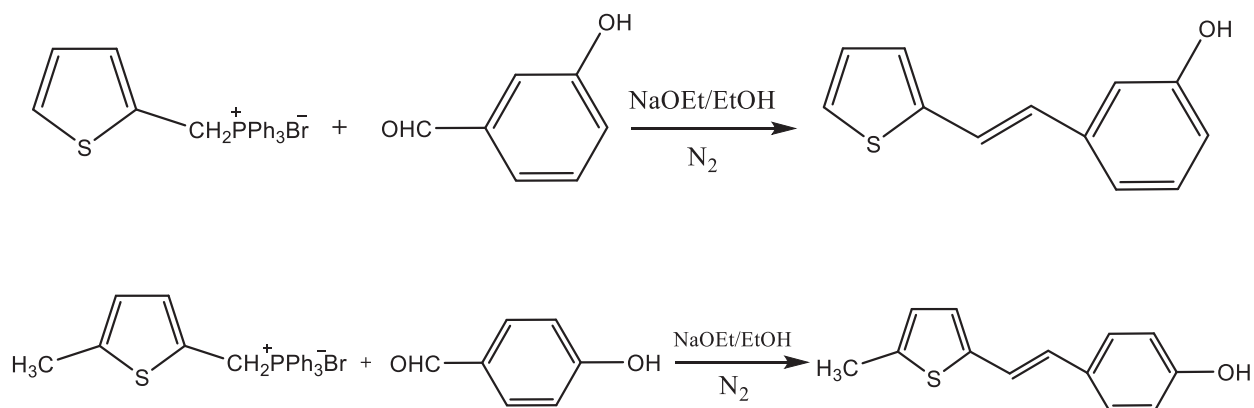
Na Slici 2. prikazani su signali za etenske, furanske i aromatske protone *trans*-izomera spoja **2**. Ono što se najprije primijeti su karakteristični signali za protone dvostruke veze, H_D/H_E. Jedan se proton nalazi na 6,97 ppm, a drugi na 6,76 ppm. Konstantna sprege od 16,2 Hz odnosno 16,3 Hz govori da se zaista radi o *trans*-izomeru spoja **2**. Dubleti na 7,34 ppm s konstantom sprege od 8,6 Hz i 6,80 ppm s konstantom sprege od 8,8 Hz odgovaraju aromatskim protonima H_F/H_G. Već prema obliku signala može se zaključiti da je aromatski prsten *para*-supstituiran. Dublet-dubleta H_B i dublet H_C najmanjeg su kemijskog pomaka (6,40 ppm i 6,30 ppm), dok je dublet H_A odsjenjen na 7,38 ppm. Razlog tako jakog odsjenjenja dubleta H_A je utjecaj atoma kisika. Konstante sprege dublet-dubleta H_B iznose 3,3 Hz i 1,8 Hz, a upravo te vrijednosti potvrđuju da se radi o furanskom prstenu. Na 8,10 ppm nalazi se karakteristični singlet za OH-skupinu koji je ujedno i najodsjenjeniji signal spektra.



Slika 2. ^1H NMR spektar spoja 2

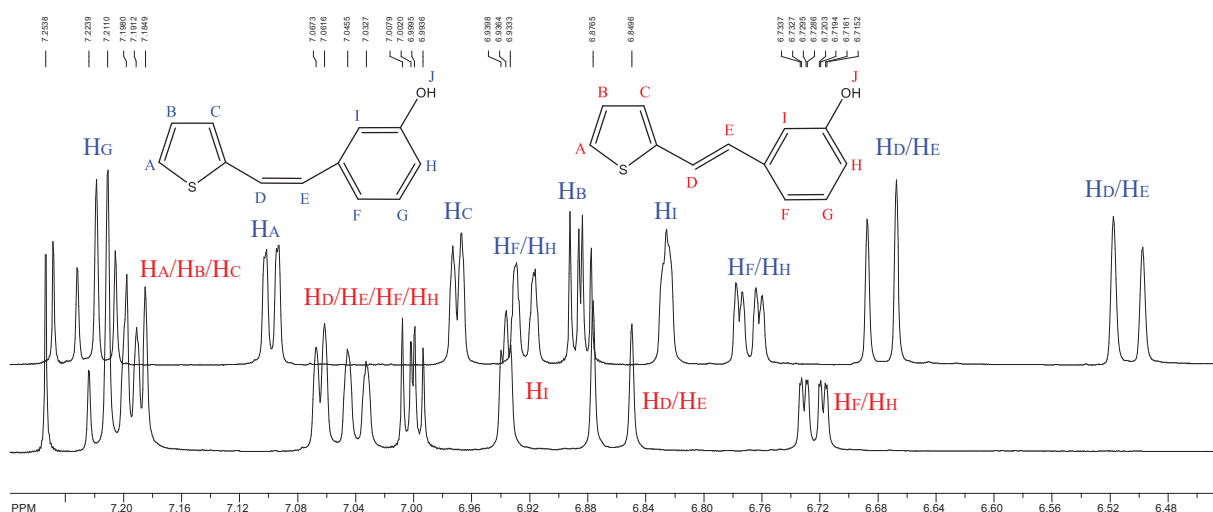
3.3. Sinteza i spektroskopska svojstva tiofenskih derivata rezveratrola 3-6

Spojevi 3-6 sintetizirani su Wittigovom reakcijom, gdje tiofenska sol (nesupstituirana i metil-supstituirana 1) reagira s pripadajućim aldehidom i time tvori tiofenski derivat rezveratrola. Reakcija se provodi u struji dušika i u prisutnosti natrijeva etoksida. Shema 2. prikazuje sintezu tiofenskih derivata s nesupstituiranom i metil-supstituiranom tiofenskom soli.



Shema 2. Sinteza tiofenskih derivata

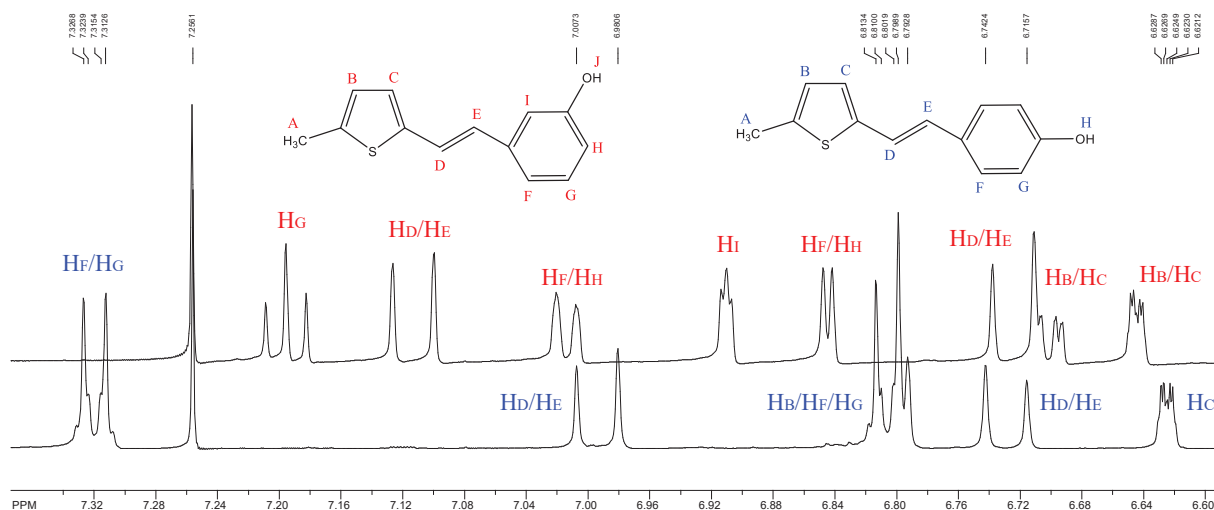
Dobivena je smjesa *cis*- i *trans*-izomera koja je najprije pročišćena postupkom ekstrakcije, a zatim su izomeri odvojeni kromatografijom na koloni napunjenoj silikagelom. Kao eluens korištena je smjesa petroletera i etera promjenjiva omjera. Ista smjesa otapala korištena je i kod tankoslojne kromatografije te kod preparativne tankoslojne kromatografije, a čija je nepokretna faza također silikagel. Strukture oba izomera potvrđene su spektroskopskim metodama te su snimljeni ^1H i ^{13}C NMR spektri.



Slika 3. ^1H NMR spektri *cis*- i *trans*-izomera spoja **3**

Slika 3. prikazuje usporedbu *cis*- i *trans*-izomera spoja **3**. Prva stvar koja se primijeti je različiti broj pikova zbog različitih spreznja među protonima. Signali za etenske protone *cis*-izomera karakterističog su izgleda i zasjenjeniji su od signala *trans*-izomera, kod kojeg je došlo do preklapanja s aromatskim protonima. Etenski su protoni *cis*-izomera dubleti na 6,50 i 6,67 ppm s konstantama sprege od 12,0 odnosno 12,1 Hz, a *trans*-izomer ima na 6,86 ppm dublet s konstantom sprege od 16,2 ppm. Drugi dublet nije moguće sa sigurnošću potvrditi jer se nalazi u području u kojem se nalaze i signali za aromatske protone H_F/H_G i zato se u području od 7,08-7,02 ppm nalazi multiplet 2H koji odgovara etenskim protonima te aromatskim protonima H_F/H_G . Singlet koji odgovara protonu H_I malo je odsjenjeniji kod *trans*-izomera i nalazi se na 6,94 ppm, dok se kod

cis-izomera nalazi na 6,82 ppm. Sprezanja u tiofenskom prstenu vidljiva su isključivo kod *cis*-izomera. Na 6,88 ppm nalazi se signal za proton B, dublet-dubleta s karakterističnim konstantanama sprege od 5,1 odnosno 3,7 Hz, a dubleti H_A i H_C odsjenjeniji su zbog utjecaja atoma sumpora i dvostruke veze te se nalaze na 7,10 odnosno 6,97 ppm. S druge strane, signali protona tiofenskog prstena kod *trans*-izomera ne odgovaraju signalima *cis*-izomera. Između 7,23 i 7,16 ppm nalazi se multiplet 3H koji predstavlja signal za tiofenske protone. Aromatski se protoni H_F/H_G kod *trans*-izomera sprežu s etanskim protonima, kao što je u tekstu prije spomenuto. Osim toga, na 6,72 ppm nalazi se dublet s konstantom sprege od 8,2 Hz, koja odgovara upravo protonima F i G. Signali H_F/H_G kod *cis*-izomera tipični su dubleti, jedan na 6,76 ppm s konstantom sprege od 8,1 Hz i drugi na 6,92 ppm s konstantom sprege od 7,8 Hz. Na Slici 2. također se primjećuje triplet 1H na 7,00 ppm kod *trans*-izomera koji odgovara protonu G, dok poprilično odsjenjen dublet na 7,22 ppm odgovara signalu H_G kod *cis*-izomera. Sve navedene razlike među izomerima rezultat su njihove konfiguracije i prisutnih steričkih smetnji zbog kojih se javljaju netipična sprezanja među protonima. Postoji još jedna zanimljiva razlika, a ona se tiče singleta koji odgovara hidroksilnoj skupini. Naime, na 7,99 ppm kod *cis*-izomera spoja **3** nalazi se karakterističan prošireni singlet OH-skupine. Zanimljivo je da kod *trans*-izomera taj singlet uopće nije vidljiv.



Slika 4. ¹H NMR spektri *trans*-izomera spoja **4** i **5**

U ^{13}C spektru *cis*-izomera spoja **3** vidi se jedanaest signala, od kojih se većina nalazi u aromatskom području od 120 do 130 ppm. Tri najodsjenjenija signala slabijeg su intenziteta i odgovaraju kvaternim ugljicima, tako da onaj na 155,6 ppm predstavlja ugljik na koji je vezana hidroksilna skupina. Dva signala između 114 i 116 ppm pripadaju ugljicima dvostruke veze. *Trans*-izomer spoja **3** sadrži dvanaest signala nešto manjeg intenziteta, a najviše su rasprostranjeni u aromatskom području. Vidljiva su tri od prije spomenuta kvaterna ugljika i signali za etenske ugljike.

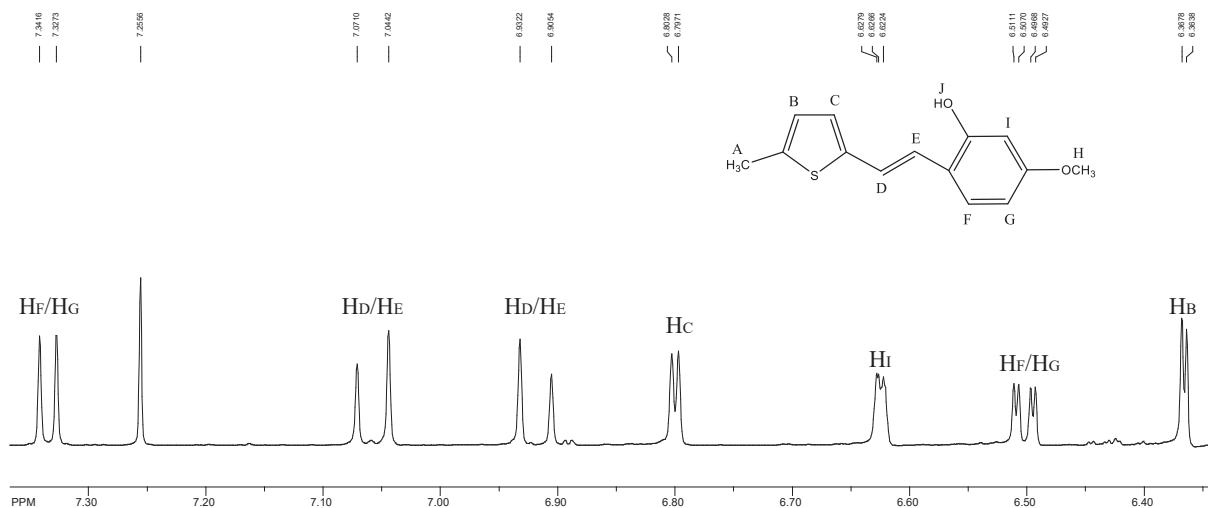
Druga usporedba napravljena je između *trans*-izomera spoja **4** i **5** koji se razlikuju isključivo po položaju hidroksilne skupine (Slika 4). Spektar spoja **5** sadrži manje signala od spektra spoja **4** zbog *para* položaja hidroksilne skupine. Najodsjenjeniji signal spoja **5** nalazi se na 7,32 ppm i pripada protonima F i G, čija je konstanta sprege 8,6 Hz. Drugi signal aromatskih protona nalazi se na 6,80 ppm, ali se preklapa sa signalom protona B stvarajući tako multiplet 3H. Etenski protoni daju dva karakteristična dubleta, jedan odsjenjeniji na 7,00 ppm i drugi na 6,73 ppm. Konstanta sprege od 16,0 Hz potvrđuje *trans*-oblik molekule. Tiofenski proton C pod utjecajem je dvostruke veze i daje dublet na 6,62 ppm s karakterističnom konstantom sprege od 3,5 Hz.

Signal s najmanjim kemijskim pomakom kod oba spoja nalazi se u alifatskom području koje je pod velikim utjecajem primjenjenog magnetskog polja. Metilni protoni daju singlet s integralom 3H, koji se kod spoja **5** nalazi na 2,47 ppm, a kod spoja **4** na 2,48 ppm. Što se tiče spoja **4**, *meta* položaj hidroksilne skupine omogućuje veći broj različitih protona i time više mogućnosti sprezanja. Dubleti etenskih protona nalaze se na 7,11 i 6,72 ppm s jednakom konstantom sprege od 16,1 Hz, koja je dokaz *trans*-konfiguracije. Vrlo blizu nalaze se i dubleti tiofenskih protona B i C, točnije na 6,70 i 6,65 ppm s konstantama sprege od 2,5 odnosno 3,5 Hz. Ono što spoj **4** najviše razlikuje od spoja **5** su signali aromatskih protona. Protoni F i H čine dva dubleta kemijskih pomaka 7,01 i 6,85 ppm. Zanimljivo je da konstanta sprege dubleta na 6,85 ppm iznosi 3,5 Hz što nije nimalo očekivana vrijednost za aromatske protone, dok dublet na 7,01 ppm ima konstantu sprege od 7,7 Hz. Proton G prikazan je na spektru u obliku tripleta i nalazi se na 7,20 ppm te je ujedno i najodsjenjeniji signal u spektru. Posljednji aromatski proton je proton I koji daje prepoznatljiv singlet na 6,91 ppm. Ono što se poklapa kod oba spoja je nedostatak signala za hidroksilnu skupinu, koji je posljedica premale koncentracije uzorka.

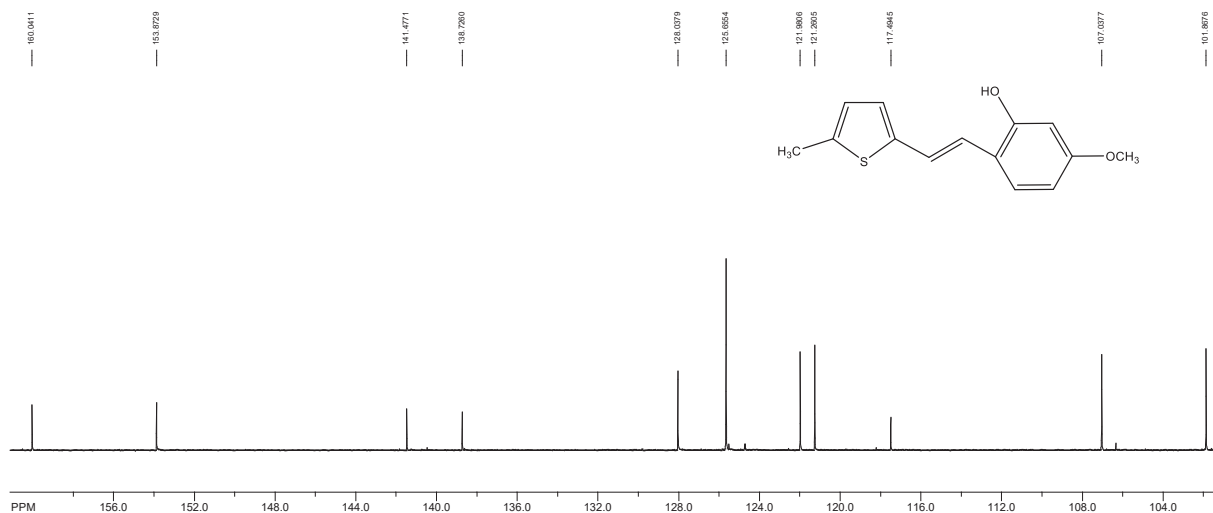
Spoj **4** izoliran je i u *cis*-konfiguraciji. Najodsjenjeniji signal odgovara aromatskom protonu G i daje triplet na 7,22 ppm. Karakteristični dubleti protona dvostruke veze nalaze se na 6,58 i 6,40

ppm s konstantom sprege od 12,0 Hz, koja odgovara *cis*-konfiguraciji. U području od 6,78 do 6,73 ppm nalazi se multiplet 2H koji odgovara tiofenskim protonima B i C. Dubleti na 6,93 i 6,53 ppm pripadaju aromatskim protonima F i H. Konstanta sprege dubleta na 6,53 ppm iznosi 3,5 Hz, što odstupa od standardne vrijednosti kao i u slučaju *trans*-izomera spoja **4**. Metilna skupina pod većim je utjecajem magnetskog polja pa se singlet 3H nalazi na 2,34 ppm.

Analizirajući ^{13}C spektre *cis*- i *trans*-izomera spoja **4** te spoja **5**, prvo što se primijeti je broj signala koji je za oba izomera spoja **4** jednak trinaest, a za spoj **5** dvanaest. Intenzitet signala u spektrima nije najbolji pokazatelj o kojim se ugljicima radi. Najodsjenjeniji signal kod sva tri spektra pripada upravo kvaternom ugljiku za koji je vezana hidroksilna skupina, a on se nalazi na oko 155,0 ppm. Promatrajući *cis*-izomer spoja **4** vidi se povećan broj signala u području od 120 do 130 ppm, točnije šest signala podjednakog intenziteta koji pripadaju području aromatskih ugljika. Također, u tom području nalazi se i signal za tiofenski ugljik. Slična situacija, ali s nešto slabijim intenzitetom signala nalazi se i kod *trans*-izomera. Pri nešto nižem kemijskom pomaku nalaze se dva signala kod oba izomera spoja **4**, koja bi prema literaturi pripadala ugljicima koji čine dvostruku vezu. Ostali signali pripadaju tiofenskom prstenu. Najzasjenjeniji signal kod sva tri spoja pripada zasigurno metilnoj skupini, a nalazi se na oko 15 ppm. Spoj **5** također sadrži pripadajuće signale za aromatski, tiofenski i etenski dio.



Slika 5. ^1H NMR spektar spoja *trans*-**6**



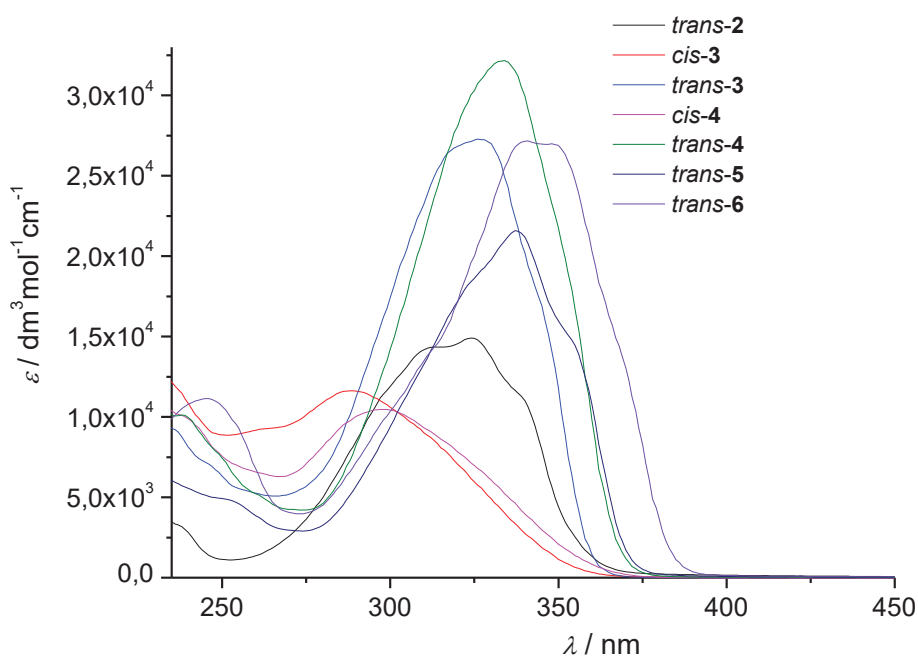
Slika 6. ^{13}C NMR spektar spoja *trans*-6

Spektroskopska analiza provedena je i za spoj **6** (Slika 5). Ukupan broj signala je devet, od kojih se sedam nalazi u aromatskom području. Dva karakteristična dubleta dvostruke veze nalaze se na 7,06 i 6,92 ppm, a konstante sprege od 16,2 odnosno 16,1 Hz potvrđuju da se radi od *trans*-konfiguraciji navedenog spoja. Aromatski protoni F i G daju dva dubleta, jedan poprilično odsjenjen (ujedno i najodsjenjeniji signal) na 7,33 ppm s konstantom sprege od 8,6 Hz te drugi na 6,50 ppm s konstantom sprege od 8,7 Hz. Preostala dva dubleta pripadaju tiofenskim protonima B i C, a singlet na 6,62 ppm odgovara protonu I. U alifatskom području nalaze se dva singleta s integralom 3H. Onaj većeg kemijskog pomaka pripada metoksidnoj skupini, a metilna skupina sa signalom na 2,47 ppm predstavlja najzasjenjeniji signal spoja *trans*-6.

U ^{13}C NMR spektru vidi se trinaest signala (Slika 6), od kojih su dva pomaknuta u viša polja i pripadaju metilnom te metoksidnom ugljiku. Dva najodsjenjenija signala pripadaju kvaternim ugljicima na koje su vezane hidroksilna i metoksidna skupina. Za druge signale ne može se sa sigurnošću reći koji signal pripada kojem ugljiku. Iz spektra je također vidljivo da ukupno ima pet kvaternih ugljika u strukturi.

3.4. UV spektrofotometrija

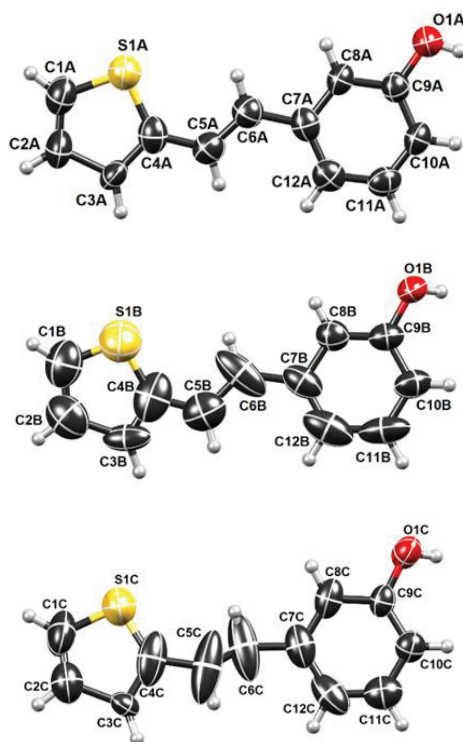
Za spojeve 2-6 snimljeni su UV spektri. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 7. Vidljivo je da *cis*-izomeri apsorbiraju UV zračenje pri nižim valnim duljinama za razliku od *trans*-izomera. Ono što se također zapaža je vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta koja je najveća za *trans-4* i iznosi $32165 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a najmanja za *cis-4* te iznosi $10474 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Primjećuje se izraziti hiperkromni pomak maksimuma apsorpcije spojeva s *trans*-konfiguracijom, posebno kod *trans-4* u odnosu na *trans-2* i *trans-5* izomere, dok batokromnog pomaka gotovo pa i nema. Batokromni pomak maksimuma blago je izražen kod spoja *trans-6* u odnosu na *trans-3*, a najizraženiji je kod izomera spojeva 3 i 4. Naime, *trans-3* izomer pokazuje izraziti batokromni i hiperkromni pomak maksimuma u odnosu na *cis-3* izomer, a ista se pojava zapaža i kod *trans-4* u odnosu na *cis-4* izomer.



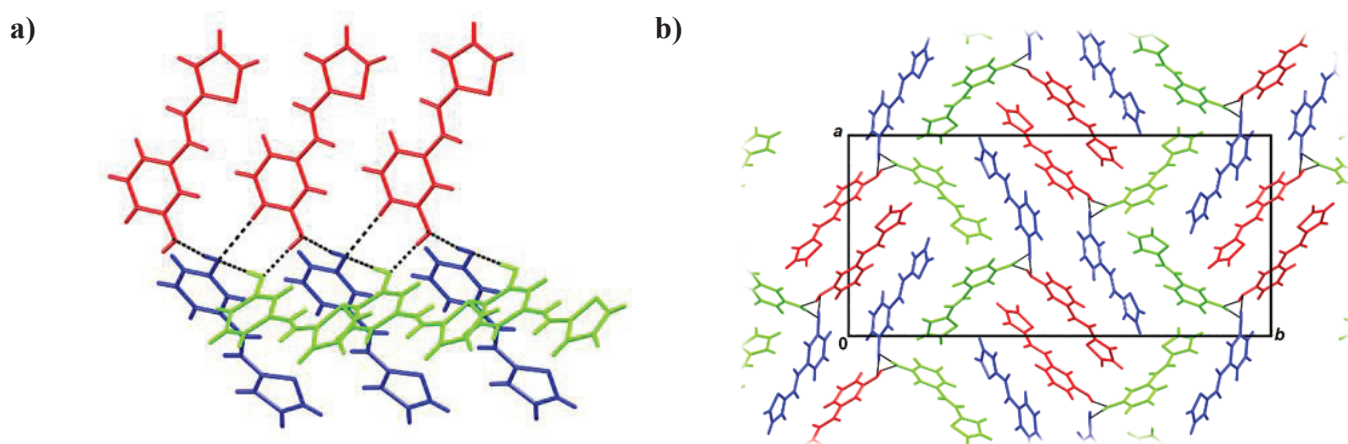
Slika 7. Usporedba UV spektara spojeva 2-6

3.5. Kristalna struktura spojeva *trans-3* i *trans-6*

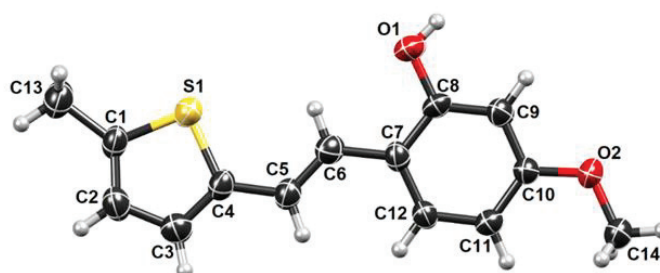
Spojevi *trans-3* i *trans-6* kristalizirani su te im je određena kristalna struktura. Asimetrična jedinica *trans-3* sastoji se od tri molekule ($Z=3$), koje su označene kao A, B i C te su prikazane na Slici 8. Hidroksilna skupina predstavlja donor protona, ali djeluje i kao proton-akceptor. Tri vodikove veze, neovisne o simetriji, povezuju molekule u lance paralelne s [001], a molekule su povezane u nizu ...ACB... (Slika 9.). Također, dvije slabe C-H...S vodikove veze povezuju spomenute paralelne lance (Tablica 1.). S druge strane, asimetrična jedinica spoja *trans-6* (Slika 10) sastoji se od jedne molekule koja je povezana sa svojim ekvivalentom simetrije jednom O-H...O vodikovom vezom (Tablica 1.). Na taj način nastaju cik-cak lanci paralelni s [100] (Slika 11.). Tu su prisutne samo disperzijske interakcije između lanaca [42].



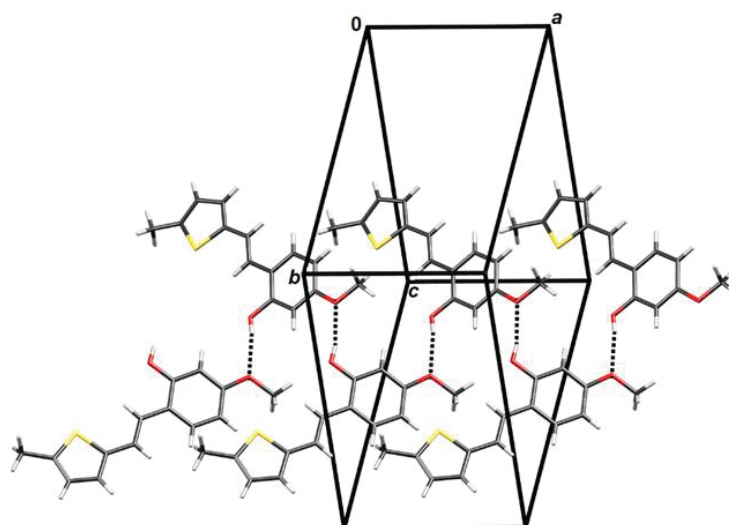
Slika 8. Prikaz tri simetrijski neovisne molekule spoja *trans-3* sa shemom numeriranja atoma. Elipsoidni pomaci prikazani su za vjerojatnost od 50 %, a vodikovi atomi kao kugle proizvoljnih radijusa [42].



Slika 9. Kristalno pakiranje *trans*-3: a) lanac povezan vodikovim vezama i b) pakiranje lanaca gledano u smjeru [001]. Molekula A prikazana je crvenom bojom, molekula B plavom, a molekula C zelenom bojom [42].



Slika 10. Prikaz molekule *trans*-6 sa shemom numeriranja atoma. Elipsoidni pomaci prikazani su za vjerojatnost od 50 %, a vodikovi atomi kao kugle proizvoljnih radijusa [42].



Slika 11. Lanac povezan vodikovom vezom u kristalnom pakiranju spoja *trans-6* [42].

Tablica 1. Geometrijski parametri vodikovih veza (Å, °) [42].

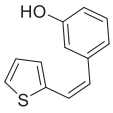
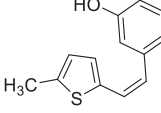
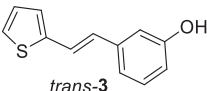
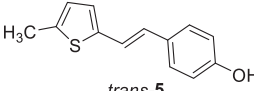
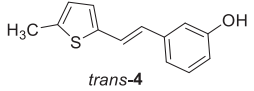
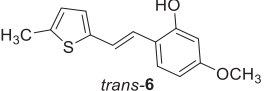
	$D-H /$ Å	$H \cdots A /$ Å	$D \cdots A /$ Å	$D-H \cdots A /$ °	Symm. op. on A
<i>trans-3</i>					
O1A–H1D \cdots O1C	0.82	1.91	2.667(8)	154	x, y, z
O1B–H1E \cdots O1A	0.82	1.90	2.710(9)	171	$x, y, 1-z$
O1C–H1F \cdots O1B	0.82	1.86	2.681(8)	173	x, y, z
C6A–H6A \cdots S1A	0.93	2.80	3.197(9)	107	x, y, z
C6B–H6B \cdots S1B	0.93	2.77	3.181(16)	108	x, y, z
<i>trans-6</i>					
O1–H1 \cdots O2	0.82	2.09	2.876(7)	161	$-1/2+x, 3/2-y, 1-z$

3.6. Antioksidacijska aktivnost i inhibicija kolinesteraze novih derivata rezveratrola

Šest tiofenskih derivata procijenjeno je na antioksidacijsku aktivnost (AOA) pomoću dvije metode (DPPH i CUPRAC test) i mogućnost inhibicije acetilkolinesteraze (AChE) te butirilkolinesteraze (BChE) [42].

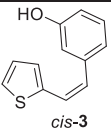
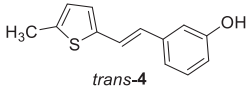
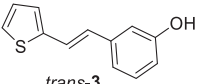
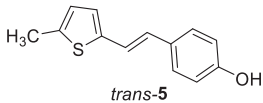
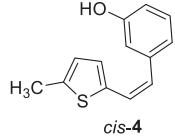
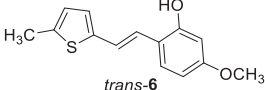
Rezultati istraživanja antioksidacijskog djelovanja otkrili su nekoliko novih jakih antioksidansa (Tablica 2). U DPPH testu smanjenje adsorpcije DPPH radikala prati se u prisutnosti testiranih spojeva i ako se postigne više od 50 % gašenja radikala, izračuna se koncentracija spoja potrebna za pola maksimalne redukcije (IC₅₀). Najaktivniji se pokazao spoj *trans*-6. Prisutnost *ortho*-OH i *para*-OCH₃ skupina pokazala se kao najbolja kombinacija u antioksidacijskoj reakciji. Također, neki monosupstituirani fenolni derivati pokazali su odličnu do vrlo dobru antioksidacijsku aktivnost, a istaknuli su se spojevi *cis*-3 i *trans*-3. Općenito, antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva ovisi o svojstvima hidroksilne skupine i mogućnosti elektronske delokalizacije. Broj i položaj OH-skupina te tip prisutnog heterocikla utječu na učinkovitost antioksidacije. Osim toga, cjelokupna 3D struktura može imati utjecaja na antioksidacijsko djelovanje [42].

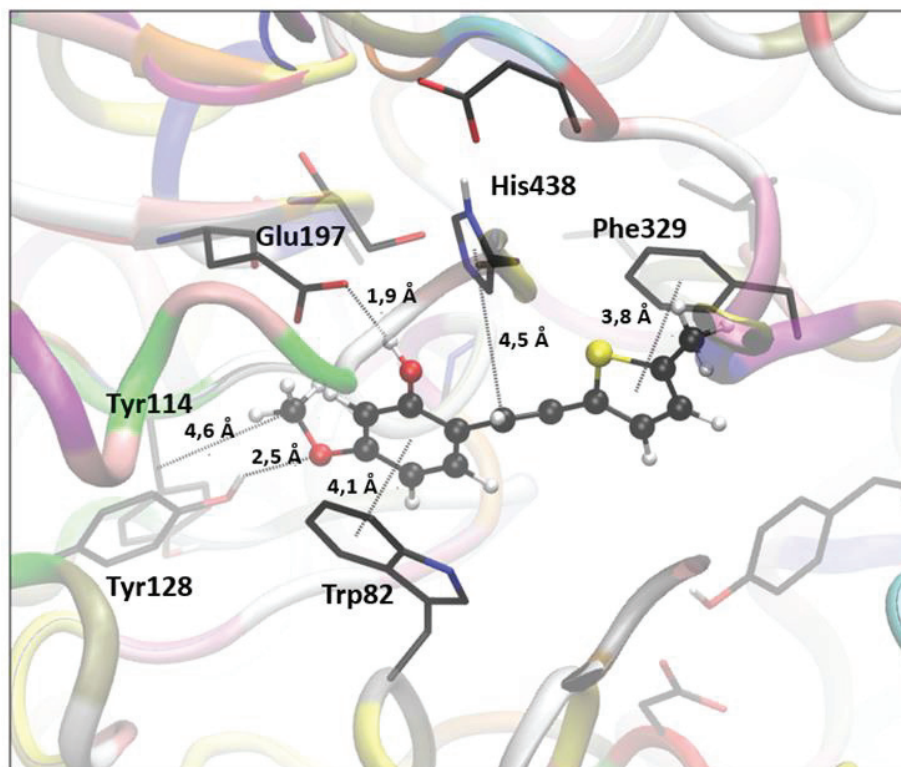
Tablica 2. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti za DPPH metodu i CUPRAC metodu sintetiziranog spoja [42]

Compound	DPPH IC ₅₀ (μM)	Cuprac mol TE/mol of compound	Compound	DPPH IC ₅₀ (μM)	Cuprac mol TE/mol of compound
 <i>cis</i> -3	101.0	0.6731	 <i>cis</i> -4	-	0.1128
 <i>trans</i> -3	82.3	0.7503	 <i>trans</i> -5	416.3	0.7540
 <i>trans</i> -4	126.8	0,5640	 <i>trans</i> -6	28.6	1.0029

Kod određivanja biološke aktivnosti sintetiziranih stilbena kao inhibitora AChE i BChE modificiranom metodom po Ellmanu, spojevi su testirani u širokom rasponu koncentracija te ukoliko je inhibicija bila veća od 50 %, izračunata je vrijednost IC₅₀ (Tablica 3). Ono što se zna je da su najjači antioksidansi ujedno i najjači inhibitori, a to je u skladu s činjenicom da se derivati rezveratrola mogu povezati s mehanizmom koji je uključen u patologiju Alzheimerove bolesti putem antioksidacijskog djelovanja. Većina ispitanih tiofena pokazala je inhibicijsko djelovanje i to radije na BChE nego na AChE. Spojevi *cis-3*, *trans-3*, *cis-4*, *trans-4* i *trans-6* inhibirali su oba enzima, a među njima najbolje su vrijednosti postigli *trans-4* i *trans-6*. O utjecaju metilne skupine na aktivnost teško je previše reći, ali ono što se uočava je povećanje selektivnosti prema BChE kod *trans-5*. S druge strane, spoj *trans-6* u ovoj strukturnoj modifikaciji protivi se tom pravilu i dolazi do povećanja aktivnost prema AChE. Tip heterocikla i supstituent prisutan na njemu puno više utječu na biološku aktivnost nego tip i položaj supstituenta na fenolnom dijelu [42].

Tablica 3. Izračunate IC₅₀ vrijednosti za inhibiciju eeAChE i eqBChE sintetiziranim spojevima [42]

Compound	IC ₅₀ (μM) eeAChE	IC ₅₀ (μM) eqBChE	Compound	IC ₅₀ (μM) eeAChE	IC ₅₀ (μM) eqBChE
 <i>cis-3</i>	194.0	112.0	 <i>trans-4</i>	51.2	40.9
 <i>trans-3</i>	618.0	116.6	 <i>trans-5</i>	-	65.0
 <i>cis-4</i>	432.0	575.7	 <i>trans-6</i>	95.8	4.5



Slika 12. Struktura aktivnog mjesta BChE u kompleksu s molekulom *trans*-6, dobivena metodom molekuskog dockinga. Atomi vodika prikazanih aminokiselina nisu prikazani radi preglednosti. Udaljenosti su izražene u angströmima, Å (1 Å = 10⁻¹⁰ m, odnosno 100 pm).

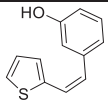
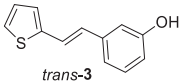

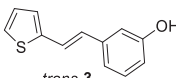


Molekula *trans*-6 u aktivnom mjestu BChE ostvaruje niz stabilizirajućih nekovalentnih međudjelovanja s prisutnim aminokiselinama, čime dolazi do sprečavanja ulaska supstrata i inhibicije enzimskog djelovanja. Na slici 1 prikazana je struktura kompleksa između molekule *trans*-6 i aktivnog mjesta, što omogućava uvid u spomenute stabilizirajuće interakcije. Fenilna jezgra liganda ostvaruje π - π slaganje s triptofanom (Trp82) koji spada u anionsku domenu aktivnog mjesta, dok tiofenski prsten prisutan u ligandu stupa u sličnu interakciju s obližnjim fenilalaninom (Phe329). Dvostruka veza između ugljikovih atoma smještena je tako da njeni π elektroni ulaze u interakciju s histidinom, koji inače čini tzv. katalitičku trijadu (Ser, Glu, His), domenu aktivnog mjesta kolinesteraza u kojoj dolazi do kovalentnog vezanja supstrata. Metilna skupina na metoksi-supstituentu liganda stupa u hidrofobno međudjelovanje s tirozinom koji pripada perifernom anionskom mjestu (Tyr114), a vodik hidroksilne skupine liganda stvara jaku vodikovu vezu s glutamatom, Glu197. Opažena je i jedna slabija vodikova veza, između kisikovog

atoma metoksi skupine liganda i tirozina (Tyr128). Treba naglasiti da je nepovoljan kut $H_{\text{Tyr}}-O_{\text{OMe}}$ kod ovog H-mosta posljedica toga što je molekularni docking napravljen uz fiksiranu strukturu enzima te se može pretpostaviti da se u stvarnosti događa povoljnija uzajamna orijentacija ovih atoma.

3.7. Genotoksičnost

U procesu farmaceutskog razvoja važno je identificirati i, što je više moguće, izolirati ili sintetizirati sve nečistoće koje mogu biti prisutne u aktivnom farmaceutskom spoju (API) ili lijeku. Sve nečistoće koje su teoretski prisutne u API-u, kao i u svakom intermedijeru u koracima proizvodnog procesa, također se moraju procijeniti, barem s *in silico* modelima. U okviru nečistoća ljekovitih supstanci i proizvoda, postoji posebna kategorija, a to su moguće mutagene/kancerogene nečistoće. One su strože regulirane i moraju se kontrolirati na mnogo nižim granicama od svih ostalih nečistoća. Propis koji se primjenjuje za ove vrste spojeva je ICH M7 smjernica, a razine koje mogu biti prisutne u ljekovitoj supstanci ili ljekovitom proizvodu moraju se izračunati pojedinačno za svaki identificirani PMI (mogući mutageni spoj) na temelju njihovih prihvatljivih dnevnih unosa (AI) i maksimalne dnevne doze lijeka (MDD). Ukoliko AI nije utvrđen toksikološkim studijama na životinjama, tada se poduzima najkonzervativniji pristup s najstrože pretpostavljenim AI opisan u smjernici. Uobičajeno je da će se s razvojem novih ljekovitih supstanci i proizvoda pojaviti nečistoće koje su također novi spojevi, za koje neće biti dostupni eksperimentalni podaci u bazama podataka. U takvim je slučajevima ključan Q(SAR) pristup. Q(SAR) modeli predviđaju biološku aktivnost na temelju strukturnih komponenti. Ovaj se pristup može koristiti i za određivanje mutagenog potencijala tijekom ranih faza potrage za potencijalno aktivnim ljekovitim supstancama. Alat koji se najčešće koristi u tu svrhu je softver Lhasa jer sadrži dva komplementarna modela, od kojih se jedan bazira na pravilima, a drugi na statistici. Dva spoja identificirana su na temelju Sarinih predviđanja. Sara je model temeljen na pravilima, što znači da ju je obučavao algoritam. Za spojeve *cis-3* i *trans-3* Derek ne predviđa mutagenost tih spojeva, dok Sara smatra da su ti spojevi možda pozitivni. Ako se pokaže da su ti spojevi visoko biološki aktivni, može se provesti AMES test kako bi se utvrdilo je li mutageni potencijal stvaran [42].

Tablica 4. Spojevi s pozitivnim mutagenim potencijalom prema procjeni Lhasa M7 [42]

Structure	ICH M7 Class	Cohort of Concern	Derek Prediction	Sarah Prediction	Experimental Data	Similarity to API	Overall In Silico
 <i>cis-3</i>	Class 3	No			Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Positive
 <i>trans-3</i>	Class 3	No			Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Positive

3.8. Fizikalno-kemijska svojstva

Odnos struktura-svojstvo (SAR) [43] analiziran je za sintetizirane spojeve u ovome radu. Fizikalno-kemijska svojstva i svojstva ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam i eliminacija) također su izračunata pomoću besplatnih softvera Molinspiration Cheminformatics (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) [44] i Pass online (Way 2 Drug, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>) [45] kako bi nam dali vrijedne podatke i novi smjer za daljnju sintezu.

Temeljna fizikalno-kemijska svojstva lijekova za središnji živčani sustav povezana su s njihovom sposobnošću prodiranja kroz krvno-moždanu barijeru (BBB) i ispoljavanja aktivnosti u središnjem živčanom sustavu. Lipofilnost je vrlo važna u proučavanju lijekova za CNS i većina njih ima logP vrijednosti manje od 5 [43], što znači da mogu lako prijeći krvno-moždanu barijeru. Ako je logP vrijednost aktivnih spojeva manja od 0, to će pogodovati hidrofilnim odjeljcima u tijelu, poput krvnog seruma.

Korištenjem besplatnog softvera Molinspiration Cheminformatics [44] za predviđanje svojstava ADME, uočeno je da svi sintetizirani spojevi imaju optimalne log P vrijednosti. Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da spojevi imaju i vrlo dobar potencijal prolaska kroz BBB aktivnom difuzijom (vrijednosti za CNS u podacima ispod).

Threshold templates:

Save Save As...

PhysChem Profiling

LogP	3,21	Optimal
Mw	186,21	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	2	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0,3 mg/ml	Soluble

ADME Profiling

Caco-2	Pe = 168E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	89%	Strongly bound
CNS	Score = -2,09	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0,46	Undefined

Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0,29	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0,53	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0,41	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0,50	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0,42	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0,44	Undefined
Ames	0,59	Undefined
hERG	0,41	Undefined

LogP

Chemical structure: Oc1ccc(cc1)/C=C/c2ccoc2

Threshold templates:

Save Save As...

PhysChem Profiling

LogP	3,62	Optimal
Mw	202,27	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	1	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0,16 mg/ml	Soluble

ADME Profiling

Caco-2	Pe = 155E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	89%	Strongly bound
CNS	Score = -2,05	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0,46	Undefined

Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0,28	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0,59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0,44	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0,43	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0,36	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0,46	Undefined
Ames	0,50	Undefined
hERG	0,45	Undefined

LogP

Chemical structure: Oc1ccc(cc1)/C=C/c2ccsc2

Threshold templates: Default

Save Save As...

PhysChem Profiling

LogP	3.62	Optimal
MW	202.27	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	1	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0.16 mg/ml	Soluble

ADME Profiling

Caco-2	Pe = 155E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	89%	Strongly bound
CNS	Score = -2.05	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0.46	Undefined

Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0.28	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0.59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0.44	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0.43	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0.36	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0.46	Undefined
Ames	0.50	Undefined
HERG	0.45	Undefined

LogP

Chemical structure: Oc1ccc(cc1)/C=C/c2ccsc2

Threshold templates: Default

Save Save As...

PhysChem Profiling

LogP	3.62	Optimal
MW	202.27	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	1	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0.16 mg/ml	Soluble

ADME Profiling

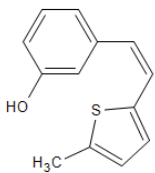
Caco-2	Pe = 155E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	89%	Strongly bound
CNS	Score = -2.05	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0.46	Undefined


Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0.28	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0.59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0.44	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0.43	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0.36	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0.46	Undefined
Ames	0.50	Undefined
hERG	0.45	Undefined

LogP

Chemical structure: Oc1ccc(cc1)/C=C/c2ccsc2





Threshold templates:

PhysChem Profiling


LogP	3.87	Optimal
MW	216.30	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	1	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0.02 mg/ml	Insoluble

ADME Profiling

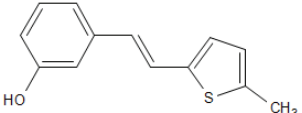
Caco-2	Pe = 142E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	88%	Strongly bound
CNS	Score = -2.01	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0.47	Undefined


Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0.30	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0.59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0.47	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0.50	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0.46	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0.51	Undefined
Ames	0.62	Undefined
hERG	0.46	Undefined

LogP 

<= -2.00 ■ Very hydrophilic
 -2.00..-1.00 ■ Hydrophilic
 -1.00..4.20 ■ Optimal
 4.20..5.00 ■ Lipophilic
 > 5.00 ■ Very lipophilic





Threshold templates:

PhysChem Profiling


LogP	3.87	Optimal
MW	216.30	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	1	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0.02 mg/ml	Insoluble

ADME Profiling

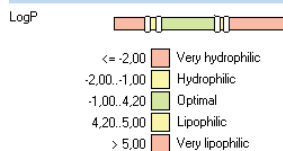
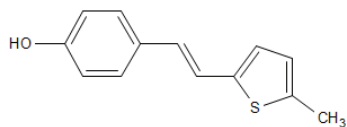
Caco-2	Pe = 142E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	88%	Strongly bound
CNS	Score = -2.01	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0.47	Undefined

Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0.30	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0.59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0.47	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0.50	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0.46	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0.51	Undefined
Ames	0.62	Undefined
hERG	0.46	Undefined

LogP 

<= -2.00 ■ Very hydrophilic
 -2.00..-1.00 ■ Hydrophilic
 -1.00..4.20 ■ Optimal
 4.20..5.00 ■ Lipophilic
 > 5.00 ■ Very lipophilic



Threshold templates:

Save Save As...

PhysChem Profiling

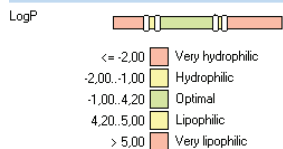
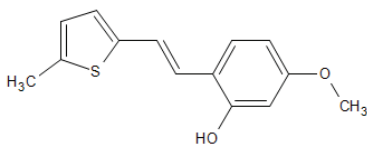
LogP	3,88	Optimal
MW	216,30	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	1	Good
Rot. Bonds	2	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0,02 mg/ml	Insoluble

ADME Profiling

Caco-2	Pe = 142E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	88%	Strongly bound
CNS	Score = -2,01	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0,47	Undefined

Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0,30	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0,59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0,43	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0,50	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0,46	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0,50	Undefined
Ames	0,62	Undefined
hERG	0,46	Undefined



Threshold templates:

Save Save As...

PhysChem Profiling

LogP	4,06	Optimal
MW	246,33	Good
H-Donors	1	Good
H-Acceptors	2	Good
Rot. Bonds	3	Good
Rings	2	Good
Lipinski	0 violations	Good
Lead-like	0 violations	Good
Solubility	0,02 mg/ml	Insoluble

ADME Profiling

Caco-2	Pe = 130E-6 cm/s	Highly permeable
PPB	88%	Strongly bound
CNS	Score = -2,01	Penetrant
HIA	100%	Highly absorbed
Metabolic Stability	0,49	Undefined

Drug Safety Profiling

P-gp Substrates	0,32	Non-substrate
CYP1A2 Inhibitor	0,59	Undefined
CYP2C9 Inhibitor	0,40	Undefined
CYP2C19 Inhibitor	0,52	Undefined
CYP2D6 Inhibitor	0,47	Undefined
CYP3A4 Inhibitor	0,49	Undefined
Ames	0,54	Undefined
hERG	0,33	Non-inhibitor

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Sva kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama različitih promjera i duljina punjenim silika-gelom i na pločicama presvučenim tankim slojem silika-gela. Korištena otapala očišćena su destilacijom, nisu opasna po ljudsko zdravlje i pravilno su odlagana u odgovarajuće spremnike. Za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće korištene su nuklearna magnetska rezonancija (^1H i ^{13}C NMR) i ultraljubičasta spektrofotometrija (UV). Spektri ^1H i ^{13}C snimljeni su instrumentom Bruker Avance 600 na 600 MHz za ^1H spektre odnosno 150 MHz za ^{13}C spektre. Otapalo za snimanje NMR spektara je deuterirani kloroform, CDCl_3 , a unutarnji standard je tetrametilsilan, TMS. Kemijski pomaci izraženi su mjernom jedinicom ppm (*engl.* parts per milion). UV spektri snimljeni su na UV/VIS spektrofotometru u acetonitrilu. Kratica PE/E se koristi za smjesu petroletera i dietiletera.

4.2. Sinteza 2-metiltiofenske soli 1

U našem su laboratoriju prethodno sintetizirane fosfonijeve soli, furanska i tiofenska. Također, provedena je i reakcija sinteze nove 2-metilfuranske soli **1'**, međutim tijekom provođenja reakcije nastao je vrlo reaktivan i jako opasan bromid koji se osmolio. Zbog nastanka furanske smole sinteza soli nije bila moguća. S druge strane, s 2-metiltiofenskom soli nije bilo problema. U okrugloj tikvici od 250 mL otopljeno je 4,925 g dimetiltiofena (0,0440 mol) u 133 mL tetraklorugljika, CCl_4 . U reakcijsku smjesu dodano je 7,83 g *N*-bromsukcinimida, NBS (1 ekv.). Sve zajedno miješa se u uljnoj kupelji na temperaturi refluksa (150 °C). Nakon što je krenuo refluks dodan je prvi obrok katalizatora AIBN na vrh špahtlice. Temperatura je zatim smanjena na ~100 °C zbog prevelikog refluksa. Kad se refluks ustalio, reakcijska je smjesa osvijetljena lampom koja je inicirala reakciju. Nakon 1,5 sati započelo je stvaranje odgovarajućeg bromida uz istovremeno izdvajanje sukcinimida na površini u obliku bijelih pahuljastih kristala. Kad je prošlo još sat vremena dodan je drugi obrok AIBN. Smjesa je zatim refluksirana 3 sata. Nastali je sukcinimid zatim filtriran preko naboranog filter papira, a dobivena bistra narančasta tekućina uparavana je na rotirajućem uparivaču. U tikvici je zaostao smeđi uljasti talog nastalog tiofenskog bromida.

U drugom se stupnju tiofenski bromid otopio u 10 mL benzena, uz dodatak trifenilfosfina, PPh_3 .

Reakcijska je smjesa zagrijana do refluksa (80 °C - mješalica postavljena na 110 °C) i na toj je temperaturi miješana 1 sat. Zatim je grijanje isključeno, a sljedeća 24 sata smjesa se miješala na sobnoj temperaturi. Dobivena je sol profiltrirana pomoću Büchnerovog lijevka, prethodno se izvagala kristalirka, a zatim se u nju stavila sol, te ponovno vagala. Sol je sušena u eksikatoru pod vakuumom 4-5 sati. Potrebno je voditi računa prilikom rukovanja s eksikatorom, a kristalirku je prije sušenja potrebno zatvoriti filter papirom i omotati gumicom kako ne bi pod utjecajem vakuuma došlo do raspršenja soli po eksikatoru.

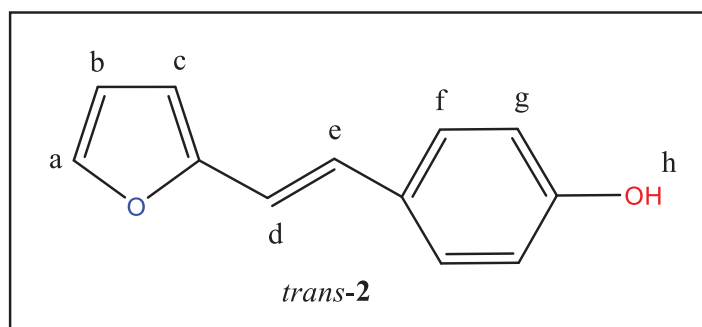
4.3. Sinteza novih rezveratrolnih derivata 2-6

Aparatura koju čini troglava tikvica, lijevak za dokapavanje i klor-kalcijska cijev prethodno se propuhuje dušikom 15 minuta. U trogrlu se tikvicu doda 1,74 g furilne fosfonijeve soli, a u lijevak za dokapavanje 40 mL apsolutnog etanola, od kojih se 30 mL ispusti u tikvicu. Reakcijska smjesa je cijelo vrijeme miješana na sobnoj temperaturi. U preostalih 10 mL apsolutnog etanola dodano je 0,104 g natrija koji mora biti u 10 %-tnom suvišku jer brzo oksidira stvarajući sloj NaOH na površini. S natrijem treba vrlo pažljivo rukovati jer je zapaljiv kad je u kontaktu sa zrakom, pa se cijelo vrijeme mora nalaziti u petroleteru. Pripravljena otopina NaOEt dokapava se u tikvicu, a zatim se doda 0,5 g *p*-hidroksibenzaldehida. Tikvica se zatvori staklenim čepom i ostavi miješati na sobnoj temperaturi 48 sati. Nakon proteklih 48 sati, sadržaj iz troglave tikvice prebaci se u okruglu tikvicu od 250 mL, ispere se s malom količinom etanola i stavi uparavati na rotirajućem uparivaču. Kad je sav etanol uparen, tikvica se 10-15 minuta uparava do suha. Dobiveni se spoj otopi u 50 mL kloroforma i prebaci u lijevak za odjeljivanje, nakon čega se tri puta provodi ekstrakcija. Gornji, vodeni sloj, odvoji se u Erlenmeyerovu tikvicu dok se u donji, organski sloj, doda magnezijev sulfat, MgSO₄, sredstvo za sušenje. Nakon sušenja, organski se sloj profiltrira pomoću staklenog lijevka i naboranog filter papira u okruglu tikvicu, te se uparava na rotirajućem uparivaču. Filter papir potrebno je isprati kloroformom kako bi se pokupio sav zaostali spoj. Na kraju ponovno 10-15 minuta uparavati do suha. Dobivena smjesa produkata pročisti se kolonskom kromatografijom na silika-gelu ($\phi = 20$ mm, $h = 192$ mm), uz smjesu PE/E korištenu kao eluens. Navedenom reakcijom dobiven je izomer *trans*-2.



Slika 4. Aparatura za provođenje Wittigove reakcije

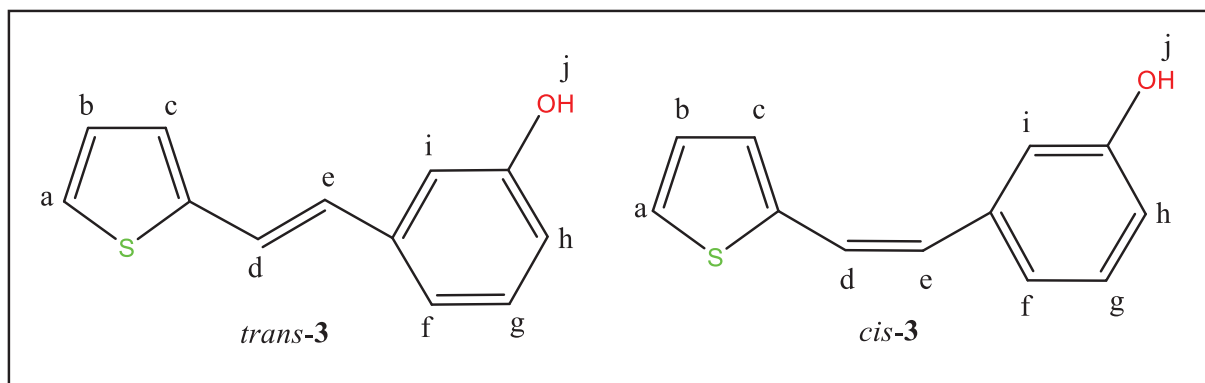
(E)-4-(2-(furan-2-il)vinil)fenol (*trans*-2)



2,9 mg, 1 % izoliranog spoja; R_f (PE:E = 60:40) = 0,52; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 324 (14902); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 8,10 (s, 1H, H_h), 7,38 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H_a), 7,34 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H_f/H_g), 6,97 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H_d/H_e), 6,80 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H_f/H_g), 6,76 (d, 1H, $J = 16,3$ Hz, H_d/H_e), 6,40 (dd, 1H, $J_1 = 3,3$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, H_b), 6,30 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, H_c).

Tiofenski derivati **3-6** pripravlja se na isti način kao i prethodno opisani furanski derivat **2**. Ovdje se koristi (tiofen-2-il)-trifenil-fosfonijeva sol i 0,5 g odgovarajućeg aldehida. Dobivene se smjese pročišćavaju kolonskom kromatografijom u sustavu otapala PE/E.

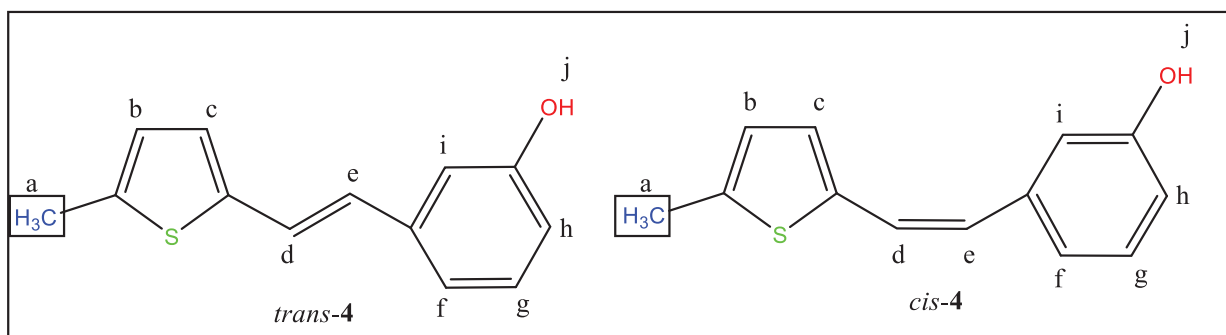
(E)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (trans-3) i **(Z)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (cis-3)**



184,9 mg, 22 % izoliranog spoja; **(Z)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (cis-3)**; R_f (PE:E = 50:50) = 0,80; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 213 (22418), 289 (11627); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,99 (s, 1H, H_j), 7,22 (t, 1H, H_g), 7,10 (d, 1H, $J = 5,1$ Hz, H_a), 6,97 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_c), 6,92 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H_f/H_h), 6,88 (dd, 1H, $J_1 = 5,1$ Hz, $J_2 = 3,7$ Hz, H_b), 6,82 (s, 1H, H_i), 6,76 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H_f/H_h), 6,67 (d, 1H, $J = 12,1$ Hz, H_d/H_e), 6,50 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_d/H_e); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 155,6, 139,6, 139,0, 129,9, 128,4, 126,4, 125,8, 123,6, 121,4, 115,6, 114,6.

78,1 mg, 9 % izoliranog spoja; **(E)-3-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (trans-3)**; R_f (PE:E = 50:50) = 0,68; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 210 (20194), 328 (27246); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,23-7,16 (m, 3H, $\text{H}_a/\text{H}_b/\text{H}_c$), 7,08-7,02 (m, 2H, $\text{H}_d/\text{H}_e/\text{H}_f/\text{H}_h$), 7,00 (t, 1H, H_g), 6,94 (s, 1H, H_i), 6,86 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H_d/H_e), 6,72 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H_f/H_h); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 155,8, 142,7, 138,8, 129,9, 127,8, 127,6, 126,3, 124,6, 122,3, 119,2, 114,6, 112,8.

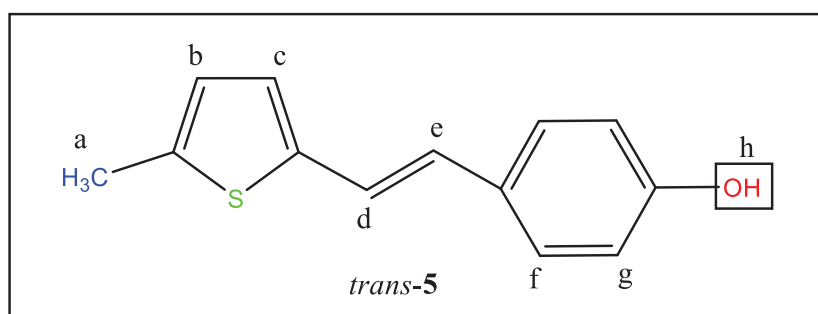
(E)-3-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (trans-4) i **(Z)-3-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (cis-4)**



180,2 mg, 20 % izoliranog spoja; **(Z)-3-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol** (*cis-4*); R_f (PE:E = 30:70) = 0,55; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 214 (17842), 298 (10474); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,22 (t, 1H, H_g), 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H_f/H_h), 6,83 (s, 1H, H_i), 6,78-6,73 (m, 2H, H_b/H_c), 6,58 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_d/H_e), 6,53 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_f/H_h), 6,40 (d, 1H, $J = 12,0$ Hz, H_d/H_e), 2,34 (s, 3H, H_a); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 155,6, 140,5, 139,2, 137,6, 129,8, 128,8, 126,8, 124,6, 124,0, 121,4, 115,6, 114,4, 15,4.

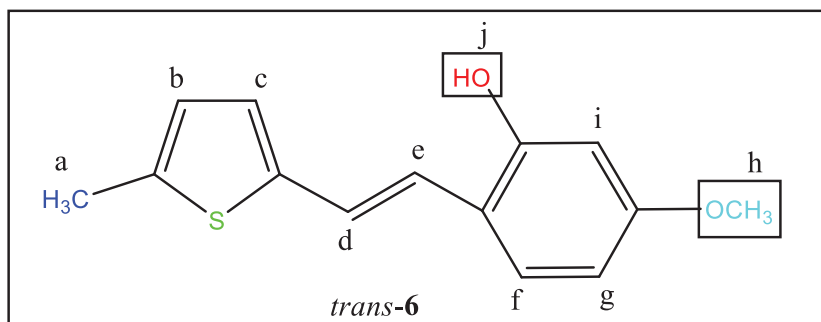
43,2 mg, 5 % izoliranog spoja; **(E)-3-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol** (*trans-4*); R_f (PE:E = 30:70) = 0,56; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 211 (19464), 334 (32165); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,20 (t, 1H, H_g), 7,11 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H_d/H_e), 7,01 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_f/H_h), 6,91 (s, 1H, H_i), 6,85 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_f/H_h), 6,72 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H_d/H_e), 6,70 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H_b/H_c), 6,65 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_b/H_c), 2,48 (s, 3H, H_a); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 155,8, 140,6, 139,5, 139,0, 129,8, 126,6, 126,6, 125,8, 122,7, 119,1, 114,4, 112,6, 15,6.

(E)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-5*)



4,7 mg, 1 % izoliranog spoja; **(E)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol** (*trans-5*); R_f (PE:E = 30:70) = 0,45; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 337 (21581); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,32 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H_f/H_g), 7,00 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H_d/H_e), 6,80 (m, 3H, $H_b/H_f/H_g$), 6,73 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H_d/H_e), 6,62 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_c), 2,47 (s, 3H, H_a); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 155,0, 141,2, 138,6, 134,2, 130,3, 130,2, 127,6, 126,6, 125,6, 120,2, 115,6, 15,6.

(E)-5-metoksi-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (trans-6)



5,5 mg, 1 % izoliranog spoja; **(E)-5-metoksi-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (trans-6)**; R_f (PE:E = 30:70) = 0,52; UV (ACN) λ_{max} / nm (ϵ / $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 245 (11136), 341 (27163), 348 (26994); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ /ppm: 7,33 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_f/H_g), 7,06 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz, H_d/H_e), 6,92 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz, H_d/H_e), 6,80 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_c), 6,62 (s, 1H, H_i), 6,50 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H_f/H_g), 6,37 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H_b), 3,78 (s, 3H, H_h), 2,47 (s, 3H, H_a); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ /ppm: 160,0, 153,8, 141,4, 138,7, 128,0, 125,6, 122,0, 121,2, 117,5, 107,0, 101,8, 55,4, 15,6.

5. ZAKLJUČAK

- Sintetizirani su novi rezveratrolni derivati **2-6**.
- Spojevi **2-6** pročišćeni su tankoslojnom i kolonskom kromatografijom.
- *Cis*- i *trans*-izomeri dobiveni su za **3** i **4**, dok kod ostalih nismo uspjeli izolirati *cis*-izomer.
- Izomeri su spektroskopski okarakterizirani ^1H i ^{13}C NMR metodama te su snimljeni njihovi UV spektri iz kojih su dobivene vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata te područja apsorpcije navedenih izomera.
- Određena je kristalna struktura spojeva *trans-3* i *trans-6*.
- Tiofenski derivati podvrgnuti su ispitivanjima antioksidacijske aktivnosti, od kojih se najaktivniji pokazao spoj *trans-6*, a *cis-3* i *trans-3* pokazali su odličnu do vrlo dobru aktivnost.
- Inhibicijsko djelovanje pokazali su svi tiofenski derivati na oba enzima, a najbolje su vrijednosti postigli *trans-4* i *trans-6*.
- Pozitivni mutageni potencijal pokazali su *cis-3* i *trans-3* spojevi.

6. LITERATURA

1. Wade, L.G., *Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb* (2017) 834-838
2. <https://www.masterorganicchemistry.com/2018/02/06/wittig-reaction/> (pristup 10. lipnja 2023.)
3. Alonso, D. A., Najera, C., Varea, M., *Tetrahedron Letters* **45** (2004) 573-577
4. Britten, T. K., McLaughlin, M. G., Basson, A. J., Roberts, D. D., *Synthesis* **53** (2021) 3535-3544
5. Kumar, S., Kumar-Pandey, A., Singh, R., Nand-Singh, K., *European Journal of Organic Chemistry* **2018** (2018) 5942-5946
6. Oestreich, M., *The Mizoroki-Heck reaction*, Wiley, Chichester (2009)
7. Garcia, C.S., Uberman, P.M., Martin, S.E. *Beilstein J. Org. Chem.*, **13** (2017) 1717-1727
8. Albert, S., Horbach, R., Deising, H.B., Siewert, B., Csuk, R., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**(17) (2011) 5155-5166
9. Sakamoto, J., Schlüter, A.D., Rehahn, M., *Polyphenylenes, Polyfluorenes, and Poly(phenylene vinylene)s by Suzuki Polycondensation and Related Methods*, u: *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Oxford (2012), str. 627
10. Ferré-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A., Noels, A.F., *Coordination Chemistry Reviews* **248** (2004) 2323-2336
11. Johnson, J.R., *The Perkin Reaction and Related Reactions*, *Organic Reactions*, New York (2011) 210-265
12. Sinha, A.K., Kumar, V., Sharma, A., Sharma, A., Kumar, R., *Tetrahedron* **63** (2007) 11070-11077
13. Molander, G.A., Fumagalli, T., *J. Org. Chem.*, **71** (2006) 5743-5747
14. Varnado, C.D., Bielawski, C.W., *Condensation Polymers via Metal-Catalyzed Coupling Reactions*, u: *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, Oxford (2012) 179-181
15. Dhingra, A.K., Rathi, V., Chopra, B., *Resveratrol*, u: *Naturally Occurring Chemicals against Alzheimer's Disease*, Elsevier, Oxford (2021) 33-47
16. Risuleo, G., *Resveratrol: Multiple Activities on the Biological Functionality of the Cell*, u: *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, Academic Press, Cambridge (2016) 453-464
17. Fremont, L., *Life Sciences*, **66**(8) (2000) 663-673

18. Neves, A.R., Lúcio, M., Lima, J.L.C., Reis, S., *Current Medicinal Chemistry*, **19**(11) (2012) 1663-1681
19. Shankar, S., *Frontiers in Bioscience*, **12**(12) (2007) 4839-4854
20. Guerrero R.F., García-Parrilla M.C., Puertas B, Cantos-Villar E., *Natural Product Communications*, **4**(5) (2009) 635-658
21. Bertelli, A.A.A., Das, D.K., *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **54**(6) (2009) 468-476
22. Lippi, G., Franchini, M., Guidi, G.C., *International Journal of Wine Research* **2** (2010) 1-7
23. Shah, P.K., Patel, J.A., *International Journal of Green Pharmacy* **4** (2010) 15-21
24. Bhat, K.P.L., Kosmeder, J.W., Pezzuto, J.M., **3**(6) (2001) 1041-1064
25. Bradamante, S., Barenghi, L., Villa, A., *Cardiovascular Drug Reviews*, **22**(3) (2004) 169-188
26. King, R.E., Bomser, J.A., Min, D.B., *Institute of Food Technologists*, **5** (2006) 65-70
27. Kundu, J.K., Surh, Y.-J., *Cancer Letters*, **269**(2) (2008) 243-261
28. Dong, Z., *Mutation Research* **523-524** (2003) 145-150
29. Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., He, J., *Molecules*, **26**(1) (2021) 229
30. Abba, Y., Hassim, H., Hamzah, H., Noordin, M.M., *Advances in Virology* (2015) 1-7
31. Campagna, M., Rivas, C., *Biochemical Society Transactions*, **38**(1) (2010) 50-53
32. Baxter, R.A., *Journal of Cosmetic Dermatology*, **7**(1) (2008) 2-7
33. Olas, B., Wachowicz, B., *Thrombosis research*, **106**(2) (2002) 143-148
34. Jang, J., *Free Radical Biology and Medicine*, **34**(8) (2003) 1100-1110
35. <https://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/546/Alzheimerova-demencija.html>
(pristup 26.lipnja 2023)
36. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest> (pristup 26.lipnja 2023.)
37. Pasinetti, G.M., Wang, J., Ho, L., Zhao, W., Dubner, L., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1852**(6) (2015) 1202-1208
38. Yoon, S.-S., AhnJo, S.-M., *Biomolecules and Therapeutics*, **20**(3) (2012) 245-255
39. Li, F., Gong, Q., Dong, H., Shi, J., *Current Pharmaceutical Desing*, **18**(1) (2012) 27-33

40. Gomes, B.A.Q., Silva, J.P.B., Romeiro, C.F.R., dos Santos, S.M., Rodrigues, C.A., Gonçalves, P.R., Sakai, J.T., Mendes, P.F.S., Varela, E.L.P., Monteiro, M.C., Oxidative Medicine and Cellular Longevity (2018) 1-15
41. Bastianetto, S., Ménard, C., Quirion, R., Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, **1852**(6) (2015) 1195-1201
42. Mlakić, M., Odak, I., Barić, D., Kovačević, B., Talić, S., Šagud, I., Štefanić, Z., Molčanov, K., Lasić, Z., Škorić, I., New resveratrol derivatives as improved biologically active structures: design, synthesis and computational modeling, European Journal of Medicinal Chemistry (rad u postupku objavljivanja)
43. a) H. Pajouhesh, G. R. Lenz, NeuroRx 2 (2005) 541-553.; b) M. S. Alavijeh, M. Chishty, M. Z. Qaiser, A. M. Palmer, NeuroRx 2 (2005) 554-571.; c) B. Testa, P. Crivori, M. Reist, P. A. Carrupt, Perspectives in Drug Discovery and Design 19 (2000) 179-211
44. Molinspiration Cheminformatics (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)
45. Pass online (Way 2 Drug, <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>)
46. Su, X., Zhou, D., Li, N., Bioactive stilbenes from plants, u: Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier, Oxford (2022) 265-403