

Novi derivati rezveratrola - sinteza i spektroskopska karakterizacija

Milić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:743105>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Sara Milić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024.

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

Kandidatkinja Sara Milić

Predala je izrađen završni rad dana: 3. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

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

prof. dr. sc. Sanja Martinez, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko, 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: 6. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ
PRIMIJENJENA KEMIJA

Sara Milić

NOVI DERIVATI REZVERATROLA – SINTEZA I
SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Irena Škorić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić

prof. dr. sc. Sanja Martinez

prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Zagreb, rujan 2024.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Irene Škorić.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ireni Škorić na pruženoj prilici izrade završnog rada pod njezinim mentorstvom. Njezina stručnost i predanost bili su od neprocjenjive važnosti tijekom cijelog procesa izrade rada. Iznimno cijenim sve savjete i nove vještine stečene u laboratoriju, kao i smjernice prilikom pisanja rada koje su značajno pridonijele njegovoj kvaliteti.

Zahvaljujem se asistenticama mag. appl. chem. Vilmi Lovrinčević i mag. appl. chem. Marini Galić na pristupačnosti i pomoći u laboratoriju te ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se kolegicama Tei Horvat i Sari Gregić na stalnoj podršci i motivaciji tijekom naše izrade završnih radova na spomenutom zavodu.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na pruženom razumijevanju, strpljenju kao i neizmjerne podršci.

Sažetak

Svrha je ovog rada sinteza novih rezveratrolnih derivata, prvenstveno radi ispitivanja mogućnosti njihove primjene kod liječenja Alzheimerove bolesti, kao inhibitora enzima kolinesteraza. Budući da je rezveratrol već prepoznat kao spoj s jakim antioksidacijskim svojstvima, cilj je ovog istraživanja poboljšanje njegovih bioloških karakteristika modificiranjem njegove kemijske strukture. Stoga su novi derivati sintetizirani postupkom Wittigove reakcije, uz odvajanje nastalih izomera kolonskom kromatografijom. Pritom su korišteni odgovarajući aldehid, sa željenim supstituentom u *para*-položaju u odnosu na hidroksilnu skupinu, te tiofenska sol, nesupstituirana ili 5-metil-2-supstituirana sol. Uspješno su dobiveni biološki aktivni *trans*-izomeri novih rezveratrolnih derivata, a njihove su ključne istraživane karakteristike antioksidacijska svojstva i sposobnost inhibicije enzima kolinesteraza. Uz to, spektroskopska karakterizacija sintetiziranih spojeva doprinosi boljem razumijevanju njihovih kemijskih svojstava. Na temelju rezultata mjerenja, spoj *trans-7* pokazuje najznačajniju antioksidacijsku aktivnost, ostvarivši inhibiciju butirilkolinesteraze s vrijednosti IC_{50} od 24,8 μ M te negativan *in silico* test na genotoksičnost.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, antioksidacija, inhibicija, kolinesteraza, rezveratrol, Wittigova reakcija

Abstract

New derivatives of resveratrol – synthesis and spectroscopic characterization

The purpose of this study is the synthesis of new resveratrol derivatives, primarily to investigate their potential application in the treatment for Alzheimer's disease, as cholinesterase enzymes inhibitors. Since resveratrol is already recognized as a compound with strong antioxidant properties, the aim of this research is to enhance its biological characteristics by modifying its chemical structure. Therefore, the new derivatives were synthesized using the Wittig reaction, with separation of the resulting isomers by column chromatography. An aldehyde, with the desired substituent in *para*-position relative to the hydroxyl group, and a thiophene salt, either unsubstituted or 5-methyl-2-substituted, were used in the process. Biologically active *trans*-isomers were successfully obtained, and their key characteristics, such as antioxidant properties and the ability to inhibit cholinesterase enzymes, were examined. Additionally, the spectroscopic characterization of the synthesized compounds contributes to a better understanding of their chemical properties. Research results show that compound *trans-7* demonstrates the most significant antioxidant activity, achieving butyrylcholinesterase inhibition with IC₅₀ value of 24.8 μM and a negative *in silico* test for genotoxicity.

Keywords: Alzheimer's disease, antioxidation, cholinesterase inhibition, resveratrol, Wittig reaction

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. Rezveratrol – struktura i svojstva.....	2
2.2. Sinteza rezveratrola	4
2.3. Wittigova sinteza	5
2.4. Alzheimerova bolest.....	7
2.5. Rezveratrol kao potencijalni lijek Alzheimerove bolesti	8
2.6. Antidijabetičko djelovanje rezveratrola	13
2.7. Antikancerogeno djelovanje rezveratrola.....	13
2.8. Protuupalno djelovanje rezveratrola.....	14
3. Rezultati i rasprava	15
3.1. Pregled sintetiziranih spojeva.....	15
3.2. Sinteza i spektroskopska analiza rezveratrolnih derivata <i>trans-1–4</i>	16
3.3. Sinteza i spektroskopska analiza rezveratrolnih derivata <i>trans-6</i> i <i>trans-7</i>	26
3.4. Antioksidacijska aktivnost i inhibicija kolinesteraze novih derivata rezveratrola	32
3.5. Genotoksičnost.....	–37
3.6. NMR titracije.....	38
4. Eksperimentalni dio	40
4.1. Opće napomene	40
4.2. Sinteza 5-metil-2-tiofenske soli	40
4.3. Sinteza novih rezveratrolnih derivata 1–7	42
5. Zaključak	49
6. Literatura	50
7. Životopis	54

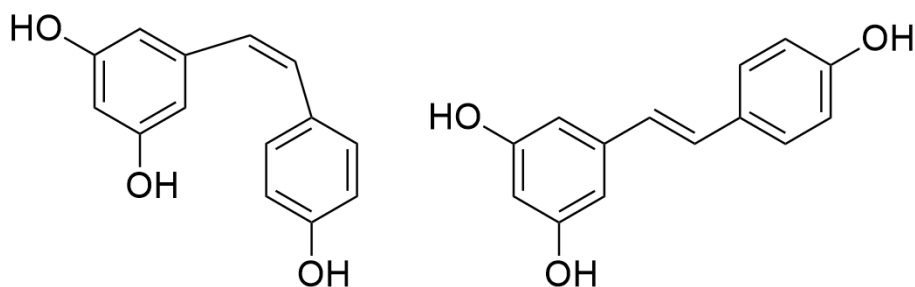
1. Uvod

Alzheimerova bolest predstavlja jedan od najznačajnijih medicinskih izazova današnjice, s obzirom na sve veći broj oboljelih i nedostatak učinkovitih terapijskih agenasa. Tradicionalno se pak smatrala neizlječivom degenerativnom bolešću, no kontinuirani napredak farmaceutske industrije opovrgava takvo mišljenje. Bolest se karakterizira postupnim padom kognitivnih i nekognitivnih funkcija, što značajno utječe na kvalitetu života kako pacijenata, tako i njegovatelja.¹ Jedan od pristupa istraživanju potencijalnih lijekova za ovu bolest temelji se na upotrebi prirodnih spojeva s dokazanom biološkom aktivnošću. Rezveratrol, prirodni polifenol pronađen u kožici crnog grožđa, poznat je po svojim antioksidacijskim, protuupalnim i antikancerogenim svojstvima. Osim toga, prethodna istraživanja pokazuju kako rezveratrol također potiče inhibiciju nakupljanja β -amiloidnih peptida, što je ključan korak u prevenciji i usporavanju patoloških promjena kod Alzheimerove bolesti.² Istraživanje ovog rada fokusira se na sintezu novih derivata rezveratrola, s ciljem poboljšanja njegovih bioloških svojstava kroz kemijsku modifikaciju. Time bi se otvorila nova mogućnost za razvoj terapijskih agenasa u borbi protiv ove teške bolesti.

2. Opći dio

2.1. Rezveratrol – struktura i svojstva

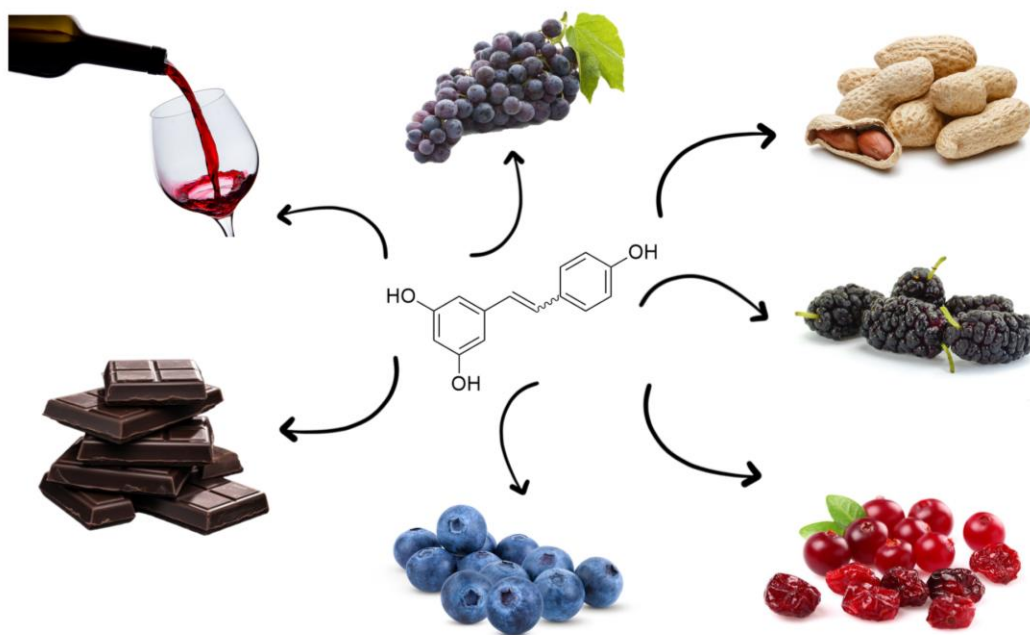
Rezveratrol je prirodni spoj kemijski poznat kao 3,5,4'-trihidroksistilben. Struktura je stilbena koja se sastoji od dva fenilna prstena povezana vinilnim mostom. Pripada većoj skupini spojeva zvanih polifenoli, koji biljkama primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, odnosno kao molekule koje se sintetiziraju samo u odgovoru na ozljede ili infekcije.^{3,4} Rezveratrol postoji u oba oblika geometrijskih izomera, *cis* i *trans*, od kojih je *trans*-izomer biološki aktivan oblik, a izlaganjem UV/Vis zračenju izomerizira u *cis*-oblik (Slika 1). Pri sobnoj temperaturi prisutan je u čvrstom, praškastom stanju blijedo žute boje. Molekulska formula rezveratrola je $C_{14}H_{12}O_3$, a njegova molarna molekulska masa iznosi 228,247 g/mol.^{5,3}



Slika 1. Prikaz geometrijskih *cis*- (lijevo) i *trans*- (desno)izomera rezveratrola.

Nedavna intenzivna istraživanja upućuju na sve veći interes za rezveratrol među biomedicinskom zajednicom. To proizlazi iz njegovog velikog broja bioloških aktivnosti i svojstava povezanih s doprinosom ljudskom zdravlju. Rezveratrol ima vrlo širok spektar korisnih farmakoloških svojstava.⁶ Zbog složenog mehanizma djelovanja, rezveratrol pokazuje različite molekularno-biološke prednosti poput protuupalnog, antioksidacijskog i antikancerogenog djelovanja. Koristi se i kod prevencije simptoma neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti.^{7,8} Rezveratrol se brzo oralno apsorbira, ali njegov kompleksan metabolizam dovodi do ograničene bioraspoloživosti što rezultira nedovoljnim blagotvornim učinkom na zdravlje. U tankom se crijevu relativno brzo apsorbira pasivnom difuzijom, zahvaljujući svojoj maloj molarnoj molekularnoj masi i nepolarnim karakteristikama.⁹ Topljivost u vodi iznosi mu svega 50 $\mu\text{g/mL}$ dok u organskim otapalima pokazuje visoku topljivost, približno 65 mg/mL .¹⁰ Prema biofarmaceutskom klasifikacijskom

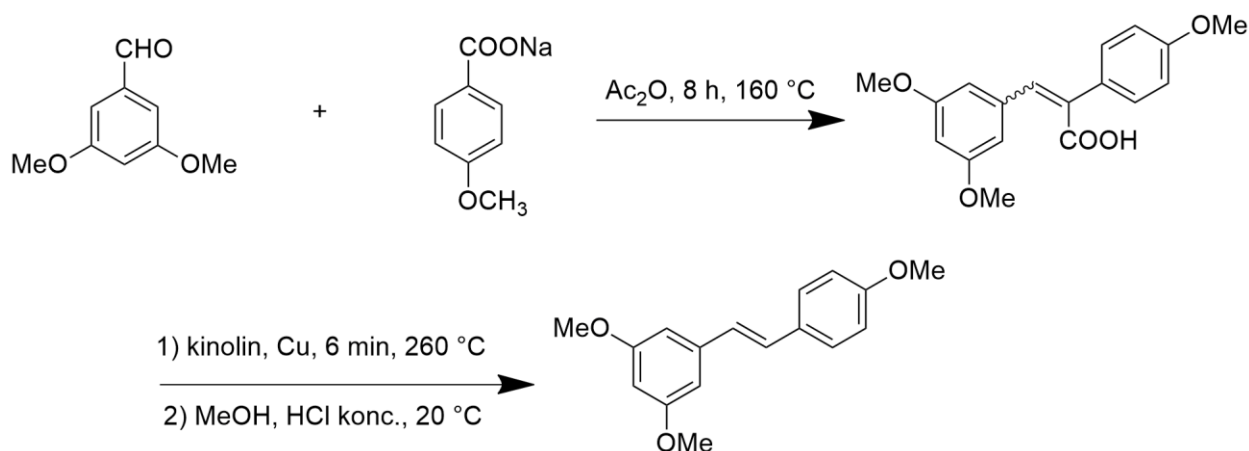
sustavu (engl. *The Biopharmaceutics Classification System, BCS*) pripada lijekovima klase II koje karakterizira niska topljivost i visoka propusnost. Pritom je bioraspoloživost tih lijekova ograničena njihovom stopom solvatacije. Postoji nekoliko tehnika koje se koriste za poboljšanje bioraspoloživosti BCS lijekova klase II, kao što je korištenje nanotehnologije prilikom davanja lijeka i njegovog usmjeravanja.¹¹⁻¹³ Rezveratrol se nalazi u biljnim plodovima kao što su kikiriki, borovnice, brusnice, dud, crno grožđe, a ima ga i u kakaovcu pa se može naći i u tamnoj čokoladi (Slika 2).¹⁴ Međutim, crno je vino prepoznato kao jedan od glavnih izvora rezveratrola u ljudskoj prehrani jer se u njemu mogu naći njegove značajne količine (4-20 mg/L).¹⁵ Prvo nasumično kliničko ispitivanje objavljeno je tek krajem 2011., a sustavno je ispitivalo metaboličke učinke rezveratrola kod ljudi.¹⁶



Slika 2. Namirnice koje sadrže rezveratrol.

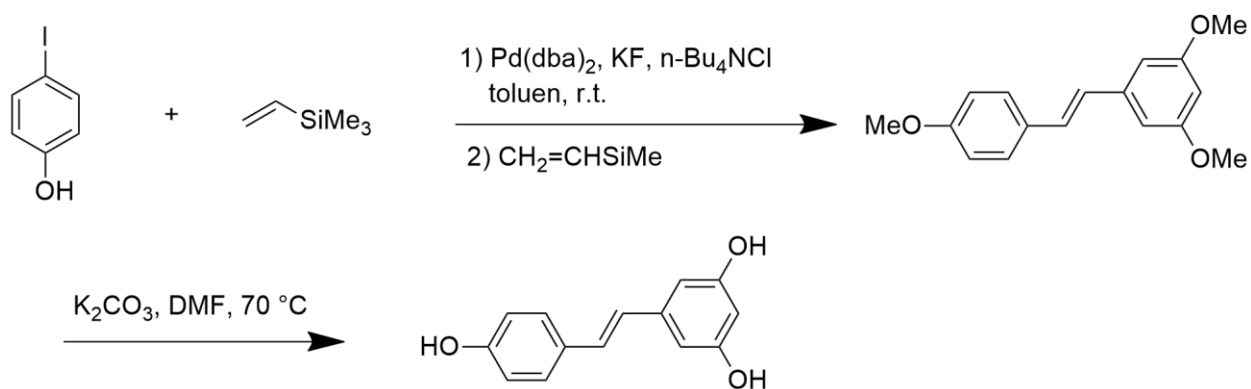
2.2. Sinteza rezveratrola

Poznato je preko 20 različitih vrsta sinteze rezveratrola. Prvu sintezu rezveratrola opisali su 1941. godine Späth i Kromp, a sastojala se od Perkinove kondenzacije 3,5-dimetoksibenzaldehida i natrijeve soli *p*-metoksibenzojeve kiseline u anhidridu octene kiseline (Shema 1). Nakon dekarboksilacije, dobiven je trimetoksi-rezveratrol.¹⁷



Shema 1. Sinteza trimetoksi-derivata rezveratrola.

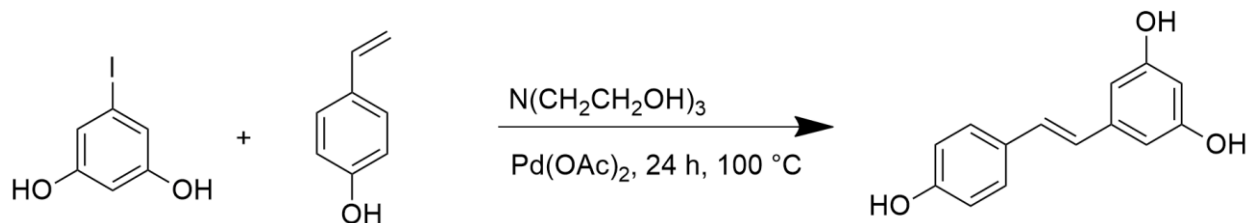
Jeffery i ostali opisali su sintezu *E*-3,4',5-trimetoksistilbena u iskorištenju od 72 % (Shema 2). Pritom su korištene dvije uzastopne Heckove reakcije s jodidom i viniltrimetilsilanom te paladijem(II) kao katalizatorom.¹⁸



Shema 2. Sinteza rezveratrola Heckovom reakcijom.

Za sintezu rezveratrola korišten je i univerzalni postupak Mizoroki-Heckove reakcije (Shema 3). Pomiješani su stiren, halogenirani benzen, trietanolamin i paladijev(II) acetat na 100 °C u inertnoj

atmosferi tokom 24 h. Nakon završetka reakcije, smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu pa joj je dodano 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline (2 N). Na kraju je smjesa ekstrahirana eterom (3 x 100 mL) kako bi se dobio čisti spoj.¹⁹

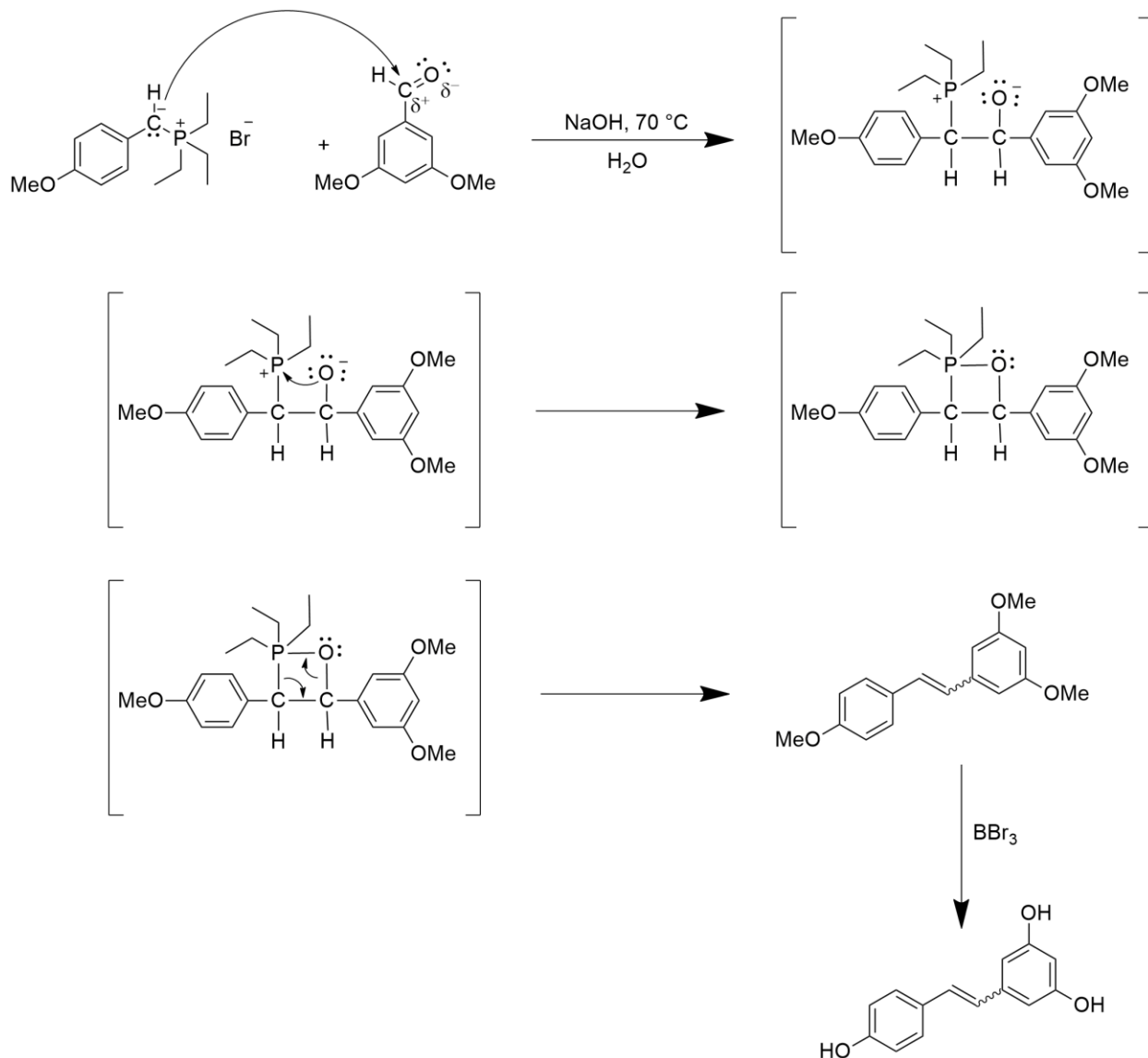


Shema 3. Sinteza rezveratrola Mizoroki-Heckovom reakcijom.

2.3. Wittigova sinteza

Jedna od najznačajnijih metoda sinteze rezveratrola, koja je i korištena u ovom radu, Wittigova je reakcija ili Wittigova olefinacija. Njemački kemičar Georg Wittig 1954. godine prvi put provodi takvu reakciju te 1979. godine za nju dobiva prestižnu Nobelovu nagradu za kemiju. Sastoji se od kemijske reakcije aldehida ili ketona s monosupstituiranim trifenilfosfonijevim ilidom, često zvanim Wittigovim reagensom. Rezultat reakcije je nova ugljik-ugljik dvostruka veza, odnosno sintetiziran alken i trifenilfosfin-oksidi kao drugi produkt.²⁰ Ilidi su neutralne molekule, primjeri zwitteriona, spojeva koji sadrže pozitivne i negativne naboje separirane unutar iste molekule. Ono što ih razlikuje od ostalih zwitteriona je blizina suprotnih naboja. U slučaju Wittigovih reagensa razlikuje se pozitivan naboj na fosforu i negativan naboj na ugljikovom atomu.²¹ Ilidi se uobičajeno dobivaju djelovanjem umjereno jake baze na fosfonijeve soli koje se pak lako dobivaju iz alkil-halogenida i trifenilfosfina.²² Trifenilfosfin se često koristi iz praktičnih razloga, poput krutog sobnog agregacijskog stanja koje olakšava vaganje točne količine i dodavanje u reakciju te lake dostupnosti.²¹ Reakcija se odvija kroz usklađenu [2+2] cikloadiciju, a kreće napadom nukleofilnog ugljikovog atoma na karbonilni ugljikov atom, dajući prijelazno stanje poznato pod nazivom betain. Zatim se formira četveročlani prsten, oksafosfetan, zbog velikog privlačenja suprotnih naboja atoma fosfora i kisika. On se zatim fragmentira retro-cikloadicijom dajući alken i trifenilfosfin-oksidi. Produkti su najčešće smjese *cis*- i *trans*-izomera, ali Wittigova reakcija može biti stereoselektivna ovisno o vrsti korištenog ilida. S nestabiliziranim ilidima, reakcija je *cis*-selektivna, dok je sa stabiliziranim ilidima reakcija *trans*-selektivna. Stabilizacija se odnosi na

prisutnost elektron-odvlačeće skupine.²² Slijedi primjer sinteze rezveratrola Wittigovom reakcijom, s prethodno dobivenom 4-metoksifenilnom soli reakcijom trietilfosfina s 4-metoksibenzil-bromidom (Shema 4). Daljnja provedena Wittigova reakcija ove soli s 3,5-dimetoksibenzaldehydom u prisutnosti natrijevog hidroksida i vode, praćena je obradom s borovim tribromidom do nastanka željenog produkta.²³



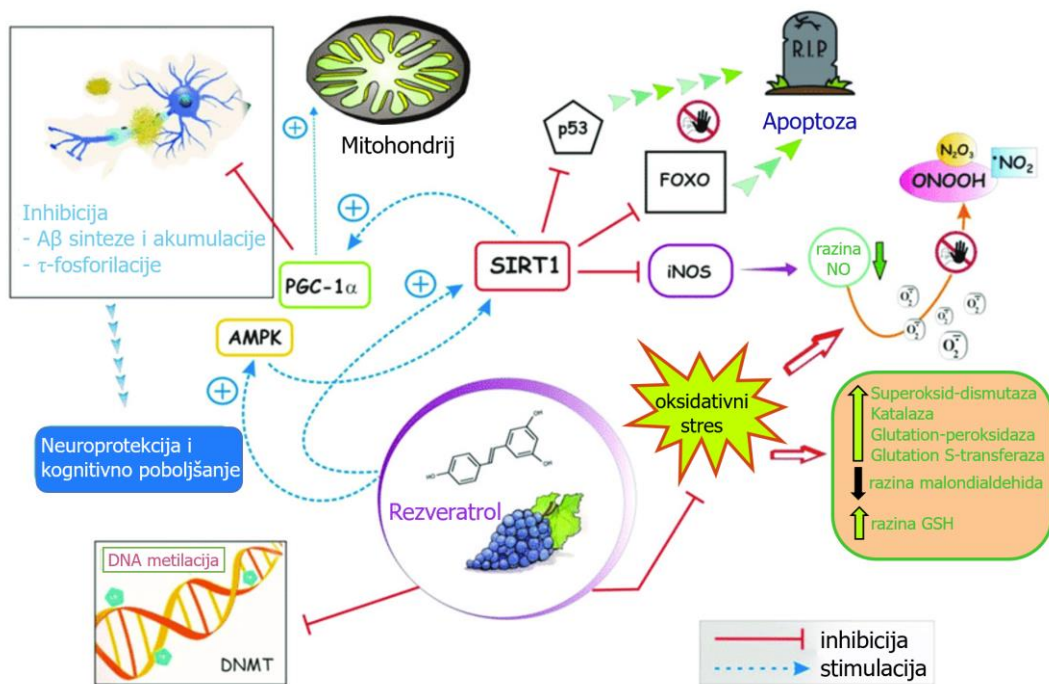
Shema 4. Mehanizam sinteze rezveratrola Wittigovom reakcijom.

2.4. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease, AD*) najčešći je smrtonosni neurodegenerativni poremećaj koji narušava razvijene mentalne sposobnosti te prekida neurokognitivnu funkciju, a pogađa više od 24 milijuna ljudi diljem svijeta.²⁴ To je stanje opisano neurodegeneracijom, gubitkom živčanih stanica (neurona) te stvaranjem amiloidnih naslaga.²⁵ Trenutačne terapijske mogućnosti predstavljaju skromno poboljšanje pamćenja i kognitivnih funkcija, ali ne sprječavaju progresivnu neurodegeneraciju. Dostupni lijekovi uglavnom su namijenjeni simptomatskom liječenju i dijele se na inhibitore kolinesteraze (donepezil, rivastigmin i galantamin) te antagonist NMDA receptora (memantin).^{26,27} Etiologija Alzheimerove bolesti ostaje nepoznata, ali poznato je više čimbenika koji vjerojatno igraju važnu ulogu u njezinom razvoju. Najvažniji čimbenici su β -amiloidni peptidi ($A\beta$), τ -proteini, oksidativni stres i niske razine acetilkolina.²⁸ Veliko otkriće u razumijevanju Alzheimerove bolesti bila je povezanost oboljelih s nakupljanjem amiloidnih naslaga u njihovom mozgu.²⁹ Histopatološka obilježja Alzheimerove bolesti su neurofibrilarni čvorovi i senilni plakovi, koji su masivne izvanstanične naslage nakupljenog β -amiloidnog peptida.³⁰ Interakcija nakupljenih β -amiloida sa sadržajem živčanih stanica rezultira raznim patološkim i fiziološkim anomalijama koje uključuju neuroupalni proces, mitohondrijsku disfunkciju, oksidativni stres, smanjenu regulaciju metabolizma kalcija te stimulaciju stanične smrti neurona. β -amiloidni monomeri agregiraju u različite strukture uključujući oligomere i vlakna. Vlakna β -amiloida veća su i netopiva te mogu dalje agregirati u β -amiloidne plakove, dok su β -amiloidni oligomeri topivi i mogu se proširiti cijelim mozgom. Kod osoba koje nisu oboljele od Alzheimerove bolesti, povećanje razine β -amiloida događa se kroz nekoliko desetaka godina, dok je kod oboljelih karakteristično njihovo rano i naglo nakupljanje.^{25,31} Oksidativni stres jedan je od najranijih događaja u patogenezi Alzheimerove bolesti. Teorija o slobodnim radikalima i oksidativnom stresu kao uzrocima starenja također sugerira da je oksidativno oštećenje važan čimbenik u degeneraciji neurona. Stoga bi uspješna zaštita neurona od oksidativnog oštećenja potencijalno mogla spriječiti razvijanje Alzheimerove bolesti.³² Objavljena su istraživanja pokazala da prekomjerne količine biometala, kao što su željezo, cink i bakar, postoje u mozgovima pacijenata s Alzheimerovom bolesti (Cu \sim 400 μ M, Zn i Fe \sim 1 mM) i to količinski nekoliko puta više od normalnog za odgovarajuću dob (Cu \sim 70 μ M, Zn \sim 350 μ M, Fe \sim 340 μ M). Takve količine biometala mogu pospješiti nakupljanje β -amiloida. Osim toga, interakcija β -amiloida s Cu^{2+} ionima doprinosi proizvodnji reaktivnih kisikovih čestica (engl. *reactive oxygen species, ROS*).³³

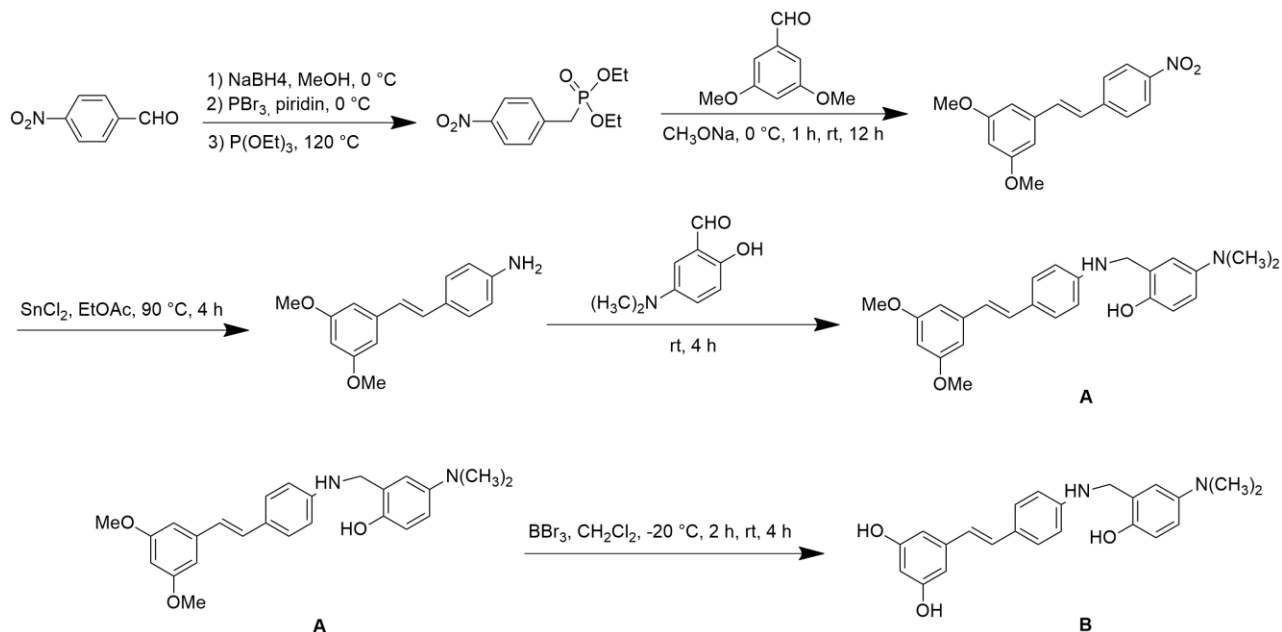
2.5. Rezveratrol kao potencijalni lijek Alzheimerove bolesti

Nedavni dokazi istraživanja upućuju na to da rezveratrol djeluje kao sredstvo protiv Alzheimerove bolesti putem inhibicije nakupljanja β -amiloida, uklanjanjem oksidansa i primjenom protuupalnih aktivnosti (Slika 3). To je potvrđeno testovima na laboratorijskim životinjama i njegova je 2. faza kliničkih ispitivanja za pacijente s Alzheimerovom bolesti trenutno u tijeku.²⁸ Rezveratrol aktivira transtiretin, protein koji sekvestrira β -amiloidni peptid i sprječava njegovo nakupljanje. Također je potvrđeno da rezveratrol aktivira sirtuin (SIRT1) i inhibira signalizaciju nuklearnog faktor kapa B (NF- κ B) čime je stimuliran β -amiloid. Zbog supresije NF- κ B, smanjena je ekspresija gena koji utječu na stvaranje sintaze dušikovog oksida, ciklooksigenaze-2 i katepsina, kao i medijatora dušikovog oksida i prostaglandina E2, uključenih u neuroupalni proces. Istražen je i potencijal rezveratrola protiv tauopatije povezane s Alzheimerovom bolesti, pokazujući smanjenje razine τ -proteina u štakorima i inhibiciju τ -hiperfosforilacije i agregacije.³⁴⁻³⁶ Osim toga, dokazana je i sposobnost depolimerizacije stvorenih β -amiloidnih peptida putem mehanizma koji uključuje proteasom. Ovi rezultati pokazuju da bi se rezveratrol mogao koristiti kao početni spoj pri dizajniranju multifunkcionalnih lijekova za liječenje neurodegenerativnih bolesti.



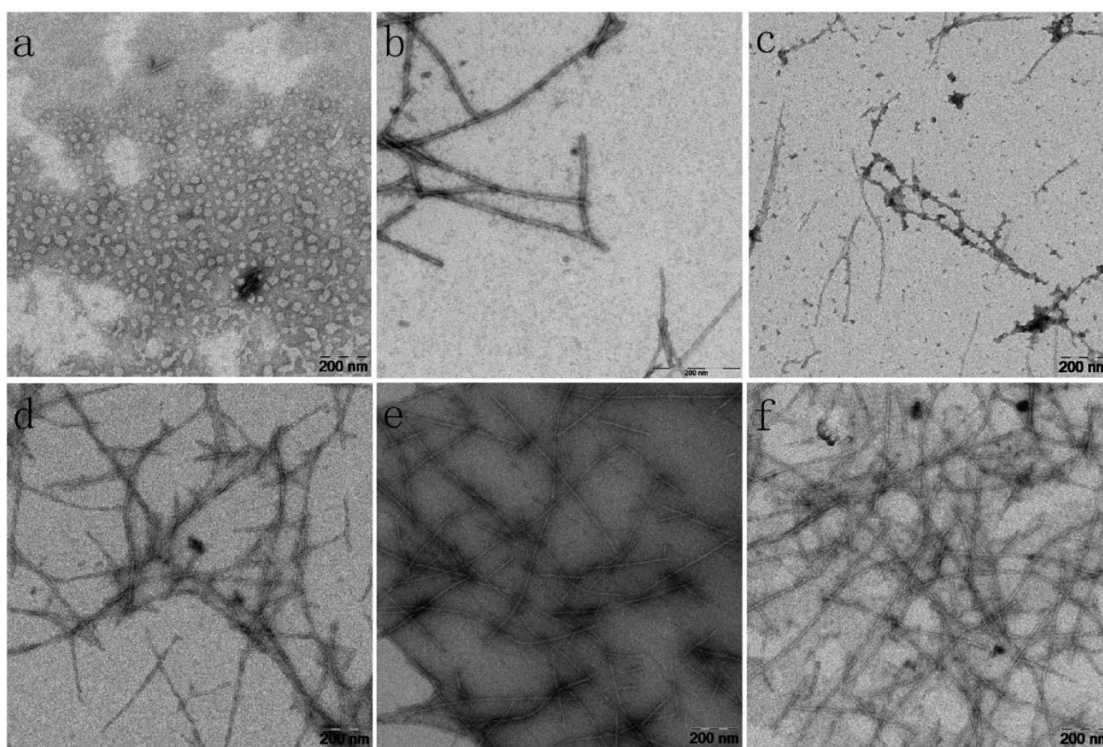
Slika 3. Shema rezveratrolovog različitog djelovanja u organizmu.

Slijedi pregled otkrića jednog od prethodnih istraživanja novosintetiziranih derivata rezveratrola kao potencijalnih lijekova za Alzheimerovu bolest.²⁸ U obzir su uzeti prethodni derivati koji su imali snažno inhibicijsko i antioksidacijsko djelovanje na nakupljanje β -amiloida te činjenica da ioni biometala mogu biti ključni sudionici u patološkim procesima Alzheimerove bolesti. Stoga su kombinirani rezveratrol i farmakoforski dio dobro poznatog kelatora metala kliokinola (CQ), koji je značajno smanjio stopu pada kognitivnih sposobnosti kod pacijenata s umjereno teškom fazom bolesti. Dakle, sintetiziran je novi niz kompleksnih derivata rezveratrola koji su u *in vitro* studijima pokazali značajniju inhibiciju samoizazvanog nakupljanja β -amiloida, Cu^{2+} -izazvanog nakupljanja β -amiloida te potencijalno antioksidacijsko djelovanje. Konkretno, derivati A i B pokazali su najbolje rezultate pa su odabrani kao potencijalni vodeći spojevi za terapiju Alzheimerove bolesti. Njihova je sinteza provedena Wittigovom reakcijom (Shema 5). Uzet je komercijalno dostupan 4-nitrobenzaldehyd za pripremu Wittigovog reagensa koji dalje reagira s 3,5-dimetoksibenzaldehidom u otopini natrijeva metoksida pri 0°C dajući derivat rezveratrola. Zatim se nitro skupina reducira kositrovim(II) kloridom do amino skupine kako bi se mogao dobiti karbamatni derivat rezveratrola. Reakcijom s 2-hidroksi-5-dimetilaminobenzaldehidom dobiva se prvi odabrani derivat A. Demetiliranjem tog spoja u prisutnosti borovog tribromida pri -20°C dobiva se 3,5-dihidroksi-derivat B.



Shema 5. Sinteza derivata rezveratrola A i B.

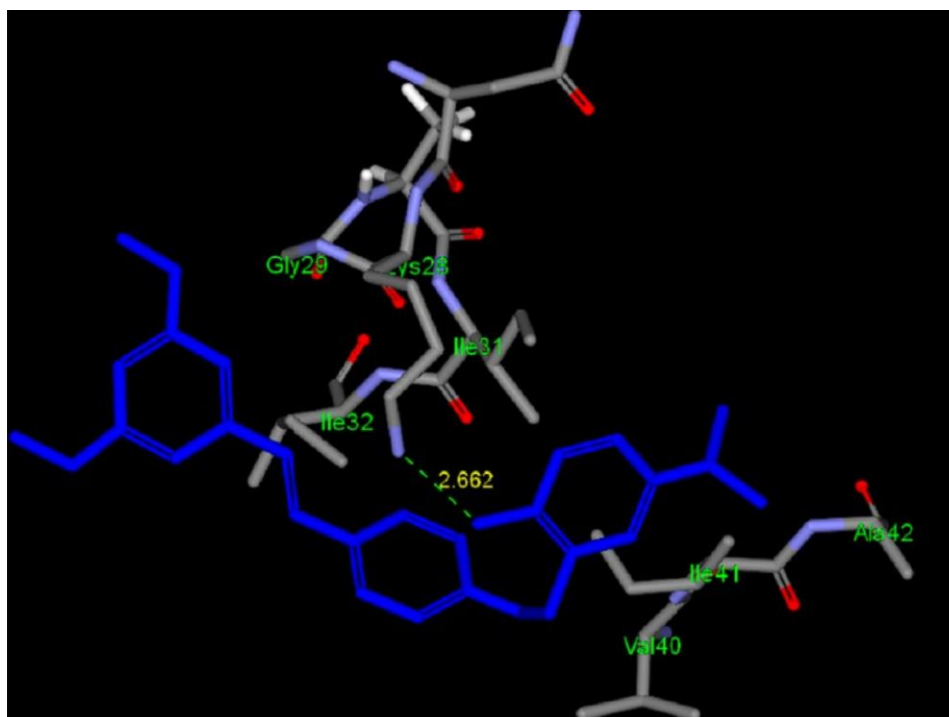
Proučavana je inhibicijska aktivnost dobivenih derivata rezveratrola protiv nakupljanja β -amiloida koristeći tioflavin T (ThT) fluorescencijsku analizu. Rezveratrol i kurkumin služili su kao referentni spojevi. Ovime su derivati A i B potvrđeni kao najsposobniji inhibitori od sintetiziranih spojeva. Vrijednosti IC_{50} iznosile su im redom $7,56 \mu\text{M}$ za A te $6,51 \mu\text{M}$ za B, dok je ona rezveratrola iznosila $15,11 \mu\text{M}$. Upravo su ovakvi rezultati inhibicije nakupljanja β -amiloida i snažnog antioksidacijskog djelovanja, potaknuli dodatne analize derivata A i B kao potencijalnih lijekova za Alzheimerovu bolest. Transmisijskim elektroničkim mikroskopom (TEM) odlično se vizualno prikazala djelotvornost inhibicije nakupljanja β -amiloida u vlakna koja iznimno utječu na neurotoksičnost β -amiloida (Slika 4). Nakon inkubacije od 24 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, samostalni β -amiloidni peptidi nakupili su se u dobro definirana vlakna, dok su oni u prisutnosti derivata A i B, u istim uvjetima, pokazali manju količinu formiranih vlakana.



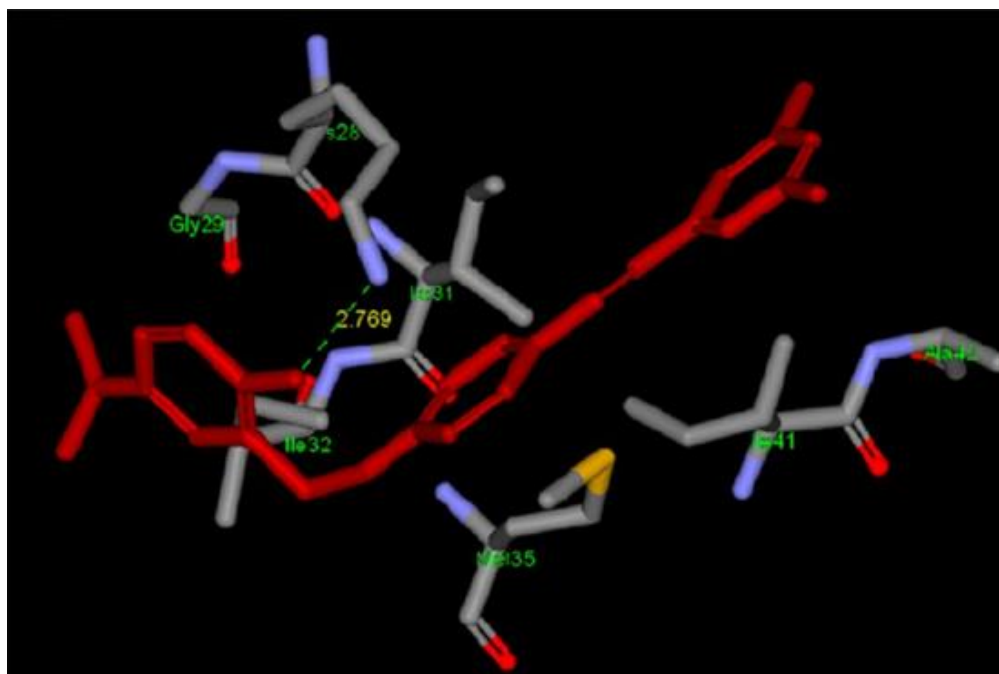
Slika 4. TEM analiza nakupljanja $A\beta_{1-42}$ u prisutnosti derivata A i B.

(a) $A\beta_{1-42}$ ($25 \mu\text{M}$), 0 h **(b)** $A\beta_{1-42}$ ($25 \mu\text{M}$) i A ($20 \mu\text{M}$) inkubirani na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h **(c)** $A\beta_{1-42}$ ($25 \mu\text{M}$) i B ($20 \mu\text{M}$) inkubirani na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h **(d)** $A\beta_{1-42}$ ($25 \mu\text{M}$) i rezveratrol ($20 \mu\text{M}$) inkubirani na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h **(e)** $A\beta_{1-42}$ ($25 \mu\text{M}$) i CQ ($20 \mu\text{M}$) inkubirani na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h **(f)** samo $A\beta_{1-42}$ ($25 \mu\text{M}$) inkubiran na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 h.

Važno je i utvrđivanje kelirajućeg djelovanja derivata A i B. Ta je sposobnost keliranja biometala, poput bakra(II), željeza(II, III) i cinka(II), proučavana UV/Vis spektroskopijom. Naime, dodatkom bakrova(II) sulfata u otopinu derivata A, maksimum apsorpcije pomaknut je s 339 nm na 348 nm, dajući do znanja da se formira A-Cu(II) kompleks. Keliranje metala onemogućuje metal-inducirano nakupljane β -amiloida. Apsorpcijski spektar derivata B također se znatno razlikovao od onog bez dodatka metalnog iona. Djelotvornost keliranja metalnog iona derivatima A i B provjerena je spomenutim metodama ThT i TEM analize čime su ponovno dobiveni zadovoljavajući rezultati. Daljnim proučavanjem bioloških svojstava derivata A i B, testirala se sposobnost inhibicije dvaju enzima, monoamin-oksidaze B (MAO-B) te acetilkolinesteraze (AChE). Molekulskim je pristajanjem (engl. *docking*) utvrđeno da izabrani derivati na aktivnom mjestu molekule MAO-B zauzimaju slične konformacije (Slike 5 i 6). Oba inhibitora tvore dvije vodikove veze s proteinskim ostacima. Utvrđeno je umjereno inhibiranje AChE.



Slika 5. Prikaz vodikove veze između spoja A (plavo) i ostatka Lys28 označen zelenom linijom, dobiven molekulskim pristajanjem.



Slika 6. Prikaz vodikove veze između spoja B (crveno) i ostatka Lys28 označen zelenom linijom, dobiven molekulskim pristajanjem.

Intramolekulsko antioksidacijsko djelovanje derivata A i B provedeno je uz referentnu molekulu Trolox, na stanicama SH-SY5Y, uz prethodnu provjeru citotoksičnosti pri odabranoj koncentraciji od 10 μ M. Spomenute stanice izložene su *tert*-butil-hidroperoksidu koji im znatno podiže oksidativni stres. Rezultati pokazuju značajnije antioksidacijsko djelovanje derivata A i B od referentne molekule. Testom akutne toksičnosti potvrdila se sigurnost uzimanja sintetiziranih derivata A i B. Kliničkim testiranjem na miševima, oralnom primjenom od tri različite doze utvrđeno je kako nije došlo do razvijanja nikakve akutne toksičnosti ili smrtnosti tokom i nakon uzimanja doza.²⁸

Zbog netopljivosti ovog spoja, upotreba sustava temeljenih na nanotehnologiji predložena je za ugradnju rezveratrola u organizam. Tako su dizajnirani nanonosači rezveratrola za intranazalnu, oralnu ili parenteralnu primjenu isporuke rezveratrola do mozga.³⁷

2.6. Antidijabetičko djelovanje rezveratrola

Dijabetes melitus (DM) je skupina kroničnih metaboličkih bolesti karakteriziranih hiperglikemijom, a uzrokovana je kombinacijom genetskih i okolišnih čimbenika. Postala je jedna od glavnih kroničnih nezaraznih bolesti koje utječu na zdravlje ljudi diljem svijeta. Nepravilno liječenje ili loša kontrola prehrane kod dijabetičara često rezultira nizom ozbiljnih komplikacija, kao što su dijabetička nefropatija, neuropatija, retinopatija i kardiomiopatija. Trenutno je doživotna primjena antidijabetika univerzalni pristup liječenja dijabetesa zbog nesagledivo dugog tijeka i neizlječive prirode bolesti. Zato se pojavljuje sve veći znanstveni interes za upotrebom rezveratrola u kontroli šećera u krvi i borbi protiv dijabetesa te njegovih komplikacija. Zbog višestrukog djelovanja rezveratrola na stanične funkcije, on postaje obećavajuća molekula za liječenje dijabetesa i dijabetičkih komplikacija. U kliničkim ispitivanjima na ljudima, oralna primjena jedne doze ili dnevna primjena rezveratrola (5 mg - 5 g) tijekom 12 mjeseci smanjuje glukozu u krvi i povećava osjetljivost na inzulin kod dijabetičara. Ovi rezultati sugeriraju da je postprandijalna koncentracija glukoze značajno smanjena bez povećanja proizvodnje inzulina i stoga se potvrđuje povećanje inzulinske osjetljivosti nakon primjene rezveratrola. Rezultati također sugeriraju da rezveratrol može obnoviti nenormalno stanje razine inzulina, inzulinu-sličnom faktoru rasta (IGF) te glukoze u krvi aktiviranjem AMP-ovisne protein kinaze (AMPK) i sirtuina.³⁸

2.7. Antikancerogeno djelovanje rezveratrola

S produljenjem životnog vijeka povećava se i broj slučajeva malignih bolesti pa je vrlo poželjan razvoj novih lijekova protiv raka. Antikancerogeno djelovanje rezveratrola uključuje različite mehanizme kao što su apoptoza i autofagija.³⁹ Rezveratrol također potiče angiogenezu i metastazu za ubijanje stanica raka. Pokazao se i snažnim aktivatorom Notch puta, tako što je potisnuo rast stanica u HTh7 i 8505C ljudskim staničnim linijama raka štitnjače. Potaknula se apoptoza i zaustavljanje staničnog ciklusa specifičnog za S-fazu promjenom regulacije transkripcije i funkcionalne ekspresije proteina Notch1.

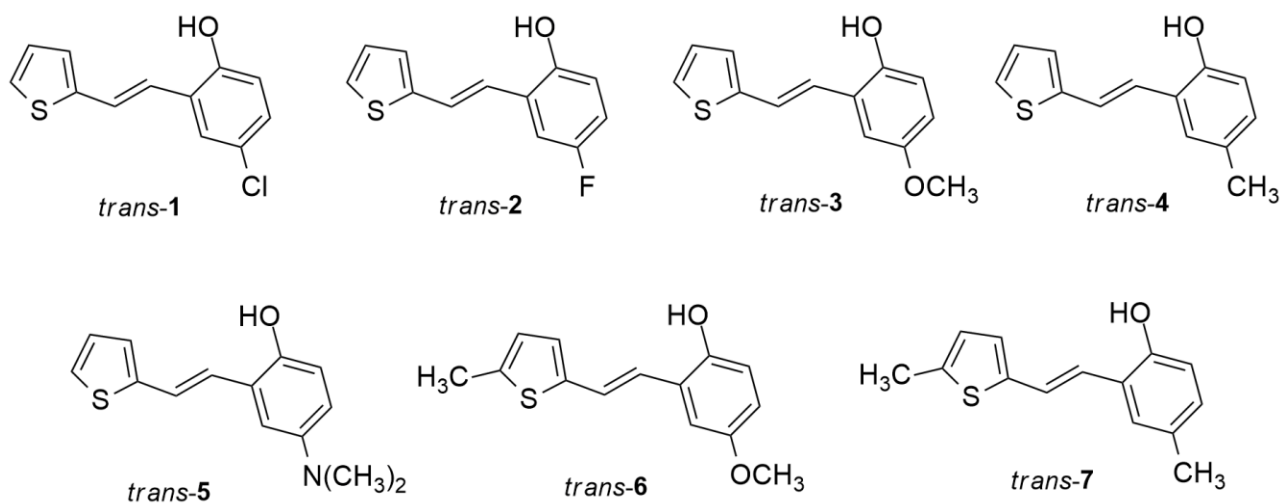
2.8. Protuupalno djelovanje rezveratrola

Novija istraživanja otkrila su kako rezveratrol sprječava upalu potiskivanjem različitih signalnih putova kao što su NLRP3/kaspaza-1/IL-1 β , IL-18 i TLR4/MyD88/NF- κ B. Rezveratrol također smanjuje oštećenje organa nakon traumatskih i šok-stanja, različitim unutarstaničnim signalnim putovima, poput regulacije SIRT1 ili NF- κ B. Kardioprotektivni učinci rezveratrola postižu se njegovom sposobnošću uklanjanja ROS-a. Rezveratrol može prijeći krvno-moždanu barijeru (BBB) s dobrim sigurnosnim profilom i smanjiti aktivnost mikroglija, glavnog razloga upala središnjeg živčanog sustava. Neuroupale ključno doprinose poremećajima povezanim s neuronima kao što su Alzheimerova bolest, traumatske ozljede, moždani udar, Parkinsonova bolest, multipla skleroza i Huntingtonova bolest. Utvrđen je i utjecaj rezveratrola na smanjenje degranulacije, respiratornog udara, stanične adhezije i ekspresije integrina u aktiviranim neutrofilima.⁴⁰

3. Rezultati i rasprava

3.1. Pregled sintetiziranih spojeva

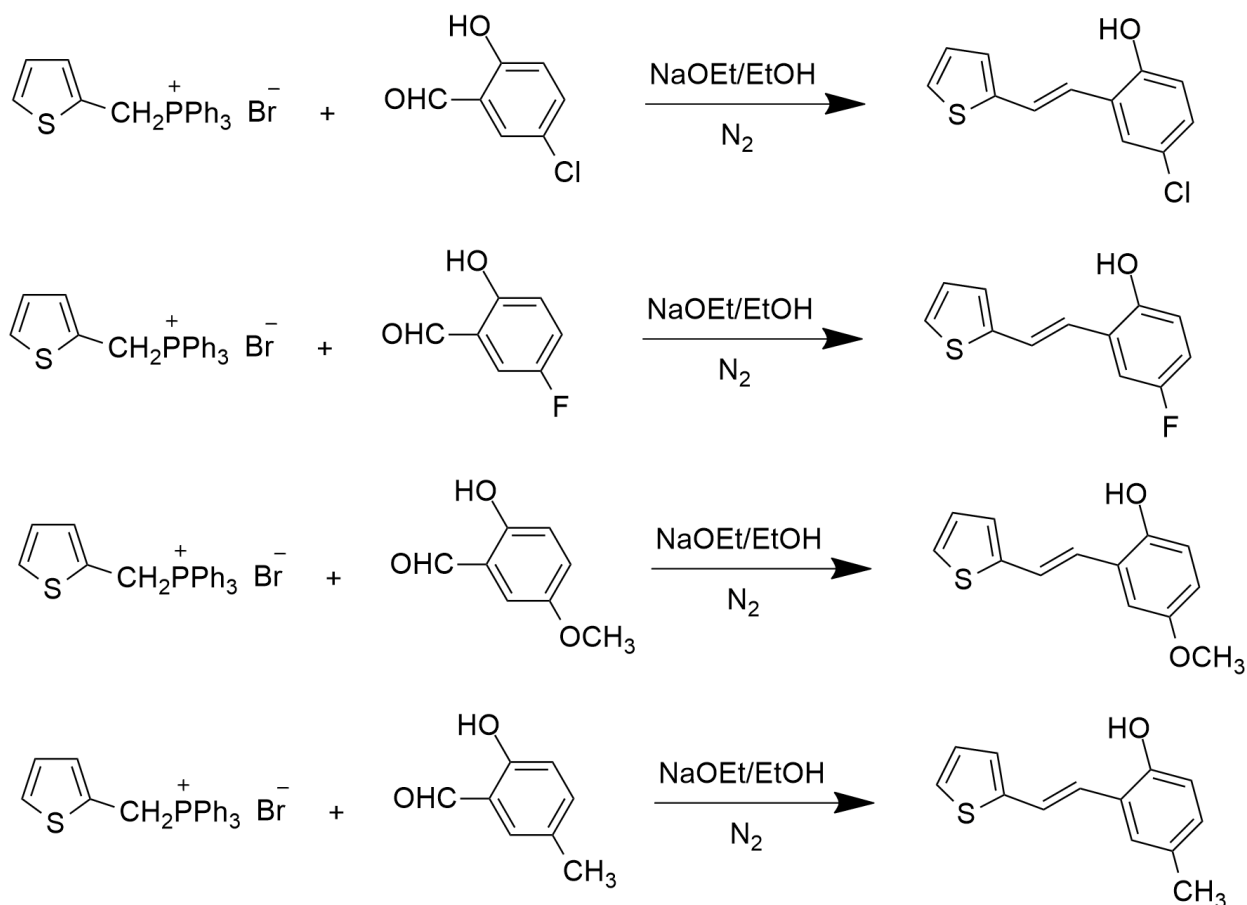
Sintetiziran je niz novih rezveratrolnih derivata s različitim supstuentima na benzenskom i tiofenskom dijelu molekula. Odabirom odgovarajućeg aldehida na benzenskom je dijelu mijenjan supstituent u *para*-položaju u odnosu na hidroksilnu skupinu. Tiofenski je dio mijenjan odabirom između dviju soli, nesupstituirane 2-tiofenske te 5-metil-2-supstituirane tiofenske soli. Wittigovom su reakcijom sintetizirani planirani spojevi, temeljem prijašnjih rezultata iz našeg laboratorija. Dobivene su smjese konfiguracijskih izomera s većinskim *trans*-produktima što je rezultat povoljnije termodinamičke stabilnosti (Slika 7; spoj *trans*-5 nije nastao u provedenoj reakciji). Čisti su *trans*-izomeri izolirani te analizirani na vanjskim institucijama s ciljem ispitivanja njihovih antioksidacijskih i inhibicijskih djelovanja prema enzimima kolinesterazama, s obzirom da se radi o analogima poznatog antoksidansa rezveratrola.



Slika 7. Novi rezveratrolni derivati.

3.2. Sinteza i spektroskopska analiza rezveratrolnih derivata *trans*-1–4

Spojevi *trans*-1–4 sintetizirani su Wittigovom reakcijom iz odgovarajućih 5-supstituiranih-2-hidroksibenzaldehida i nesupstituirane tiofenske soli (Shema 6). Sinteza je provedena u struji dušika uz natrijev etoksid kao bazu u etanolu kao otapalu, a trajala je minimalno 48 h. Prema protonskim NMR spektrima dobivene su smjese izomera, s većinskim *trans*-produktom.



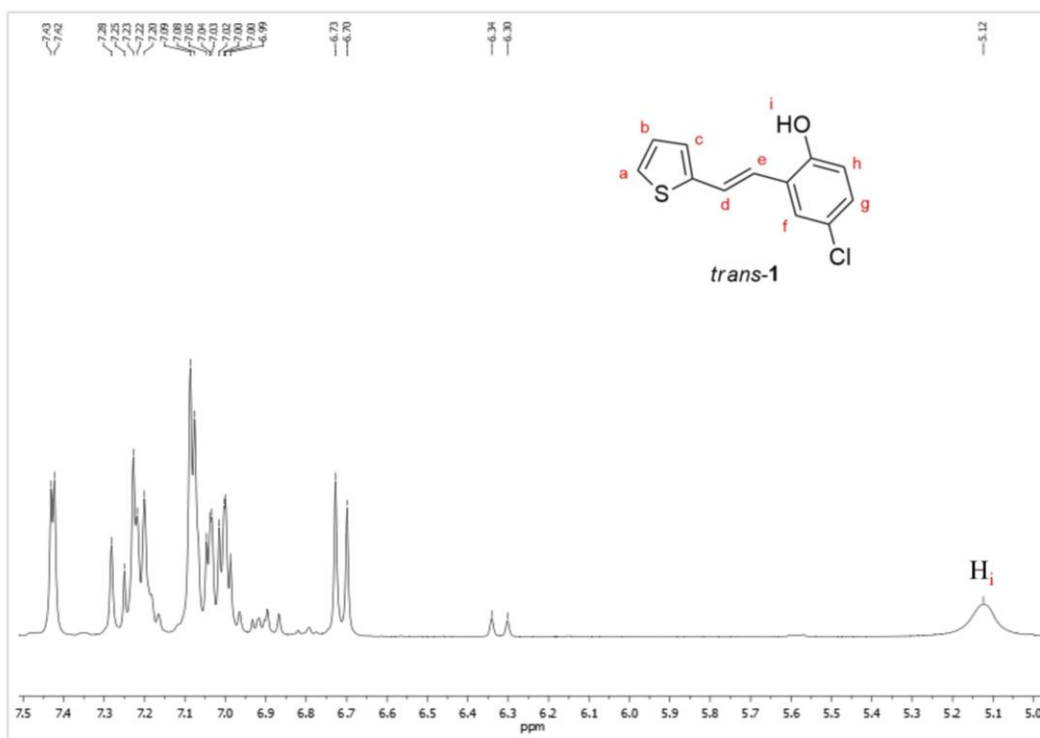
Shema 6. Reakcija sinteze rezveratrolnih derivata *trans*-1–4.

Tankoslojnom kromatografijom (TLC) utvrđena je postojanost produkta, u sustavu otapala petroleter/eter (30 %), usporedbom s odgovarajućim aldehydom. Nadalje, produkt je očišćen ekstrakcijom s diklormetanom (DMC), a *trans*-izomer je odijeljen kolonskom kromatografijom. Pritom je korištena kolona promjera 2 cm, ispunjena s 14 – 16 cm silikagelom, te sustav otapala petroleter/eter promjenjiva omjera. Naknadno je najpovoljnija frakcija kod derivata *trans*-1–3

pročišćena još jednom kolonskom kromatografijom radi dodatnog smanjenja udjela *cis*-izomera. Struktura *trans*-izomera potvrđena je spektroskopskim metodama (Slike 8–19).

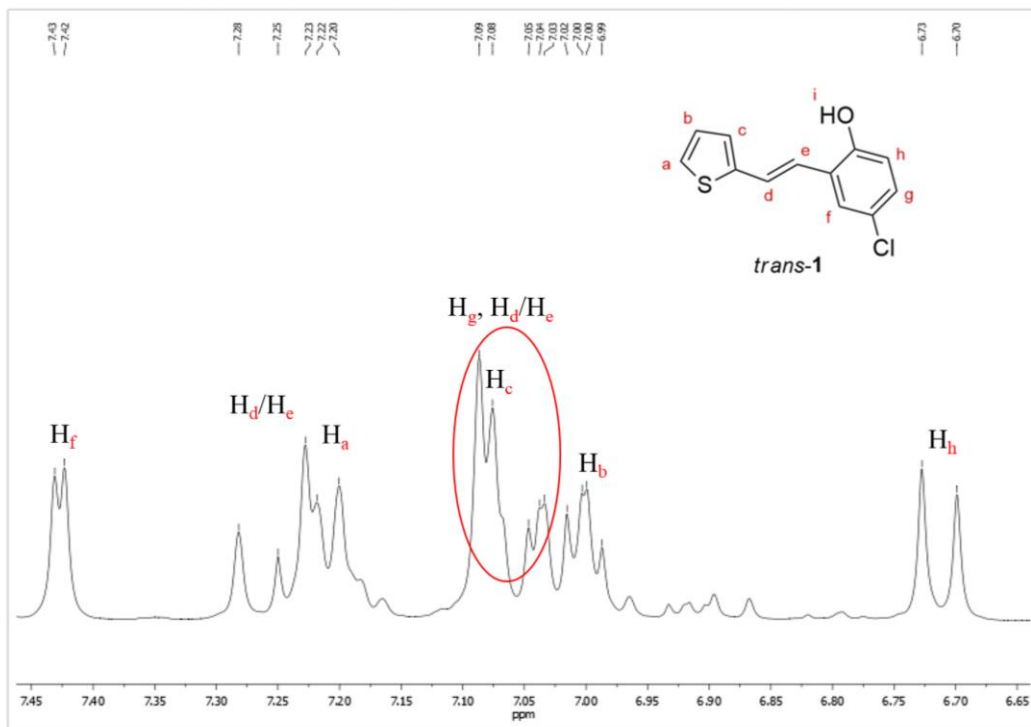
(*E*)-4-klor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-1):

Na ^1H NMR spektru lako se uočavaju signali benzenskih i tiofenskih protona, kao i onih dvostruke veze. Tipičan široki singlet protona H_i hidroksilne skupine uočen je na 5,12 ppm (Slika 8).



Slika 8. ^1H NMR spektar spoja *trans*-1.

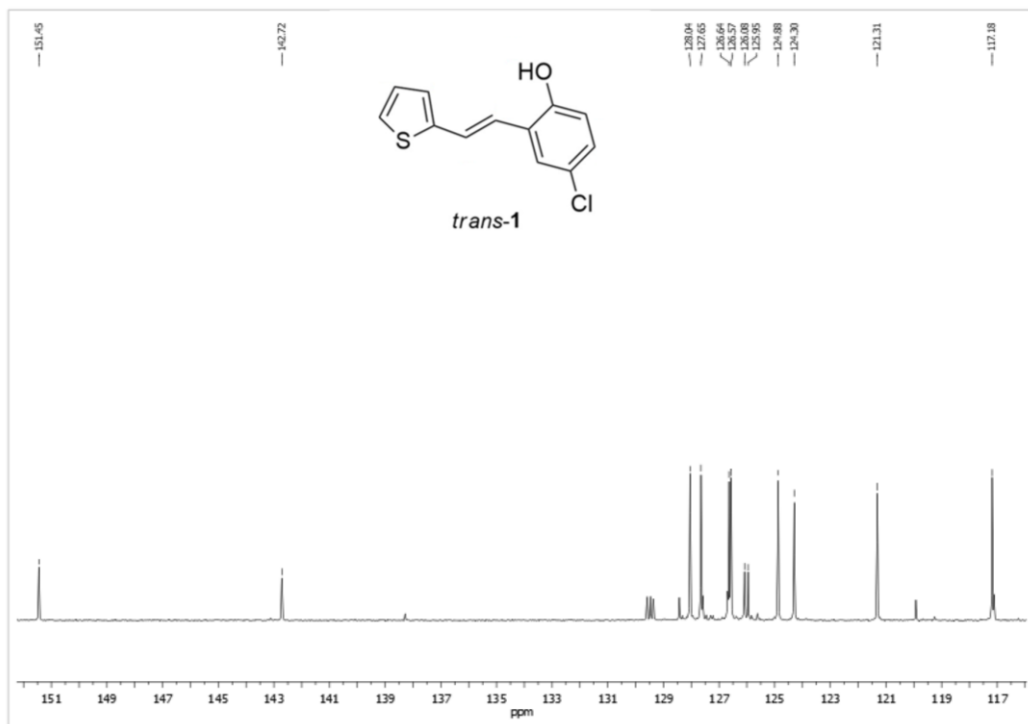
Dublet dvostruke veze s *trans*-konstantom sprege od 16,2 Hz koji odgovara ili protonu H_d ili H_e , vidljiv je na 7,25 ppm (Slika 9). Karakteristična *trans*-konstanta sprege uočena je i u multipletu na području 7,09 – 7,02 ppm, kojem pripadaju dva protona. Prvi je proton onaj dvostruke veze, H_d ili H_e , a drugi je benzenski proton H_g , koji pokazuje *meta*-sprezanje. Proton H_f ne daje očekivani singlet već se spreže daljnom spregom s malom *meta*-konstantom sprege od 2,5 Hz, te je vidljiv kao dublet na 7,43 ppm. Proton H_h daje signal dubleta na 6,71 ppm, s tipičnom aromatskom konstantom sprege od 8,5 Hz.



Slika 9. Uvećani prikaz područja ¹H NMR spektra spoja *trans*-1.

Što se tiče tiofenskih protona, uočena su dva signala dubleta protona H_a i H_c, s karakterističnim konstantama sprega od 5,4 te 3,3 Hz, na 7,21 i 7,08 ppm, s time da se signal protona H_c preklapa sa signalom multiplleta. Isto tako lako se uočava signal dublet-dubleta protona H_b na 7,00 ppm s objema tiofenskim konstantama sprega od 5,1 i 3,7 Hz.

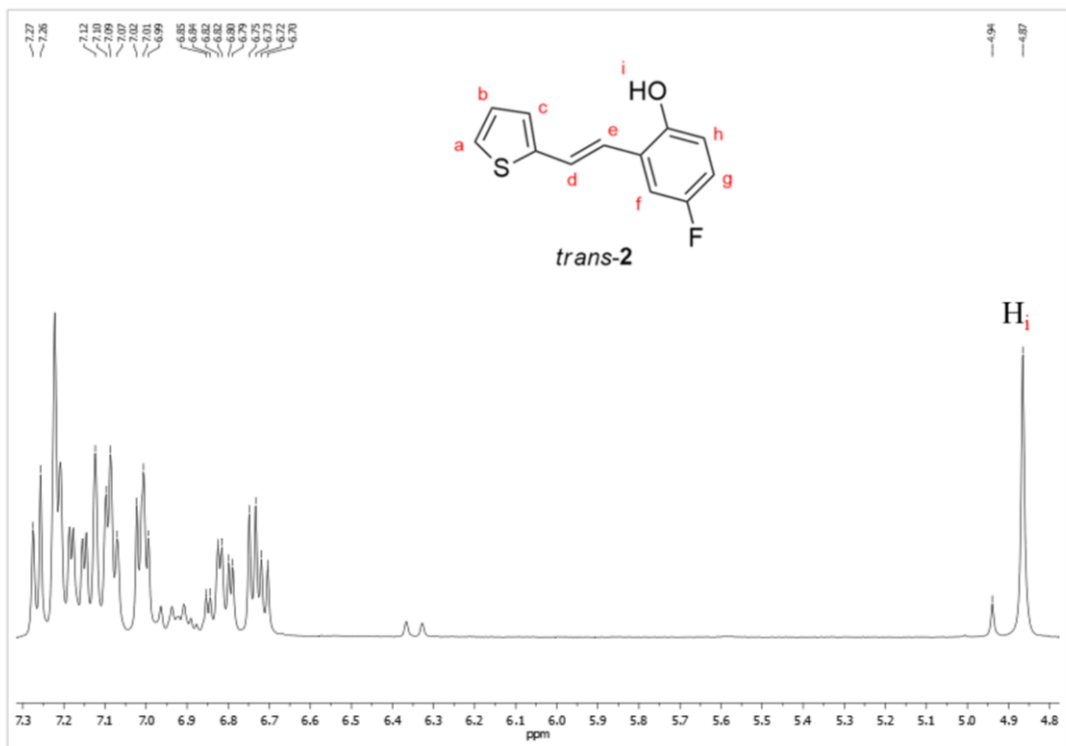
U ¹³C spektru uočeno je 12 signala (Slika 10). Dva najmanje zasjenjena signala pripadaju kvaternim ugljicima benzenskog prstena, na koje su vezani hidroksilna skupina te atom klor, a ostali se signali ne mogu sa sigurnošću razlikovati. Važno je da broj ugljikovih atoma u strukturi odgovara broju signala u spektru spoja *trans*-1.



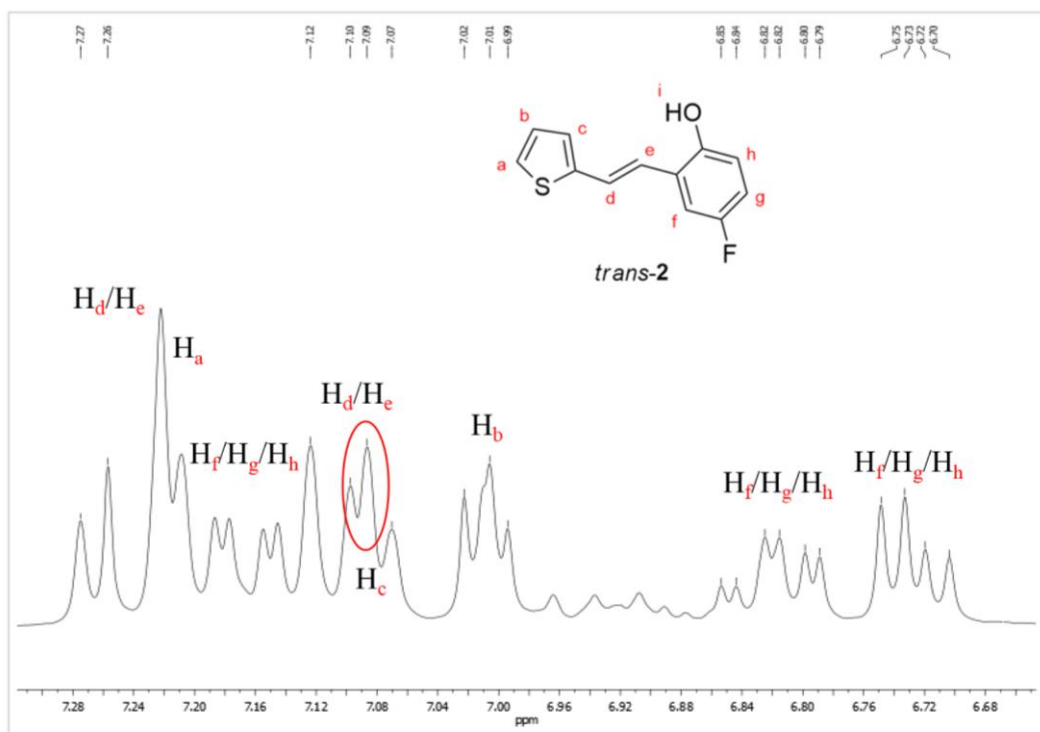
Slika 10. ¹³C NMR spektar spoja *trans*-1.

(*E*)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-2):

Na ¹H NMR spektru spoja *trans*-2 uočen je signal singleta protona H_i na 4,87 ppm, u čijoj se blizini uočava mali pik signala zaostalog kiselog protona aldehida (Slika 11). Protoni tiofenskog dijela molekule daju karakteristične signale na 7,22, 7,09 i 7,01 ppm (Slika 12). Prva dva odgovaraju dubletima H_a i H_c s konstantama sprege od 4,2 i 3,3 Hz, a treći predstavlja dublet-dubleta protona H_b s dvije konstante sprege od 5,0 i 3,6 Hz. Treba naglasiti kako je signal protona H_a preklopljen sa signalom dubleta H_d/H_e. Protoni dvostruke veze, H_d i H_e, daju dva signala dubleta, s *trans*-konstantom sprege od 15,8 i 16,0 Hz, na 7,25 te 7,10 ppm. Benzenski se protoni međusobno spriježu daljnim konstantama sprege dajući signale multiplleta na područjima 7,20 – 7,14 ppm, 6,85 – 6,79 ppm i 6,75 – 6,70 ppm. Nije ih moguće sa sigurnošću razlikovati pa su označeni kao signali s H_f/H_g/H_h.

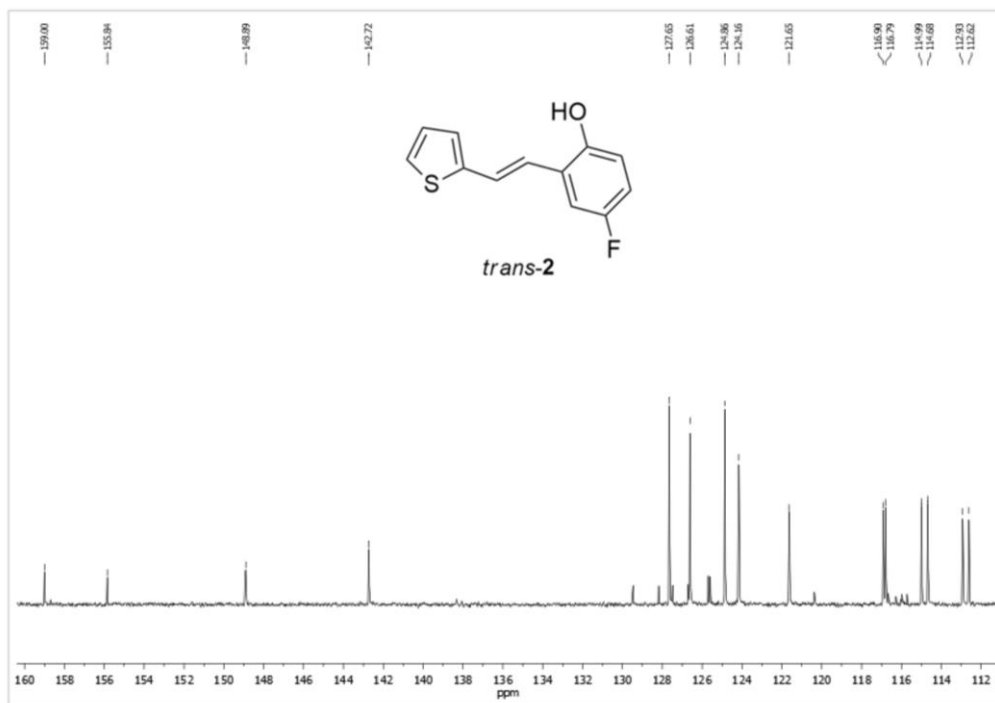


Slika 11. ^1H NMR spektar spoja *trans*-2.



Slika 12. Uvećani prikaz područja ^1H NMR spektra spoja *trans*-2.

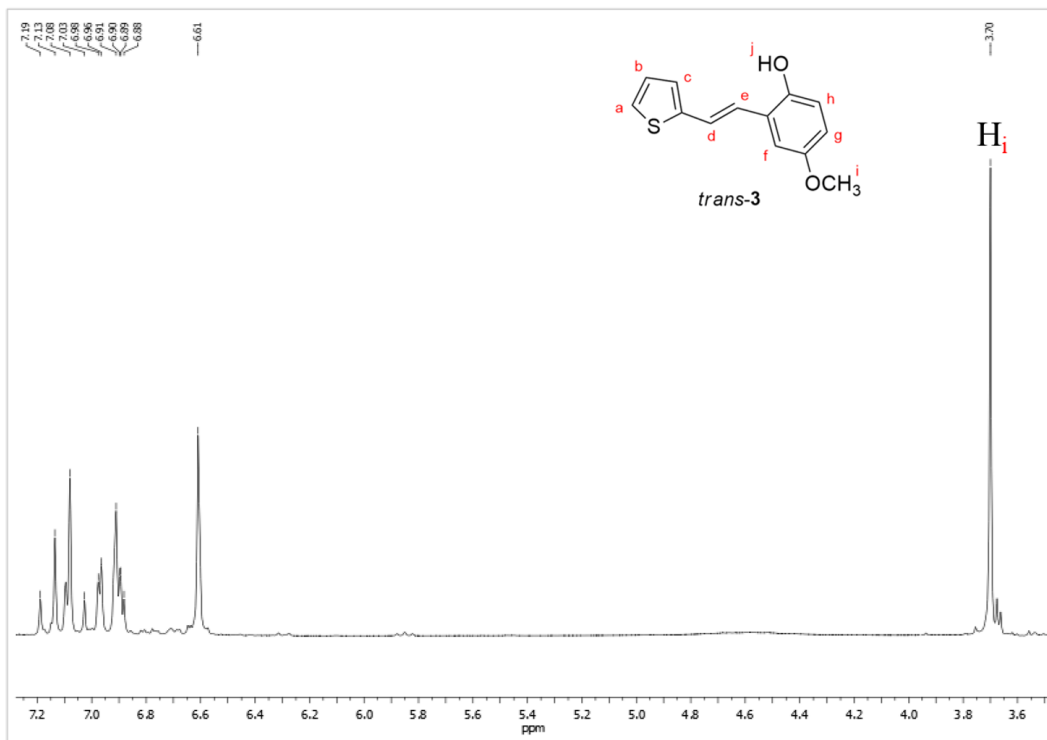
Na ^{13}C NMR spektru se ponovno uočava 12 signala koji se ne mogu u potpunosti razlikovati, ali se može odrediti da dva najmanja signala, na 159,00 i 155,84 ppm, odgovaraju kvaternim ugljicima benzenskog prstena na položajima 1 i 4 (Slika 13).



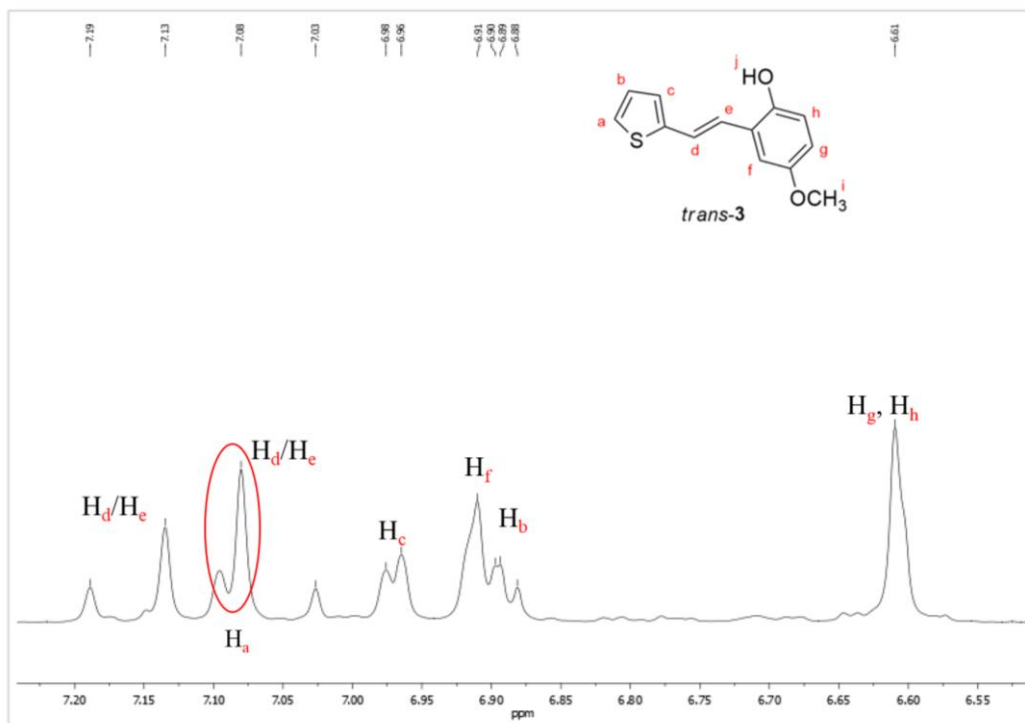
Slika 13. ^{13}C NMR spektar spoja *trans-2*.

(*E*)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-3*):

Na ^1H NMR spektru spoja *trans-3* uočen je signal velikog singleta na 3,70 ppm koji odgovara trima protonima metoksi-skupine, H_i (Slika 14). Nije uočen signal protona H_j , hidroksilne skupine. Tiofenski se proton H_b uočava kao signal dublet-dubleta na 6,88 ppm, ali dolazi do njegovog preklapanja sa signalom singleta protona H_f na 6,91 ppm (Slika 15). Konstante sprege iznose mu 4,8 te 3,8 Hz. Protoni H_a i H_c daju signale dubleta na 7,09 i 6,97 ppm, s time da je onaj protona H_a preklapljen sa signalom dubleta H_d/H_e . Njihove konstante sprege iznose 4,7 i 3,3 Hz. Protoni H_d i H_e daju dva signala dubleta dvostruke veze na 7,16 i 7,05 ppm, s *trans*-konstantom sprege od 16,2, odnosno 16,1 Hz. Benzenski protoni H_g i H_h uočeni su u signalu neuobičajena multipleta na 6,64 – 6,57 ppm.

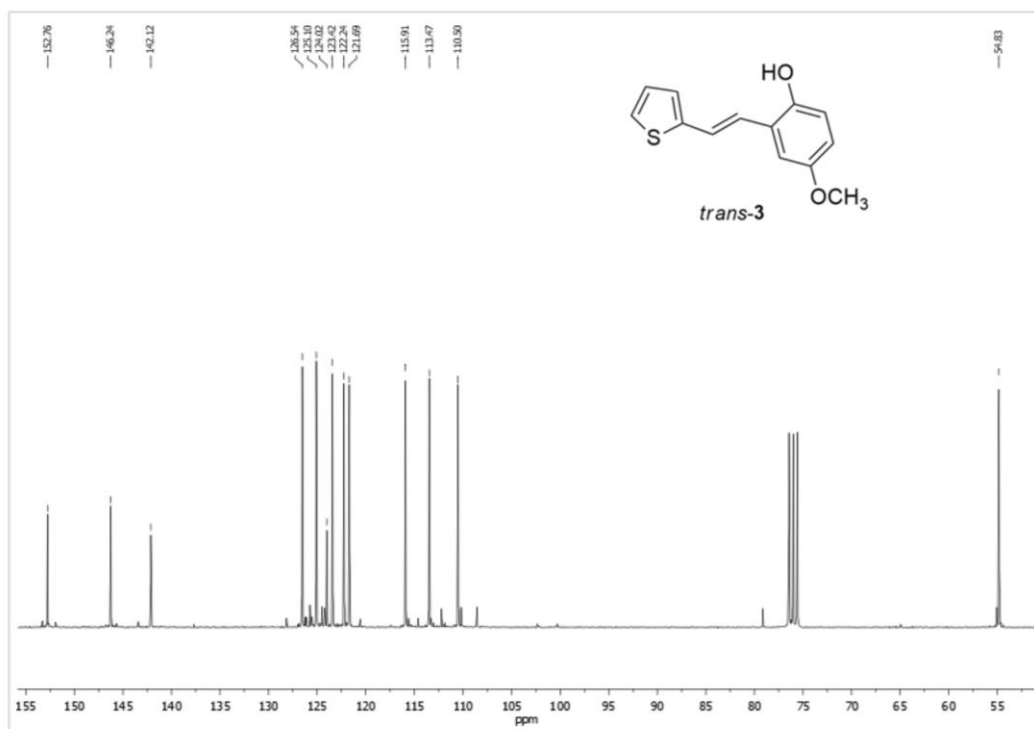


Slika 14. ^1H NMR spektar spoja *trans*-3.



Slika 15. Uvećani prikaz aromatskog područja ^1H NMR spektra spoja *trans*-3.

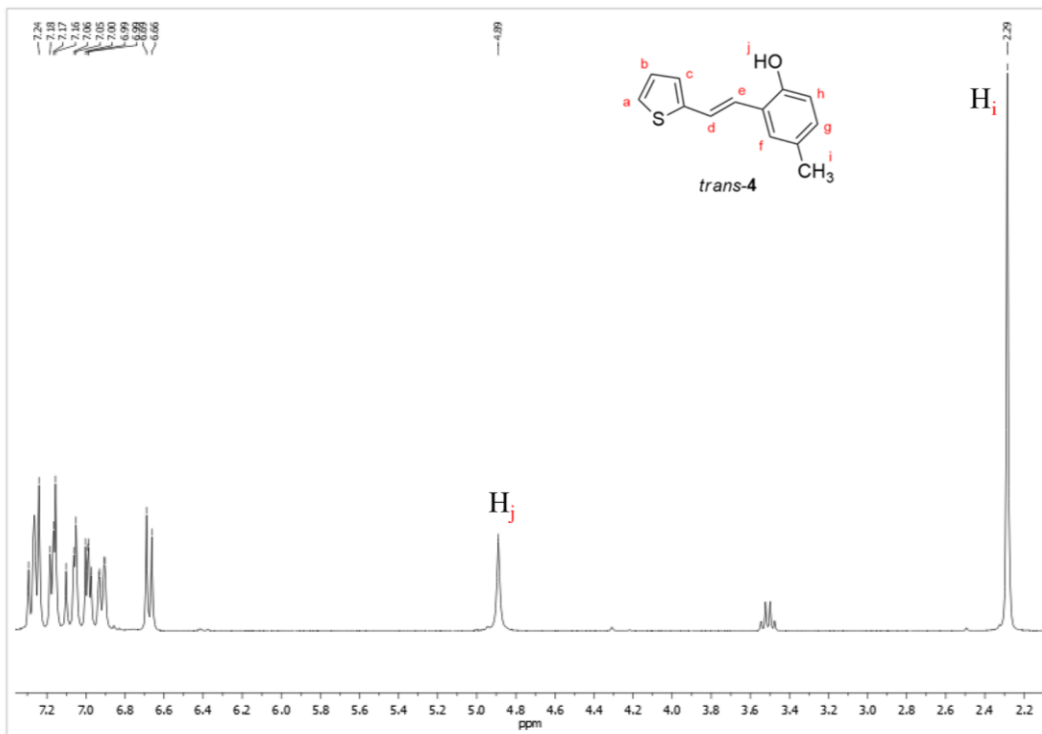
Na ^{13}C NMR spektru prepoznaje se očekivanih 13 signala (Slika 16). Signal na najzasjenjenijem dijelu spektra odgovara ugljiku metoksi-skupine. Četiri najmanja signala odgovaraju kvaternim ugljicima, od kojih oni na nezasjenjenom dijelu odgovaraju benzenskim ugljicima. Za ostale signale ne može se sa sigurnošću odrediti kojim točno ugljicima pripadaju.



Slika 16. ^{13}C NMR spektar spoja *trans*-3.

(*E*)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-4):

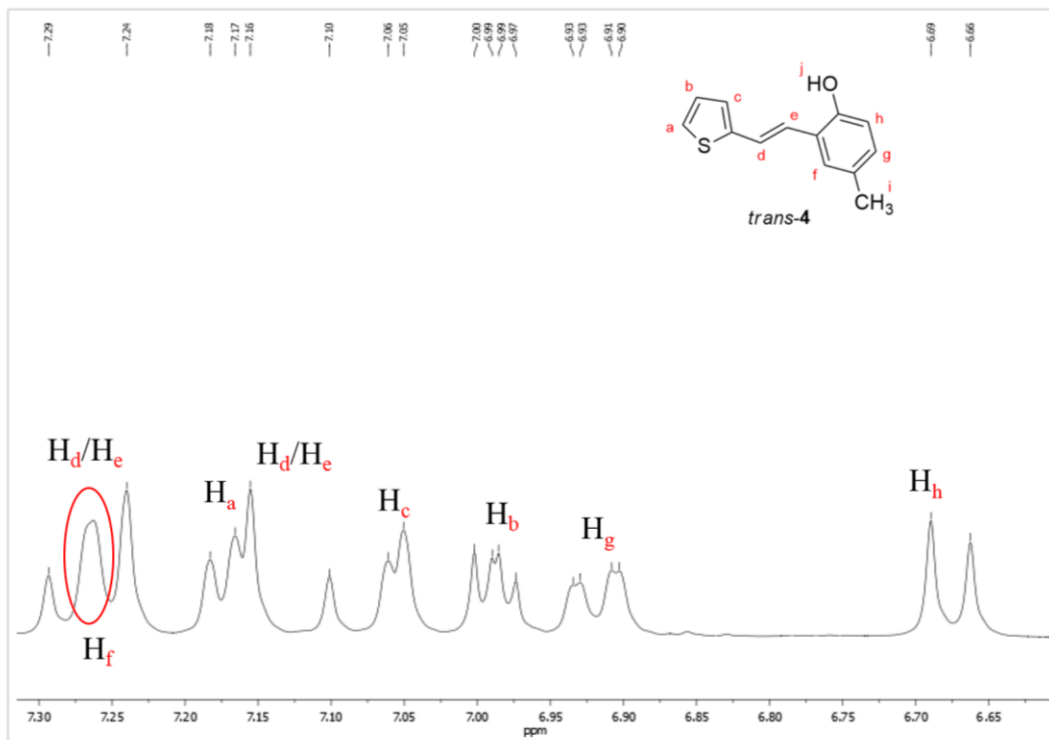
Na ^1H spektru najzasjenjeniji signal pripada singletu protona H_i , metilne skupine, na 2,29 ppm (Slika 17). Uočen je i singlet protona H_j , hidroksilne skupine, na 4,89 ppm. Ponovno se razlikuju sva tri tiofenska protona, H_a , H_b i H_c , sa signalima redom na 7,17, 6,99 i 7,06 ppm (Slika 18). Dubleti protona H_a i H_c daju konstante sprege od 5,1 i 3,1 Hz, a dublet-dubleta protona H_b obje spomenute od 4,9 i 3,6 Hz. Što se tiče benzenskih protona, uočeni su signali dublet-dubleta na 6,92 ppm i dubleta na 6,68 ppm, koji odgovaraju protonima H_g i H_h . Oba signala sadrže karakterističnu aromatsku konstantu sprege, prvi od 8,0 Hz uz malu *meta*-konstantu sprege od 1,5 Hz, te drugi od 8,1 Hz.



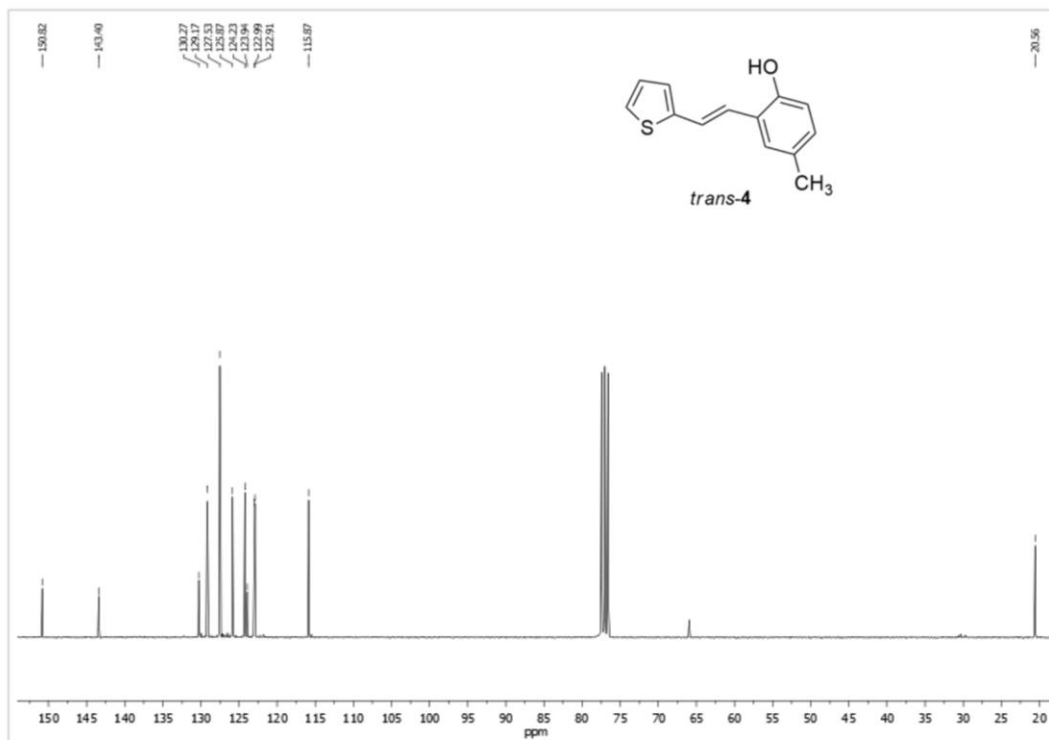
Slika 17. ^1H NMR spektar spoja *trans-4*.

Signal singleta trećeg benzenskog protona, H_f , uočen je na 7,26 ppm te je preklapljen sa signalom otapala CDCl_3 . Uočena su oba signala dubleta dvostruke veze protona H_d i H_e , na 7,27 i 7,13 ppm. Prepoznati su po *trans*-konstanti sprege, koja kod prvog iznosi 16,1 Hz, a kod drugog 16,2 Hz.

^{13}C NMR spektar pokazuje 12 signala umjesto očekivanih 13 (Slika 19). Lako se uočava signal ugljika metilne skupine, na 20,56 ppm te dva signala kvaternih benzenskih ugljika položaja 1 i 4, na 150,82 i 143,40 ppm.



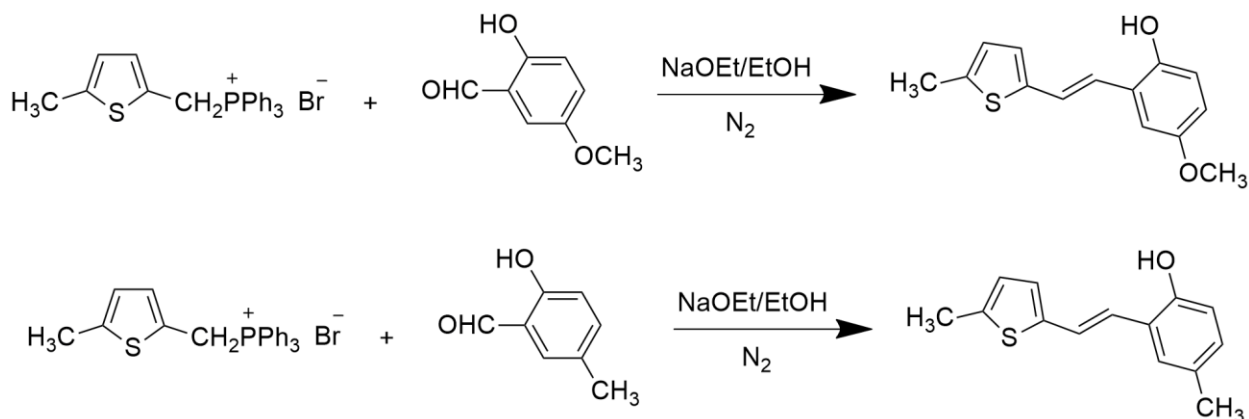
Slika 18. Uvećani prikaz aromatskog područja ^1H NMR spektra spoja *trans*-4.



Slika 19. ^{13}C NMR spektar spoja *trans*-4.

3.3. Sinteza i spektroskopska analiza rezveratrolnih derivata *trans*-6 i *trans*-7

Kod sinteze rezveratrolnih derivata *trans*-6 i *trans*-7 korištena je 5-metil-2-tiofenska sol te redom 5-metoksi-2-hidroksibenzaldehid i 5-metil-2-hidroksibenzaldehid (Shema 7). Postupak je isti kao i prethodno opisani. Wittigovom je reakcijom provedena sinteza u struji dušika uz natrijev etoksid kao bazu u etanolu kao otapalu, duljine trajanja od minimalno 48 h. Ponovno je dobivena smjesa izomera, s time da je *trans*-izomer prema protonskom NMR spektru bio većinski produkt.

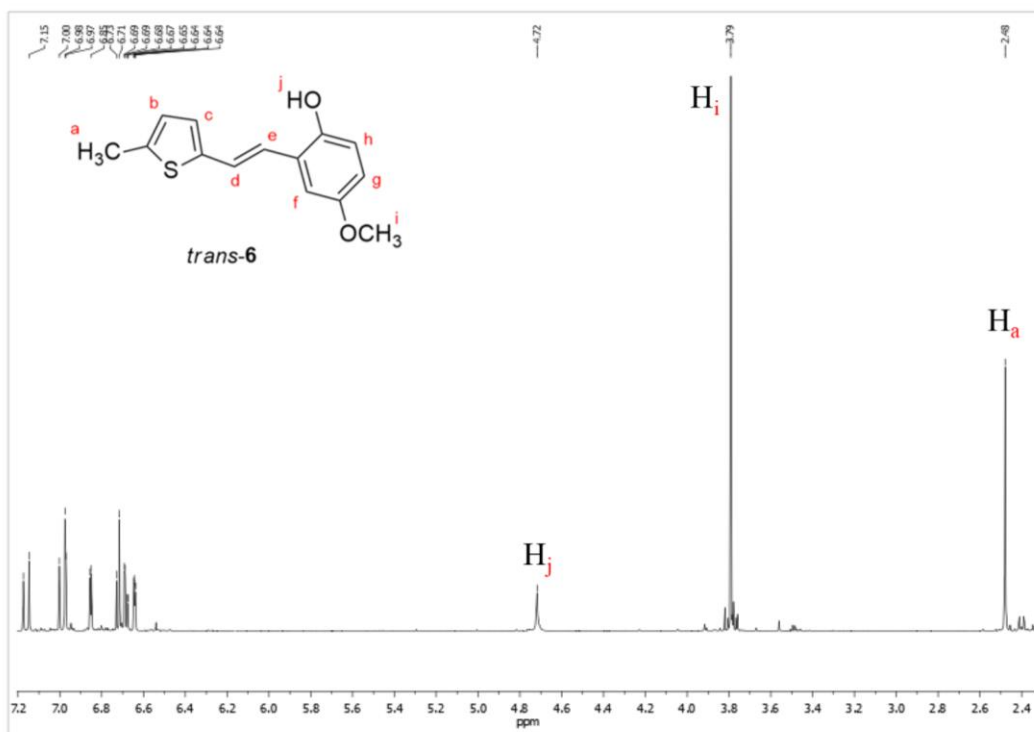


Shema 7. Reakcije sinteze rezveratrolnih derivata *trans*-6 i *trans*-7.

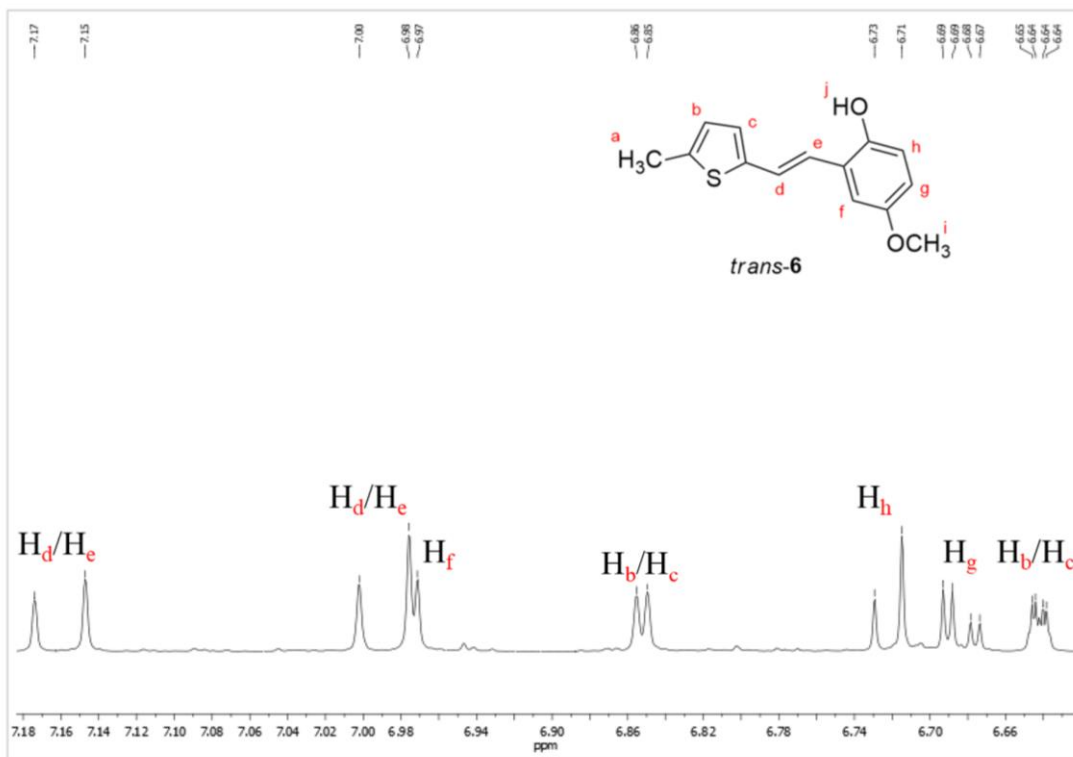
Ponovno se tankoslojnom kromatografijom prvobitno potvrdila postojanost produkta, u sustavu otapala petroleter/eter (30 %), usporedbom s odgovarajućim aldehydom. Nakon čišćenja produkta ekstrakcijom s diklormetanom, *trans*-izomer odijeljen je kolonskom kromatografijom. Korištena je kolona promjera 2 cm, ispunjena s 14 cm silikagelom, a korišteni sustav otapala je petroleter/eter, promjenjiva omjera. Dobivene su frakcije zadovoljavajuće čistoće, odnosno udjela *cis*-izomera manjeg od 5 %, pa nije bilo potrebno ponavljati kolonsku kromatografiju. Struktura *trans*-izomera potvrđena je spektroskopskim metodama (Slike 20–25).

(*E*)-4-metoksi-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-6):

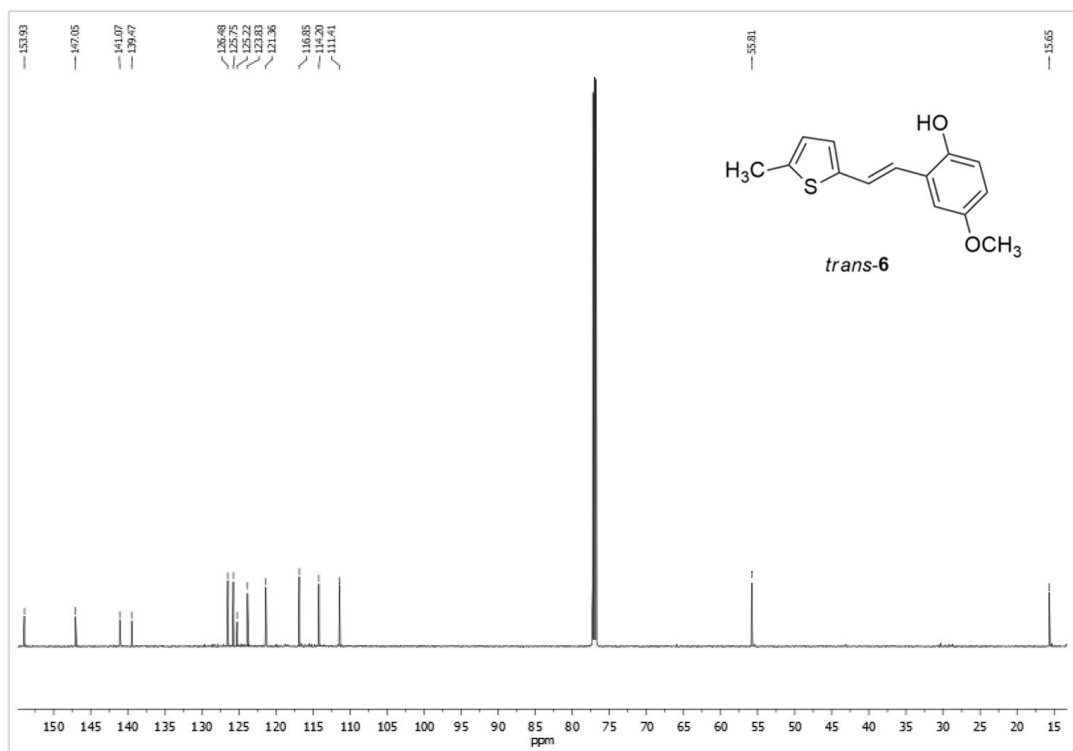
Na zasjenjenom dijelu ^1H NMR spektra uočavaju se dva signala velikih singleta, na 2,48 i 3,79 ppm, koji odgovaraju protonima H_a i H_i , metilne te metoksi-skupine (Slika 20). Uočen je i signal singleta protona H_j , hidroksilne skupine, na 4,72 ppm. Što se tiče tiofenskih protona H_b i H_c , uočeni su signali dubleta na 6,85 ppm i dublet-dubleta na 6,64 ppm, koji sadrže odgovarajuću konstantu sprege od 3,4 Hz, ali se ne mogu sa sigurnošću razlikovati (Slika 21). Benzenski protoni H_g i H_h pokazuju signale dublet-dubleta na 6,68 ppm, zbog daljnjeg sprezanja, te dubleta na 6,72 ppm. Karakteristična aromatska konstanta sprege kod oba spomenuta signala iznosi 8,7 Hz, a kod dublet-dubleta je uočena i *meta*-konstanta od 2,9 Hz. Singlet protona H_f uočen je na 6,97 ppm, s malom *meta*-konstantom sprege od 1,5 Hz. Dva signala dubleta dvostruke veze, protona H_d i H_e , uočena su na 7,16 i 6,99 ppm, s *trans*-konstantama sprege od 16,1 i 15,8 Hz.



Slika 20. ^1H NMR spektar spoja *trans*-6.



Slika 21. Uvećani prikaz aromatskog područja ¹H NMR spektra spoja *trans*-6.

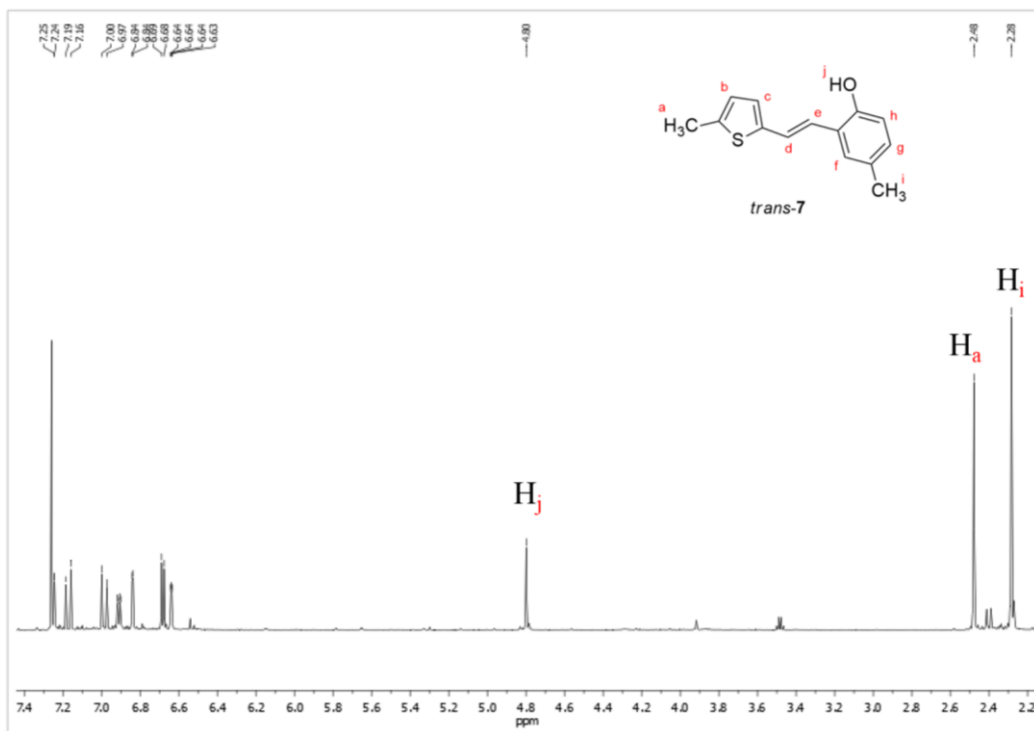


Slika 22. ¹³C NMR spektar spoja *trans*-6.

Na ^{13}C NMR spektru prepoznato je očekivanih 14 signala (Slika 22). Signali metilnog i metoksi-ugljika nalaze se u zasjenjenom dijelu spektra, redom na 15,65 i 55,82 ppm. S druge strane, oni najmanji signali, benzenskih kvaternih ugljika s položajima 1 i 4, sigurno se nalaze na nezasjenjenoj strani spektra. Ostali se signali ne mogu sa sigurnošću razlikovati bez dodatnih dvodimenzijskih tehnika.

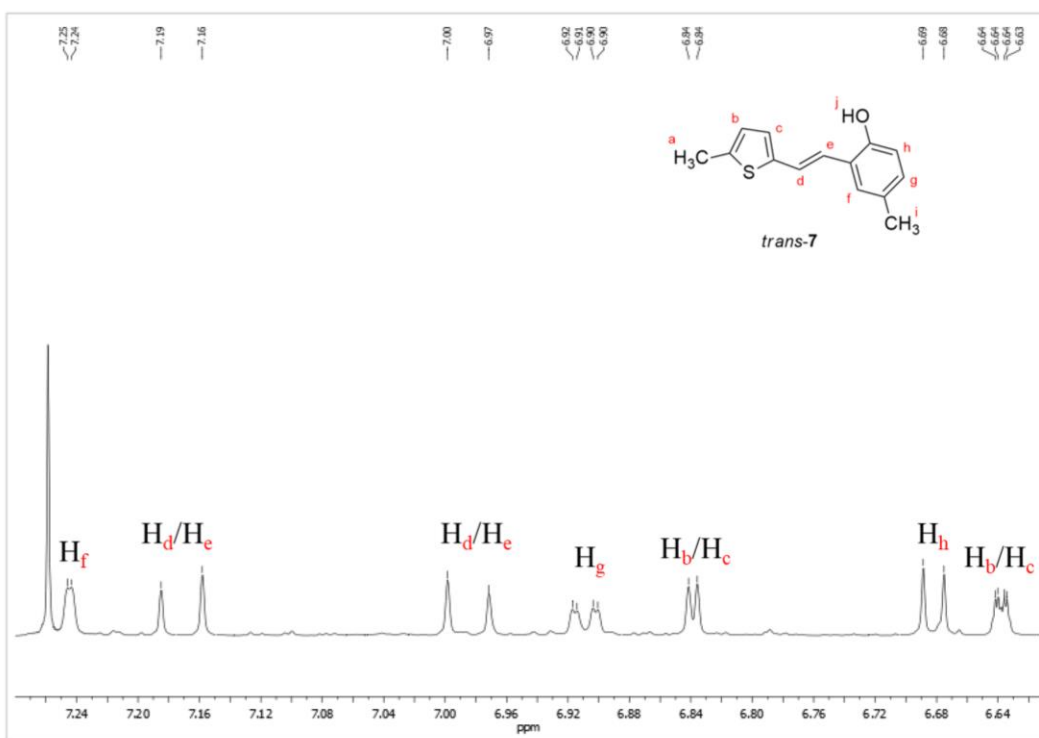
(*E*)-4-metil-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-7):

Na ^1H spektru uočavaju se dva signala singleta metilne skupine na 2,28 i 2,48 ppm (Slika 23). Protonu H_i odgovara prvi signal, a protonu H_a drugi, zbog utjecaja blizine atoma sumpora. Proton H_j hidroksilne skupine daje singlet na 4,80 ppm. Tiofenski protoni H_b i H_c daju signale dubleta i dublet-dubleta na 6,84 i 6,64 ppm (Slika 24). Oba sadrže karakterističnu konstantu sprege od 3,4 Hz, a dublet-dubleta sadrži i malu spregu od 1,1 Hz.



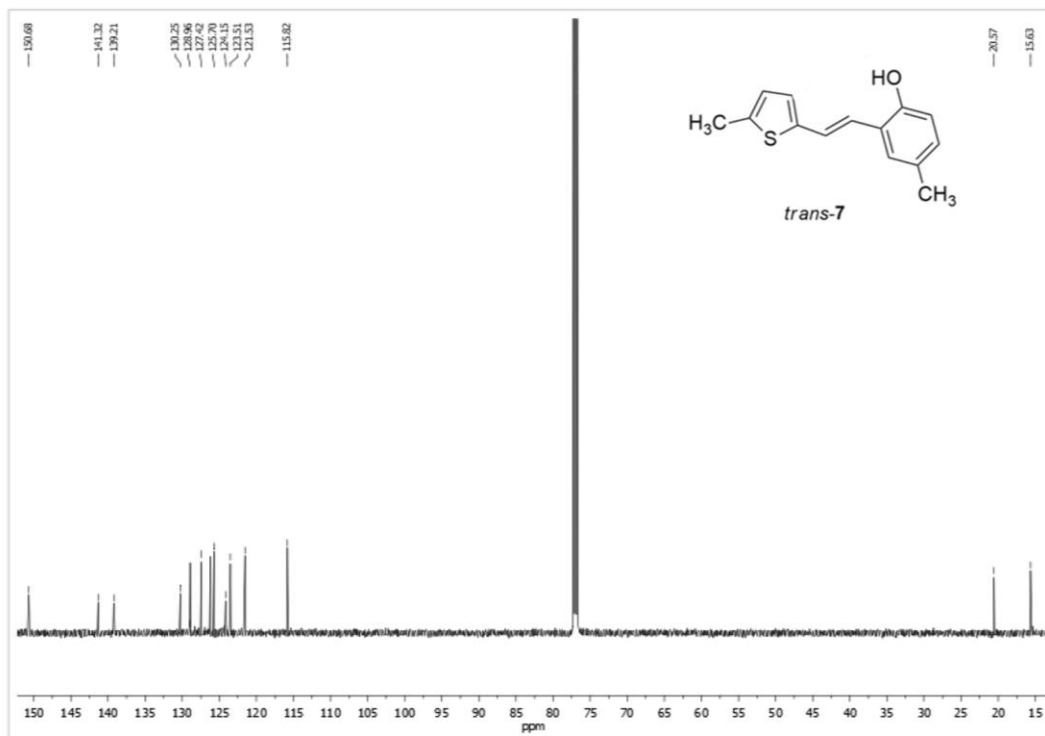
Slika 23. ^1H NMR spektar spoja *trans*-7.

Benzenski proton H_f daje signal dubleta na 7,24 ppm s malom *meta*-konstantom sprege od 1,5 Hz, a protoni H_g i H_h signale dublet-dubleta na 6,91 ppm te dubleta na 6,68 ppm. Sadrže jednaku aromatsku konstantu sprege od 8,1 Hz, dok dublet-dubleta ima i *meta*-spregu od 1,8 Hz. Konačno, protoni dvostruke veze daju dva dubleta na 7,17 i 6,98 ppm, s *trans*-konstantom sprege od 16,1 Hz.



Slika 24. Uvećani prikaz aromatskog područja ^1H NMR spektra spoja *trans*-7.

Pronađeno je svih 14 signala u ^{13}C NMR spektru (Slika 25). Ponovno se daju uočiti signali metilne skupine, i to na 15,64 i 20,57 ppm, te signali kvaternih ugljika benzenskog dijela molekule, na nezasjenjenom dijelu spektra.



Slika 25. ^{13}C NMR spektar spoja *trans-7*.

Svim sintetiziranim i izoliranim rezveratrolnim derivatima *trans-1-4* te *trans-6* i *trans-7*, strukture su potvrđene i masenom spektrometrijom, a njihova je čistoća dokazana HRMS (engl. *High Resolution Mass Spectrometry*) analizama (vidjeti Eksperimentalni dio).

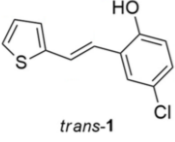
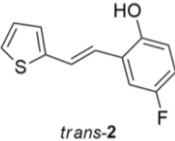
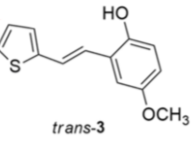
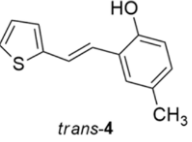
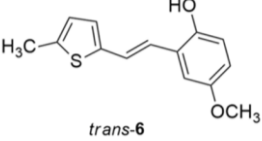
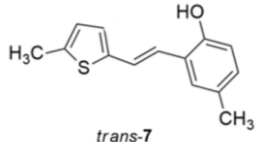
3.4. Antioksidacijska aktivnost i inhibicija kolinesteraze novih derivata rezveratrola

Novim je rezveratrolnim derivatima *trans-1-4*, *trans-6* i *trans-7* procijenjena antioksidacijska aktivnost te mogućnost inhibicije acetilkolinesteraze (AChE) te butirilkolinesteraze (BChE). Dvije antioksidacijske spektrofotometrijske metode, DPPH i CUPRAC, primijenjene su za određivanje antioksidacijskog potencijala. Za nove derivate rezveratrola, prikazani su maksimalni postotci inhibicije i njihove odgovarajuće koncentracije (Tablica 1).

Inhibitorni učinak novih rezveratrolnih derivata na enzime eeAChE i aqBChE ispitivan je korištenjem modificirane Ellmanove metode. Spojevi su testirani u širokom rasponu koncentracija te ukoliko je inhibicija bila veća od 50 %, izračunata je vrijednost IC_{50} . Dobiveni rezultati uspoređivani su s referentnim lijekom galantaminom. Analiziran je utjecaj vrste i položaja supstituenata na fenolnom dijelu molekule te utjecaj supstituenta na tiofenskom prstenu (Tablica 2).

DPPH je najčešće korištena metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti različitih potencijalnih antioksidansa. DPPH je stabilan organski radikal sposoban prihvatiti elektron ili vodikov radikal te se transformirati u neradikalni oblik, DPPH-H. Postotak neutralizacije radikala koristi se kao mjera antioksidacijske sposobnosti spoja. Postotci inhibicije izraženi su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija. Vrijednosti IC_{50} su izračunate za komponente koje su postigle više od 50% neutralizacije DPPH radikala. Derivati rezveratrola s *ortho*-OH skupinom i elektron-donirajućim metoksi- i metilnim skupinama na *meta*-položaju fenolnog prstena (*trans-3*, *trans-4*, *trans-6* i *trans-7*) pokazali su jaču antioksidacijsku aktivnost od standardnog rezveratrola. Njihove IC_{50} vrijednosti kretale su se od 23,8 do 51,4 μ M sljedećim redoslijedom: *trans-6* > *trans-7* > *trans-3* > *trans-4*. Utvrđeno je da metilna skupina na tiofenskim prstenovima nema utjecaja na antioksidacijsku aktivnost. Prisutnost halogenih atoma na fenolnom prstenu (*trans-1* i *trans-2*) smanjila je antioksidacijsku aktivnost.

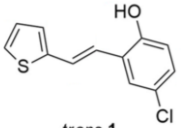
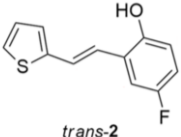
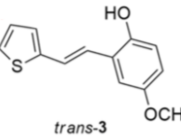
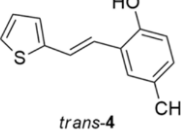
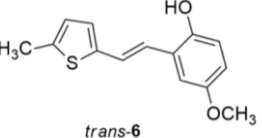
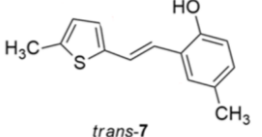
Tablica 1. Antioksidacijski potencijal rezveratrolnih derivata *trans-1–4*, *trans-6* i *trans-7*.

Spoj	DPPH		CUPRAC
	IC ₅₀ (μM)	Inhibicija* (%)	mol TE/mol spoja
 <i>trans-1</i>	265,1	65,0 ± 2,4 (500)	0,713
 <i>trans-2</i>	159,2	77,2 ± 0,5 (500)	0,925
 <i>trans-3</i>	36,2	87,7 ± 0,8 (500)	1,111
 <i>trans-4</i>	51,4	90,3 ± 0,6 (400)	0,852
 <i>trans-6</i>	23,8	86,2 ± 2,3 (50)	2,350
 <i>trans-7</i>	26,3	89,3 ± 1,2 (250)	1,148
Rezveratrol	74,0	n.o.**	n.o.**

*Brojevi prikazani u zagradama predstavljaju maksimalno testirane koncentracije u μM. **Nije određeno.

CUPRAC test temelji se na redukciji Cu²⁺ u Cu⁺ zbog djelovanja antioksidansa. Reakcija se odvija pri pH 7,0 (blizina fiziološkog pH) u prisutnosti neokuproina.

Tablica 2. Inhibicija kolinesteraza rezveratrolnih derivata *trans*-1–4, *trans*-6 i *trans*-7.

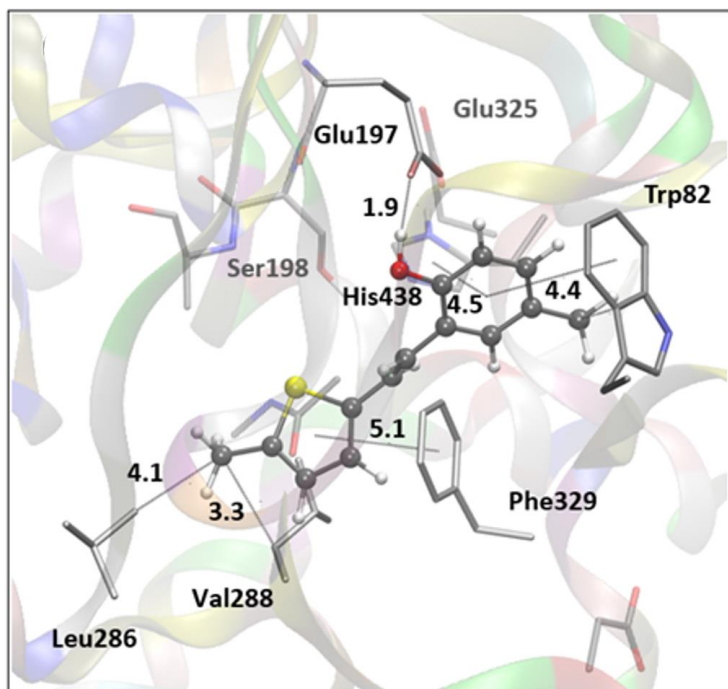
Spoj	eeAChE		eqBChE	
	IC ₅₀ (μM)	Inhibicija* (%)	IC ₅₀ (μM)	Inhibicija* (%)
 <i>trans</i> -1	82,3	83,0 ± 2,5 (250)	53,0	80,4 ± 6,4 (200)
 <i>trans</i> -2	177,7	80,9 ± 1,9 (500)	66,0	83,5 ± 0,8 (400)
 <i>trans</i> -3	404,6	77,8 ± 5,2 (500)	206,4	68,5 ± 6,2 (500)
 <i>trans</i> -4	225,0	82,1 ± 1,1 (250)	36,5	81,1 ± 2,2 (250)
 <i>trans</i> -6	62,9	81,1 ± 1,1 (200)	42,5	83,1 ± 0,8 (200)
 <i>trans</i> -7	92,4	78,2 ± 7,7 (150)	24,8	88,5 ± 5,0 (250)
Galantamin	0,15	n.o.**	7,9	n.o.**

* Brojevi prikazani u zagradama predstavljaju maksimalno testirane koncentracije u μM. **Nije određeno.

Reaktivne aril-OH skupine polifenola i drugih antioksidansa oksidiraju se u odgovarajuće kinone, a Cu^{2+} -neokuproin se reducira u obojeni kompleks Cu^+ -neokuproin. Rezultati CUPRAC testa prikazani su kao molovi Trolox ekvivalenta (TE) po molu ispitivanog spoja. CUPRAC test potvrdio je rezultate DPPH metode, pri čemu su najsnažniji antioksidansi bili spojevi *trans-6* i *trans-7*, nakon kojih su slijedili spojevi *trans-3*, *trans-2*, *trans-4* i *trans-1*.

Novi su rezveratrolni derivati postigli IC_{50} vrijednosti u mikromolarnim koncentracijama, i pokazali uspješnost inhibicije AChE enzima po sljedećem redoslijedu: *trans-6* > *trans-1* > *trans-7* > *trans-2* > *trans-4* > *trans-3*. Uočeno je da spoj *trans-1* s *meta*-Cl supstituentom na polifenolnom prstenu snažnije inhibira AChE u usporedbi sa spojevima s fluoro, metilnim ili metoksi- supstituentima na istom položaju. Osim toga, metilirani tiofeni (*trans-6* i *trans-7*) pokazali su bolju inhibiciju AChE enzima nego njihovi nemetilirani analozi (*trans-3* i *trans-4*). Općenito je utvrđena veća osjetljivost kod BChE na derivate rezveratrola nego kod AChE. Spoj *trans-7* postigao je najvišu inhibiciju BChE s IC_{50} vrijednosti od 24,8 μM . Prethodno je molekulsko pristajanje (engl. *docking*) pokazalo da metilirani tiofen doprinosi boljoj interakciji spoja s Trp82 na aktivnom mjestu BChE.

Na temelju rezultata mjerenja zaključuje se kako spoj *trans-7* ima značajnu antioksidacijsku aktivnost, kao i sposobnost inhibicije kolinesteraze, pa je odabran kao spoj za molekulsko pristajanje (Slika 26). Time se vizualizirala struktura kompleksa liganda (molekula spoja *trans-7*) i aktivnog mjesta enzima BChE, te su identificirane nekovalentne interakcije odgovorne za stabilnost kompleksa, koje utječu na potencijal inhibicije.



Slika 26. Struktura aktivnog mjesta BChE u kompleksu s molekulom spoja *trans-7*.

Molekularno pristajanje spoja *trans-7* u aktivno mjesto BChE rezultiralo je strukturom prikazanom na slici 26. Hidroksilna skupina rezveratrolnog derivata *trans-7* sudjeluje u stvaranju vodikove veze s Glu197 anionske poddomene. His438 je u nekovalentnoj interakciji s fenilnim prstenom liganda. Obje aromatske jezgre u spoju *trans-7*, fenilna i tiofenska, stvaraju nekovalentne π - π interakcije s aromatskim ostacima aktivnog mjesta.

3.5. Genotoksičnost

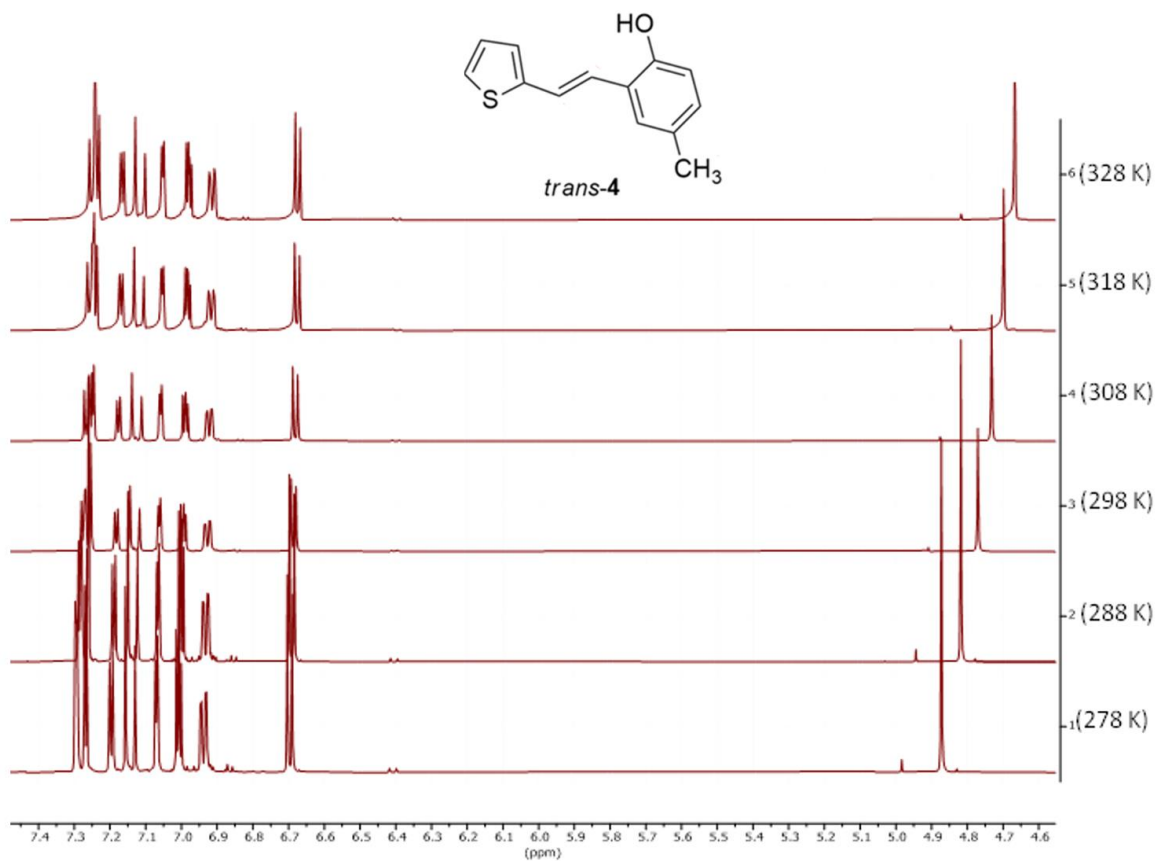
Temeljito istraživanje svih nečistoća koje mogu biti prisutne u aktivnom farmaceutskom sastojku i gotovom farmaceutskom proizvodu od presudne je važnosti za sigurnost lijekova. U okviru nečistoća postoji posebna kategorija, a to su mogući genotoksični spojevi. Potencijalni genotoksični spojevi strože su regulirani i kontrolirani na znatno nižim razinama nego druge nečistoće (ICH M7 smjernice). Razine koje mogu biti prisutne u tvari/proizvodu izračunavaju se na temelju njihovog određenog prihvatljivog dnevnog unosa i maksimalne dnevne doze. Kod novih se spojeva prihvatljivi dnevni unos, obično ne određuje odmah toksikološkim studijama na životinjama, već se procjene prvenstveno obavljaju korištenjem *in silico* Q(SAR) alata. (Q)SAR modeli predviđaju biološku aktivnost na temelju strukturnih komponenti te su posebno važni u ranim fazama pretraživanja potencijalno aktivnih farmaceutskih tvari. Eliminacija svih spojeva koji mogu imati mutagena svojstva štedi novac i vrijeme. Alat koji se najčešće koristi u tu svrhu je softver Lhasa (Nexus v.2.5.2, Sarah Nexus v.3.2.1, Derek Nexus v.6.2.1) jer sadrži dva komplementarna modela te su njihova predviđanja naknadno još pregledana. U slučaju spojeva *trans-1-4* te *trans-6* i *trans-7*, rezveratrol je korišten kao sredstvo za utvrđivanje najbližeg poznatog spoja koji se koristi kao lijek (Tablica 3). Derek Nexus nije pronašao strukturna upozorenja niti za jedan derivat. Kod Sarah Nexusa su neki od tih spojeva izvan područja primjene što nije iznenađujuće za vrlo nove sintetičke spojeve kojima se tek počinje istraživati biološka aktivnost. Rezultati spoja *trans-7* za Sarah Nexus ukazuju da se on može smatrati negativnim na genotoksičnost, a oni spoja *trans-1* da je pak pozitivan. Stoga je spoj *trans-7* najbolji kandidat s gledišta sigurnosti za nastavak rane faze razvoja. Spojevi *trans-2*, *trans-3*, *trans-4* i *trans-6* mogli bi se dodatno istražiti ako postanu obećavajući kandidati za lijekove. Tada se može provesti *in vitro* AMES test, dok bi za spoj *trans-1* uz to bilo potrebno provesti i *in vivo* kvalifikacijske studije, kako bi se pokazalo da se može koristiti kao aktivna farmaceutska tvar. Iz perspektive genotoksične sigurnosti i rezultata prikazanih za mjere biološke aktivnosti, čini se da je spoj *trans-7* najbolji kandidat.

Tablica 3. Rezultati Lhasa M7 istraživanja potencijala genotoksičnosti sintetiziranih derivata.

Spoj	ICH M7 razred	procjena Derek	procjena Sarah	ukupno <i>in silico</i>
<i>trans-1</i>	3	■ ■ ■ □	■ □ □ □	Pozitivno
<i>trans-2</i>	5	■ ■ ■ □	□ □ □ □	Negativno
<i>trans-3</i>	5	■ ■ ■ □	□ □ □ □	Negativno
<i>trans-4</i>	5	■ ■ ■ □	□ □ □ □	Negativno
<i>trans-6</i>	5	■ ■ ■ □	□ □ □ □	Negativno
<i>trans-7</i>	5	■ ■ ■ □	■ □ □ □	Negativno

3.6. NMR titracije

Provedena je NMR titracija za spoj *trans-4* tako što je izložen promjenama temperature od 278 do 328 K te je pri svakoj temperaturi zabilježen odgovarajući ¹H NMR spektar (Slika 27). Time su ispitane moguće promjene u konformacijama zbog razbijanja vodikovih veza u molekulama povišenjem temperature. Kao što se i očekivalo, najveća je promjena uočena kod kiselog protona hidroksilne skupine (oko 4,9 ppm) prema više zasjenjenom području. U nezasjenjenom dijelu molekule, protonski se signali pomiču s povećanjem temperature prema zasjenjenijem području, ali ne istim intenzitetom. Najveća pomicanja vidljiva su kod aromatskog protona u neposrednoj blizini hidroksilne skupine te protona na dvostrukoj vezi, koji su i u različitim konformacijama oba relativno blizu hidroksilne skupine. Ova vrsta ispitivanja promjena kemijskih pomaka pod utjecajem temperature jasno pokazuje da postoje intermolekularne vodikove veze između molekula rezveratrolnih derivata u otopinama. One pucaju, čime te molekule postaju fleksibilnije, pa zauzimaju neke druge konformacije. To se odražava u pomicanju signala pojedinih protona koji su najbliži tim promjenama.⁴¹



Slika 27. Prikaz temperaturne ovisnosti kemijskih pomaka karakterističnih protona spoja *trans*-4.

4. Eksperimentalni dio

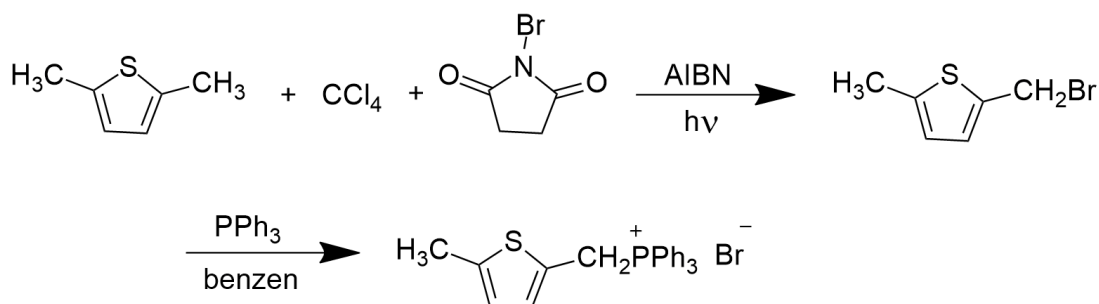
4.1. Opće napomene

Otapala korištena tokom sinteze očišćena su destilacijom, komercijalno su dostupna i pravilno odlagana nakon korištenja. Kolonska kromatografija provedena je na kolonama različitih duljina i promjera, pritom punjenih odgovarajućom količinom silika-gela. Metode nuklearne magnetske rezonancije (NMR), ^1H i ^{13}C , te masene spektrometrije i HRMS korištene su za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće. Spektri ^1H i ^{13}C snimljeni su na Institutu Ruđera Boškovića, instrumentom Bruker Avance 600, na 600 MHz za ^1H , te na 150 MHz za ^{13}C spektre. Sintetizirani spojevi otopljeni su u deuteriranom kloroformu (CDCl_3) kao otapalu za snimanje NMR spektara, a tetrametilsilan (TMS) je korišten kao standard. Kemijski pomaci izraženi su u ppm jedinicama (engl. *parts per million*). U ^1H NMR spektrima uočeni su specifični signali koji ne odgovaraju spojevima, poput signala za vodu u kloroformu na 1,56 ppm, signala za dietil-eter na 1,21 ppm i 3,48 ppm, te signala za kloroform na 7,26 ppm. Specifični signal koji se javlja u svakom ^{13}C NMR spektru sastoji se od tri pika na 77 ppm od CDCl_3 kao otapala, a može se uočiti i signal dietil-etera na 15,20 ppm te na 65,91 ppm.

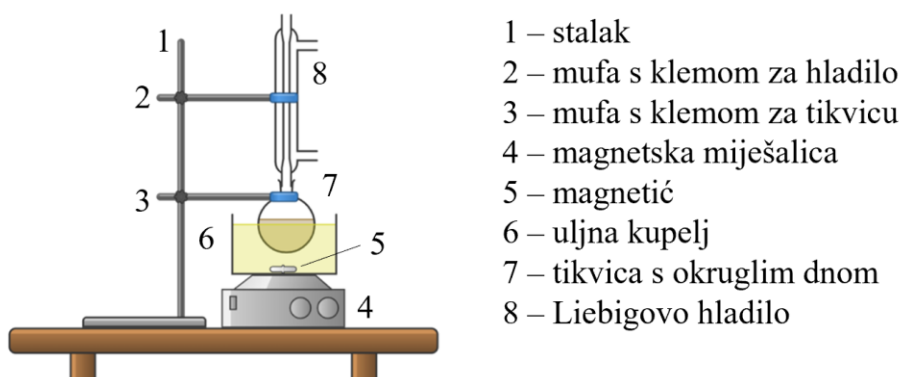
4.2. Sinteza 5-metil-2-tiofenske soli

U laboratoriju je prethodno sintetizirana tiofenska sol korištena kao Wittigov reagens za sintezu rezveratrolnih derivata **1–5**. Uz nju je sintetizirana nova 5-metil-2-tiofenska sol za sintezu rezveratrolnih derivata **6** i **7** (Shema 8). U okrugloj tikvici od 250 mL otopljeno je 4,925 g tekućeg 2,5-dimetiltiofena (0,044 mol) u 133 mL tetraklorugljika (CCl_4) te je dodana ekvivalentna količina *N*-bromsukcinimida (NBS) od 7,835 g (1 eq). Tikvica je učvršćena na aparaturu (Slika 28.) kako bi se smjesa miješala u uljnoj kupelji na temperaturi refluksa (150 °C). Nakon uspostavljanja refluksa, u reakcijsku je smjesu dodan prvi obrok AIBN-a, na vrhu špahtle, te je temperatura smanjena na 100 °C. Nakon što se refluks ustalio, reakcijska smjesa osvijetljena je stolnom lampom radi inicijacije reakcije. Nakon 1,5 h refluksa uočeno je stvaranje odgovarajućeg bromida kao svijetlo-smeđeg taloga na dnu tikvice, te izdvajanje bijelih pahuljastih kristala sukcinimida na površini otopine. Drugi obrok AIBN-a dodan je nakon dodatnih sat vremena te je reakcijska smjesa ostavljena još 3 h na miješanju pri temperaturi refluksa. Zatim je nastali sukcinimid filtriran pomoću naboranog filter papira, dajući bistar narančasti filtrat. Prilikom uparivanja filtrata na

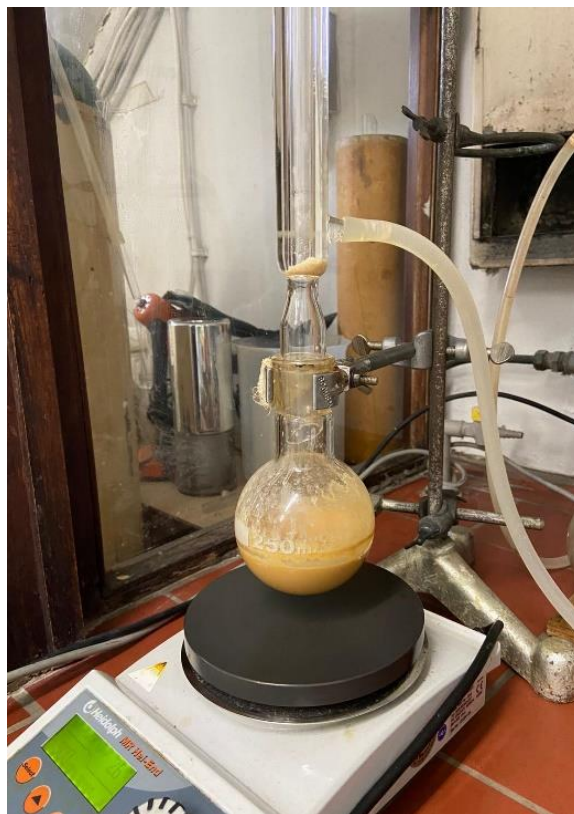
rotacijskom uparivaču, zaostaje smeđi uljasti talog nastalog tiofenskog bromida. No, zbog relativno dugog uparivanja i stajanja u digestoru bez otapala, talog je reagirao iznenadnim stvaranjem ljubičaste pjene i dima. Brzom intervencijom dodano je 50 mL benzena i ekvivalentna količina trifenilfosfina (PPh₃) od 11,527 g, čime je reakcija ponovno dovedena pod kontrolu. Nadalje, reakcijska je smjesa stavljena 1 h na miješanje pri temperaturi refluksa (140 °C) pri čemu se nije moglo uspostaviti idealno vrtložno miješanje. Na kraju je ostavljena reakcijska smjesa samo na miješanju pri sobnoj temperaturi približno 84 h (Slika 29). Nakon toga je vakuum-filtriranjem dobivena sol kremaste boje koja je ostavljena 24 h na sušenju u eksikatoru. Gotova sol pohranjena je u kristalirci pokrivenoj filter papirom u eksikatoru. Dobivena masa 5-metil-2-tiofenske soli iznosi približno 10 g.



Shema 8. Reakcija sinteze 5-metil-2-tiofenske soli.



Slika 28. Aparatura za sintezu 5-metil-2-tiofenske soli.

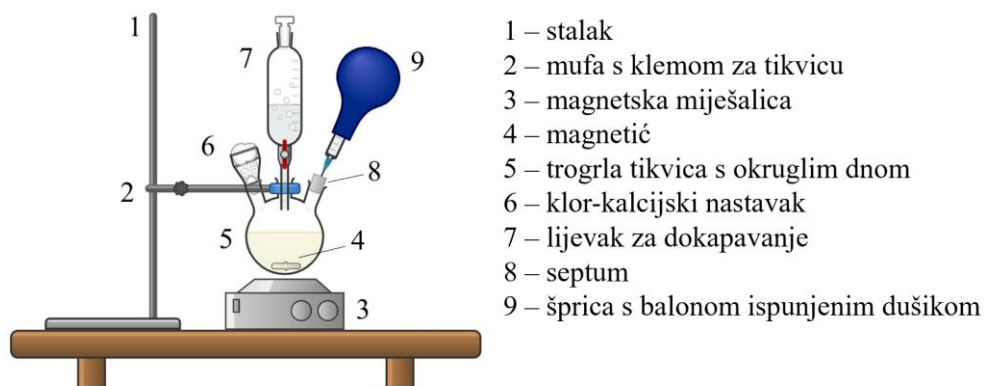


Slika 29. Reakcijska smjesa po završetku sinteze, prije vakuum-filtriranja.

4.3. Sinteza novih rezveratrolnih derivata 1–7

Slijedi opis općenitog postupka sinteze Wittigovom reakcijom te ostalih potrebnih koraka za dobivanje pojedinih *trans*-derivata rezveratrola. Osnovnu aparaturu čine trogrla tikvica od 250 mL, lijevak za dokapavanje od 50 mL, klor-kalcijski nastavak te magnetički za miješanje (Slika 30). Ona se najprije propuhuje strujom dušika 15 minuta, s time da je treće grlo zatvoreno gumenim septumom, a lijevak za dokapavanje staklenim čepom. Po završetku propuhivanja napuni se balon dušikom i stavi na septum tikvice pomoću šprice, kako bi se osigurala inertna atmosfera unutar tikvice. Osnovna se aparatura potom učvrsti na stalak, iznad magnetske miješalice. Zatim se kroz srednje grlo tikvice ulije 40 mL apsolutnog etanola te ekvivalentna odvaga tiofenske soli, pa se namjesti vrtložno miješanje dobivene blijedožute reakcijske smjese, pri sobnoj temperaturi. U lijevak za dokapavanje ulije se 10 mL apsolutnog etanola te se postepeno ubacuju komadići odvage natrija kako bi se dobio natrijev etoksid (NaOEt). Natrij se dodaje u 10 %-tnom suvišku zbog svoje brze oksidacije i tendencije stvaranju sloja NaOH na površini. Zbog natrijeve velike reaktivnosti,

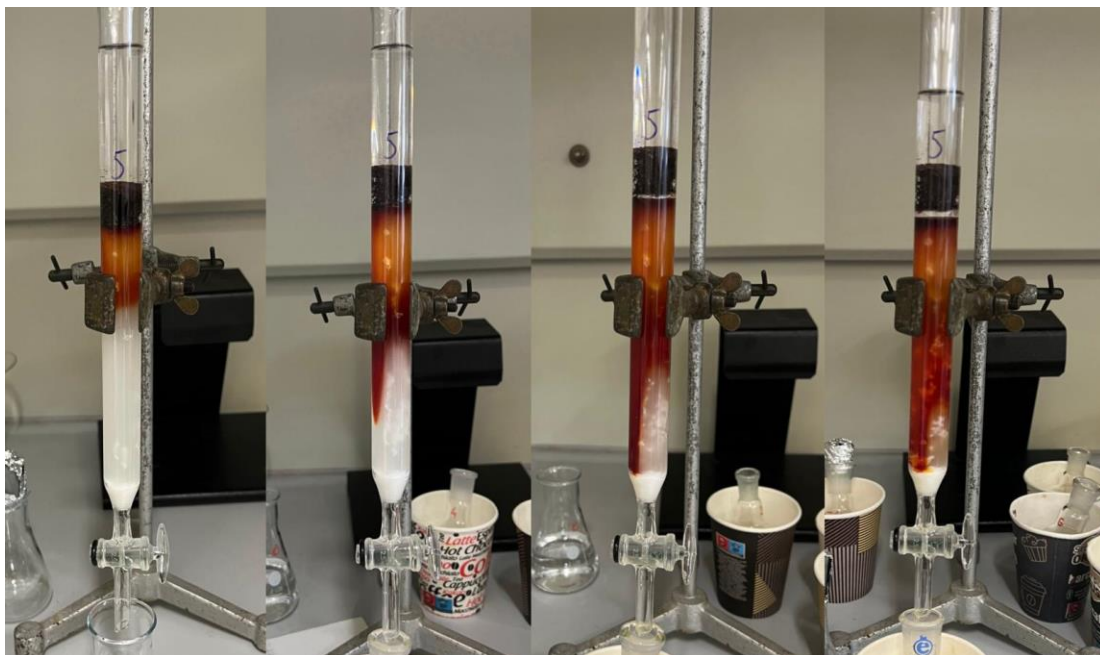
potrebno je oprezno rukovanje i njegovo konstantno držanje u petroleteru kako ne bi bio izložen zraku. Zatim se ulije 2–3 mL pripravljene otopine NaOEt u reakcijsku tikvicu te se doda 0,5 g odgovarajućeg aldehida, što bude praćeno promjenom boje u žutu, narančastu ili smeđu zbog nastanka ilida (Slika 31). Nakon što se ostatak otopine NaOEt dokapa, ukloni se lijevjak te se na srednjem grlu tikvice ostavi stakleni čep. Reakcijsku smjesu potrebno je miješati minimalno 48 h na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je barem jednom tankoslojnom kromatografijom u sustavu petroleter/eter (30 %), usporedbom s odgovarajućim aldehidom, kako bi se uočilo stvaranje produkta te mogući zaostatak aldehida u reakcijskoj smjesi. Na kraju se sadržaj trogrle tikvice prebaci u okruglu tikvicu od 250 mL, ispiranjem s etanolom, kako bi se upario do suhog na rotacijskom uparivaču. Slijedi pročišćavanje dobivenog spoja ekstrakcijom. Lijevjak za odjeljivanje napuni se s 40-ak mL destilirane vode, a dobiveni spoj se u njega prebaci otapanjem i ispiranjem s 40-ak mL diklormetana. Miješanje i odvajanje slojeva provede se tri puta, tako da se donji, organski sloj vraća, a gornji, vodeni sloj mijenja. Pri zadnjoj ekstrakciji, organski se sloj ispusti u čistu Erlenmeyerovu tikvicu s magnezijevim sulfatom (MgSO_4) i ostavlja na sušenju 30 minuta. Dekantiranjem i ispiranjem diklormetanom u okruglu tikvicu, uparava se korišteni DCM na rotacijskom uparivaču i zaostaje čista smjesa izomera produkta. Ona se dalje pročišćava kolonskom kromatografijom na koloni punoj silika-gelom (10–14 cm), koristeći smjesu petroleter/eter (PE/E) promjenjive koncentracije radi razdvajanja dobivenih izomera u frakcijama, tako da na kraju ostaje manje od 5 % *cis*-izomera uz većinski *trans*-izomer pojedinog rezveratrolnog derivata 1–7 (Slika 32). Potvrda strukture i čistoće izoliranih pojedinih *trans*-izomera dobivena je korištenjem ^1H i ^{13}C NMR spektara te MS i HRMS analiza.



Slika 30. Aparatura za sintezu rezveratrolnih derivata.



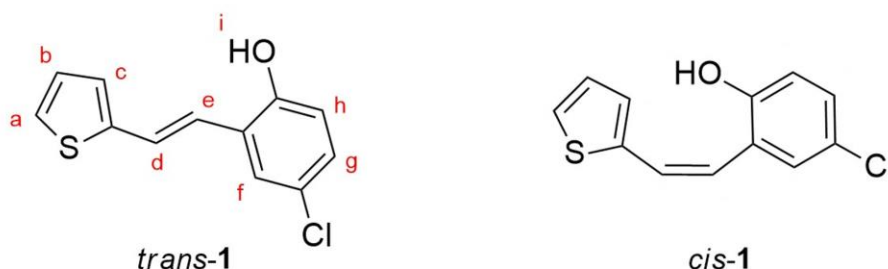
Slika 31. Prikaz aparature te reakcijske smjese prije (lijevo) i nakon dodatka aldehida (desno).



Slika 32. Prikaz tijekom kolonske kromatografije.

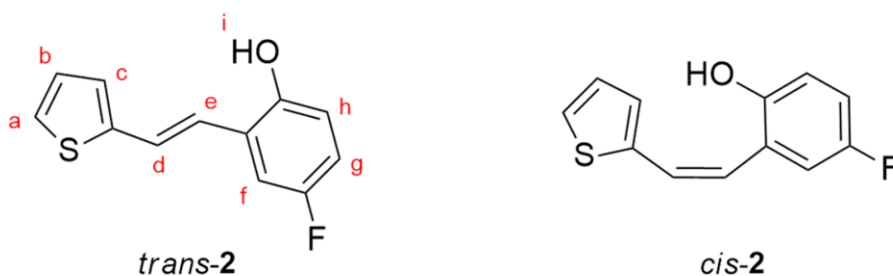
Derivati **1–5** pripravljaju se na opisani način, korištenjem (tiofen-2-il)-trifenil-fosfonijeve soli i 0,5 g odgovarajućeg aldehida, a derivati **6** i **7** korištenjem (5-metiltiofen-2-il)-trifenil-fosfonijeve soli.

(E)-4-klor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-1*) i **(Z)-4-klor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol** (*cis-1*)



(*trans-1*): 100 mg, 95 % izoliranog spoja, ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,43 (d, 1H, $J_{fg} = 2,5$ Hz, H_f), 7,25 (d, 1H, $J_{de} = 16,2$ Hz, H_d/H_e), 7,21 (d, 1H, $J_{ab} = 5,4$ Hz, H_a), 7,09-7,02 (m, 2H, $\text{H}_g, \text{H}_d/\text{H}_e$), 7,08 (d, 1H, $J_{bc} = 3,3$ Hz, H_c), 7,00 (dd, 1H, $J_{ab} = 5,1$ Hz, $J_{bc} = 3,7$ Hz, H_b), 6,71 (d, 1H, $J_{gh} = 8,5$ Hz, H_h), 5,12 (s, 1H, H_i). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 151,45, 142,72, 128,04, 127,65, 126,64, 126,57, 126,08, 125,95, 124,88, 124,30, 121,31, 117,18. MS (ESI) m/z (% fragment): 235 (100); HRMS (m/z) za $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClOS}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{calcd}} = 236.0063$, $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{measured}} = 236.0057$.

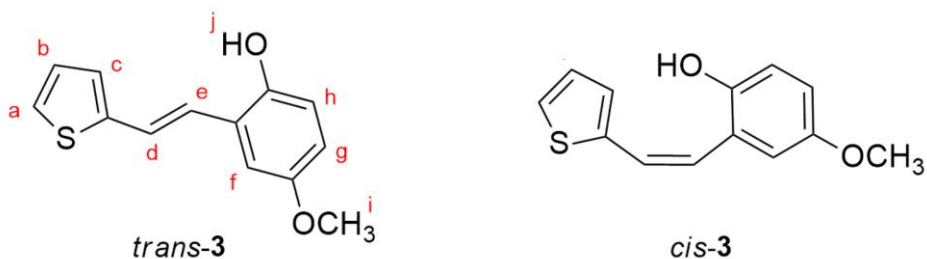
(E)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-2*) i **(Z)-4-fluor-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol** (*cis-2*)



(*trans-2*): 35,3 mg, 97 % izoliranog spoja, ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,25 (d, 1H, $J_{de} = 15,8$ Hz, H_d/H_e), 7,22 (d, 1H, $J_{ab} = 4,2$ Hz, H_a), 7,20 – 7,14 (m, 1H, $\text{H}_f/\text{H}_g/\text{H}_h$), 7,10 (d, 1H, $J_{de} = 16,0$ Hz, H_d/H_e), 7,09 (d, 1H, $J_{bc} = 3,3$ Hz, H_c), 7,01 (dd, 1H, $J_{ab} = 5,0$ Hz, $J_{bc} = 3,6$ Hz, H_b), 6,85

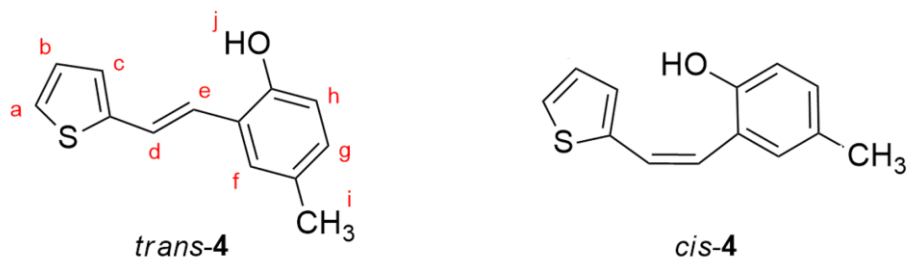
– 6,79 (m, 1H, H_f/H_g/H_h), 6,75 – 6,70 (m, 1H, H_f/H_g/H_h), 4,87 (s, 1H, H_i). ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ/ppm: 159,00, 155,84, 148,89, 142,72, 127,65, 126,61, 124,86, 124,16, 121,65, 116,90, 114,99, 112,93. MS (ESI) *m/z* (% fragment): 219 (100); HRMS (*m/z*) za C₁₂H₉FOS: [M + H]⁺_{calcd} = 220.0358, [M + H]⁺_{measured} = 220.0353.

(E)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-3*) i **(Z)-4-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol** (*cis-3*)



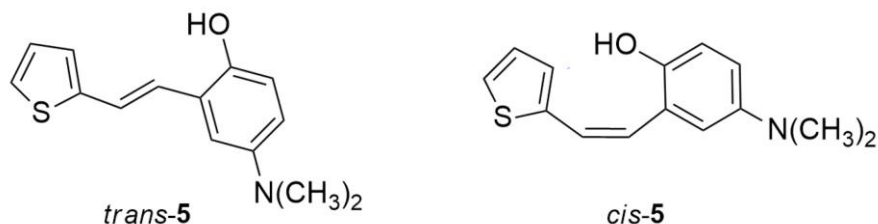
(*trans-3*): 107,9 mg, 97 % izoliranog spoja, ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ/ppm: 7,16 (d, 1H, *J*_{de} = 16,2 Hz, H_d/H_e), 7,09 (d, 1H, *J*_{ab} = 4,7 Hz, H_a), 7,05 (d, 1H, *J*_{de} = 16,1 Hz, H_d/H_e), 6,97 (d, 1H, *J*_{bc} = 3,3 Hz, H_c), 6,91 (s, 1H, H_f), 6,88 (dd, 1H, *J*_{ab} = 4,8 Hz, *J*_{bc} = 3,8 Hz, H_b), 6,64 – 6,57 (m, 2H, H_g, H_h), 3,70 (s, 3H, H_i) (ne vidi se signal protona hidroksilne skupine). ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ/ppm: 152,76, 146,24, 142,12, 126,54, 125,10, 124,02, 123,42, 122,24, 121,69, 115,91, 113,47, 110,50, 54,83. MS (ESI) *m/z* (% fragment): 231 (100); HRMS (*m/z*) za C₁₃H₁₂O₂S: [M + H]⁺_{calcd} = 232.0558, [M + H]⁺_{measured} = 232.0551.

(E)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-4*) i **(Z)-4-metil-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol** (*cis-4*)



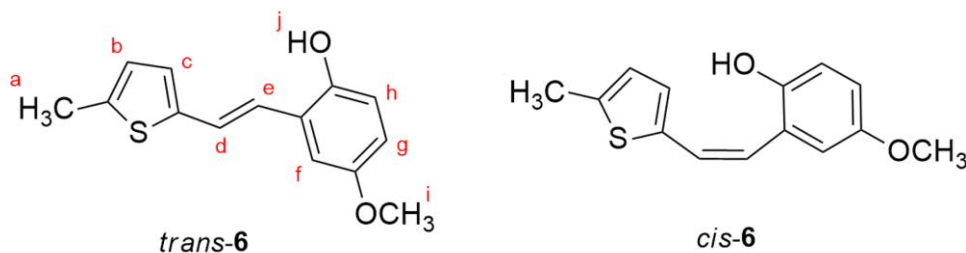
(*trans*-4): 91,3 mg, 97 % izoliranog spoja, ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,27 (d, 1H, $J_{de} = 16,1$ Hz, H_d/H_e), 7,26 (s, 1H, H_f), 7,17 (d, 1H, $J_{ab} = 5,1$ Hz, H_a), 7,13 (d, 1H, $J_{de} = 16,2$ Hz, H_d/H_e), 7,06 (d, 1H, $J_{bc} = 3,1$ Hz, H_c), 6,99 (dd, 1H, $J_{ab} = 4,9$ Hz, $J_{bc} = 3,6$ Hz, H_b), 6,92 (dd, 1H, $J_{gh} = 8,0$ Hz, $J_{fg} = 1,5$ Hz, H_g), 6,68 (d, 1H, $J_{gh} = 8,1$ Hz, H_h), 4,89 (s, 1H, H_j), 2,29 (s, 3H, H_i). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ/ppm : 150,82, 143,40, 130,27, 129,17, 127,53, 125,87, 124,23, 123,94, 122,99, 122,91, 115,87, 20,56 (jedan kvaterni ugljik se ne vidi); MS (ESI) m/z (% fragment): 215 (100); HRMS (m/z) za $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{OS}$: $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{calcd}} = 216.0609$, $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{measured}} = 216.0609$.

(*E*)-4-dimetilamino-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-5) i **(*Z*)-4-dimetilamino-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*cis*-5)**



Reakcija s 4-dimetilamino-2-hidroksibenzaldehidom nije išla. Dobiveni ^1H NMR spektar sadrži samo signale neizreagirane aldehida i nepoznatog nusprodukta.

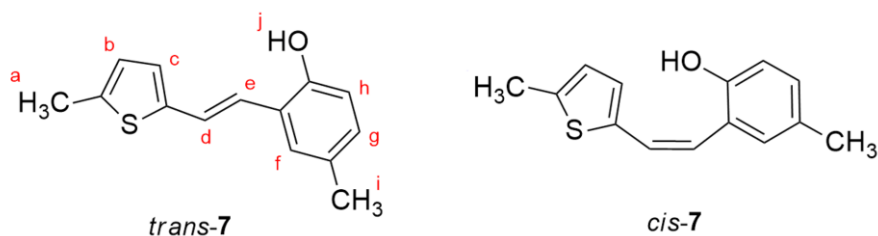
(*E*)-4-metoksi-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-6) i **(*Z*)-4-metoksi-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*cis*-6)**



(*trans*-6): 5,4 mg, 95 % izoliranog spoja, ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ/ppm : 7,16 (d, 1H, $J_{de} = 16,1$ Hz, H_d/H_e), 6,99 (d, 1H, $J_{de} = 15,8$ Hz, H_d/H_e), 6,97 (s, 1H, H_f), 6,85 (d, 1H, $J_{bc} = 3,4$ Hz, H_b/H_c), 6,72 (d, 1H, $J_{gh} = 8,7$ Hz, H_h), 6,68 (dd, 1H, $J_{gh} = 8,7$ Hz, $J_{fg} = 2,9$ Hz, H_g), 6,64 (dd, 1H, $J_{bc} = 3,4$ Hz, $J = 1,1$ Hz, H_b/H_c), 4,72 (s, 1H, H_j), 3,79 (s, 3H, H_i), 2,48 (s, 3H, H_a). ^{13}C NMR

(CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 153,93, 147,05, 141,08, 139,47, 126,48, 125,76, 125,22, 123,84, 121,36, 116,85, 114,20, 111,41, 55,82, 15,65. MS (ESI) m/z (% fragment): 245 (100), 160 (50); HRMS (m/z) za C₁₄H₁₄O₂S: [M + H]⁺_{calcd} = 246.0715, [M + H]⁺_{measured} = 246.0708.

(E)-4-metil-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans*-7) i **(Z)-4-metil-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol** (*cis*-7)



(*trans*-7): 43,2 mg, 97 % izoliranog spoja, ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ /ppm: 7,24 (d, 1H, J_{fg} = 1,5 Hz, H_f), 7,17 (d, 1H, J_{de} = 16,1 Hz, H_d/H_e), 6,98 (d, 1H, J_{de} = 16,1 Hz, H_d/H_e), 6,91 (dd, 1H, J_{gh} = 8,1 Hz, J_{fg} = 1,8 Hz, H_g), 6,84 (d, 1H, J_{bc} = 3,4 Hz, H_b/H_c), 6,68 (d, 1H, J_{gh} = 8,1 Hz, H_h), 6,64 (dd, 1H, J_{bc} = 3,4 Hz, J = 1,1 Hz, H_b/H_c), 4,80 (s, 1H, H_j), 2,48 (s, 3H, H_a), 2,28 (s, 3H, H_i). ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ /ppm: 150,68, 141,32, 130,25, 128,91, 127,42, 126,20, 125,71, 124,33, 124,16, 123,51, 121,53, 115,82, 20,57, 15,64. MS (ESI) m/z (% fragment): 229 (100); HRMS (m/z) za C₁₄H₁₄OS: [M + H]⁺_{calcd} = 230.0765, [M + H]⁺_{measured} = 230.0760.

5. Zaključak

U ovom su radu sintetizirani novi *trans*-derivati rezveratrola Wittigovom reakcijom. Glavni je cilj istraživanje njihove potencijalne primjene u liječenju Alzheimerove bolesti, posebice kao inhibitora kolinesteraza. Rezultati ukazuju kako derivati rezveratrola koji sadrže metilirani tiofenski dio (*trans*-6 i *trans*-7) pokazuju bolju inhibiciju i AChE i BChE u usporedbi s njihovim nemetiliranim analogima (*trans*-3 i *trans*-4). Zatim, enzim BChE pokazao je općenito veću osjetljivost na nove derivate rezveratrola nego enzim AChE. Prema DPPH i CUPRAC antioksidacijskim testovima, novi derivati rezveratrola s *ortho*-OH i metoksi- ili metilnim skupinama na *meta*-položaju fenolnog prstena (*trans*-3, *trans*-4, *trans*-6 i *trans*-7) pokazali su snažniju antioksidativnu aktivnost od standardnog rezveratrola. Najznačajnije rezultate pokazuje derivat *trans*-7, s najvišom antioksidacijskom aktivnošću te inhibicijom BChE, ostvarivši vrijednost IC₅₀ od 24,8 μM. Također, *in silico* analiza genotoksične sigurnosti potvrdila je spoj *trans*-7 kao najbolji kandidat za daljnji rani stadij razvoja lijekova. Ovi rezultati su ohrabrujući i ukazuju na potencijalnu primjenu sintetiziranih spojeva kao terapijskih agenasa za Alzheimerovu bolest. Oni pružaju temelj za daljnje studije koje bi se trebale fokusirati na optimizaciju ovih spojeva kako bi se postigla još bolja biološka aktivnost i potencijalna klinička primjena.

6. Literatura

1. McGleenon B.M., Dynan K.B., Passmore A.P., Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48(4) (1999) 471–480.
2. Braidy N., Jugder B.-E., Poljak A., Jayasena T., Mansour H., Nabavi M., Sachdev P., Grant R., Resveratrol as a Potential Therapeutic Candidate for the Treatment and Management of Alzheimer's Disease, *Curr. Top. Med. Chem.* 16(17) (2016) 1951–1960.
3. Tsai H.Y., Ho C.T., Chen Y.K., Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene and 3'-hydroxypterostilbene, *J. Food Drug Anal.* 25 (2017) 134–147.
4. Pandey K.B., Rizvi S.I., Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2 (2009) 270–278.
5. Trela B.C., Waterhouse A.L., Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability, *J. Agric. Food Chem.* 44(5) (1996) 1253–1257.
6. Bhat Z.R., Bhat A., Mittu B., Sunooj K.V., Zaman R.U., Chapter 11 - Resveratrol, *Nutraceuticals and Health Care*, Academic press, Amsterdam, Netherlands (2022) 217–231.
7. Krstonošić M. A., Mikulić, M., Cvejić J., Chapter 16 - Resveratrol, *A Centum of Valuable Plant Bioactives*, Academic press, Amsterdam, Netherlands (2021) 349–378.
8. Jiang W., Shen J., Pharmacological properties and effect mechanism of resveratrol, *Prog. Pharm. Sci.* 27(3) (2003) 159–162.
9. Chen M.L., Yi L., Jin X., Xie Q., Zhang T., Zhou X., Chang H., Fu Y.J., Zhu J.D., Zhang Q.Y., Mi M.T., Absorption of resveratrol by vascular endothelial cells through passive diffusion and an SGLT1-mediated pathway, *J. Nutr. Biochem.* 24 (2013) 1823–1829.
10. Robinson K., Mock C., Liang D., Pre-formulation studies of resveratrol, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41(9) (2015) 1464–1469.
11. Amri A., Chaumeil J.C., Sfar S., Charrueau C., Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?, *J. Control. Release* 158(2) (2012) 182–193.

12. Helen Chan O., Stewart B.H., Physicochemical and drug-delivery considerations for oral drug bioavailability, *Drug Discov. Today* 1(11) (1996) 461–473.
13. Davidov-Pardo G., McClements D.J., Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues, *Trends Food Sci. Technol.* 38(2) (2014) 88–103.
14. <https://www.mojeoko.hr/savjeti-za-zdrave-oci/njega-oka/resveratrol> (pristup 30. 5. 2024.)
15. Weiskirchen S., Weiskirchen R., Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy?, *Adv. Nutr.* 7(4) (2016) 706–718.
16. Poulsen M.M., Fjeldborg, K., Ornstrup M. J., Kjær T.N., Nøhr M.K., Pedersen S.B., Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1852(6) (2015) 1124–1136.
17. Solladié G., Pasturel J.Y., Maignan J., A re-investigation of resveratrol synthesis by Perkins reactio. Application to the synthesis of aryl cinnamic acids, *Tetrahedron* 59(18) (2003) 3315–3321.
18. Jeffery T., Ferber, B.t. One-pot palladium-catalyzed highly chemo-, regio-, and stereoselective synthesis of transstilbene derivatives. A concise and convenient synthesis of resveratrol, *Tetrahedron Lett.* 44(1) (2003) 193–197.
19. Csuk R., Albert S., Kluge R., Ströhl D., Resveratrol derived butyrylcholinesterase inhibitors, *Arch. Pharm.* 346(7) (2013) 499–503.
20. Heravi M.M., Zadsirjan V., Hamidi, H., Daraie M., Momeni, T., Chapter Three - Recent applications of the Wittig reaction in alkaloid synthesis, *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic press 84 (2020) 201–334.
21. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Organic_Chemistry\)/Reactions/Addition_Reactions/Addition_to_Carbonyls/Ylide_Addition](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Reactions/Addition_Reactions/Addition_to_Carbonyls/Ylide_Addition) (pristup 10. 6. 2024.)
22. Mandal D.K., Chapter 8 - Pericyclic reactions 1: Basic stereochemistry, *Stereochemistry and Organic Reactions*, Academic press, Amsterdam, Netherlands (2021) 375–419.

23. McNulty J., Das P., Highly stereoselective and general synthesis of (e)-stilbenes and alkenes by means of an aqueous Wittig reaction, *Eur. J. Org. Chem.* 24 (2009) 4031–4035.
24. Finder V.H., Alzheimer's disease: a general introduction and pathomechanism, *J. Alzheimer's Dis.* 22 (2010) 5–19.
25. Srivastava S., Ahmad R., Khare S.K., Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review, *Eur. J. Med. Chem.* 216 (2021) 113320.
26. Pepeu G., Giovannini M. G., Cholinesterase inhibitors and beyond, *Curr. Alzheimer Res.* 6 (2009) 86–96.
27. Rampa A., Bartolini M., Bisi A., Belluti F., Gobbi S., Andrisano V., Ligresti A., Di Marzo, V., The first dual che/faah inhibitors: new perspectives for Alzheimer's disease?, *ACS Med. Chem. Lett* 3 (2012) 182–186.
28. Lu C., Guo Y., Yan J., Luo Z., Luo H.-B., Yan M., Huang L., Li X., Design, Synthesis, and Evaluation of Multitarget-Directed Resveratrol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 5843–5859.
29. Findeis M.A., The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease, *Pharmacol. Ther.* 116 (2007) 266–286.
30. Salomone S., Caraci F., Leggio G.M., Fedotova J., Drago F., New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73 (2012) 504–517.
31. Chen G.F., Xu T.H., Yan Y., Zhou Y.R., Jiang Y., Melcher K., Xu H.E., Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development, *Acta Pharmacol. Sin.* 38(9) (2017) 1205–1235.
32. Bonda D. J., Wang X., Perry G., Nunomura A., Tabaton M., Zhu X., Smith M. A., Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention, *Neuropharmacol.* 59 (2010) 290–294.
33. Bush A. I., Drug development based on the metals hypothesis of Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 15 (2008) 223–240.

34. Bastianetto S., Brouillette J., Quirion R., Neuroprotective effects of natural products: interaction with intracellular kinases, amyloid peptides and a possible role for transthyretin, *Neurochem. Res.* 32(10) (2007) 1720–1725.
35. Chen J., Zhou Y., Mueller-Steiner S., Chen L.-F., Kwon H., Yi S., SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- β toxicity through inhibiting NF- κ B signaling, *J. Biol. Chem.* 280(48) (2005) 40364–40374.
36. Al-Bishri W.M., Hamza A.H., Farran S.K., Resveratrol treatment attenuates amyloid beta, tau protein and markers of oxidative stress, and inflammation in alzheimer's disease rat model, *Int. J. Pharmaceutical Res. Allied Sci.* 6(3) (2017)
37. Fonseca-Santos B., Chorilli M., The uses of resveratrol for neurological diseases treatment and insights for nanotechnology based-drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 589 (2020) 119832.
38. Huang D.-D., Shi G., Jiang Y., Yao C., Zhu C., A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications, *Biomed. Pharmacother.* 125 (2020) 109767.
39. Chang C.H., Lee C.Y., Lu C.C., Tsai F.J., Hsu Y.M., Tsao J.W., Juan Y.N., Chiu H.Y., Yang J.S., Wang C.C., Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatinresistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling, *Int. J. Oncol.* 50 (3) (2017) 873–882.
40. Kumar S., Chang Y.-C., Lai K.-H., Hwang T.-L., Resveratrol, a Molecule with Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Activities: Natural Product to Chemical Synthesis, *Curr. Med. Chem.* 27 (2020) 1–14.
41. Mlakić M., Talić S., Odak I., Barić D., Šagud I., Škorić I., Cholinesterase Inhibition and Antioxidative Capacity of New Heteroaromatic Resveratrol Analogs: Synthesis and Physico-Chemical Properties, *Int. J. Mol. Sci.* 25(13) (2024) 7401.

7. Životopis

Sara Milić [REDACTED] Pohađala je Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu gdje je stekla ljubav i interes prema kemiji. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu (Fakultet) upisuje 2021. godine kao studentica studija Primijenjena kemija. Dobitnica je nagrade Fakulteta za najboljeg studenta 2. godine prijediplomskih studija (2022./2023.). Stručnu je praksu odradila na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za biokoloide i površinsku kemiju.