

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ian Horvat, Ingo Borić

**Novi rezveratrolni derivati kao potencijalno biološki aktivne  
strukture - dizajn, sinteza i računalno modeliranje**

Zagreb, 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 te na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Grupi za računalne bioznanosti pod komentorstvom dr. sc. Borislava Kovačevića te je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.*

## POPIS KRATICA

$A\beta$  - eng.  *$\beta$ -amyloids* -  $\beta$  amiloidi

ACN - acetonitril

ACh - eng. *acetylcholine* - acetilkolin

AChE - eng. *Acetylcholinesterase* - acetilkolinesteraza

AD - eng. *Alzheimer's disease* - Alzheimerova bolest

AIBN - eng. *Azobisisobutyronitrile* - azobisisobutironitril

BBB - eng. *blood-brain barrier* - krvno-moždana barijera

BChE - eng. *Butyrylcholinesterase* - butirilkolinesteraza

B3LYP - eng. *Becke Three Parameter Hybrid Functionals* - Beckeovi troparametarski hibridni funkcionali

$CCl_4$  - tetraklormetan

$CDCl_3$  - deuterirani kloroform

$CD_3OD$  - deuterirani metanol

ChE - eng. *cholinesterase* - kolinesteraza

CIM - eng. *Configuration Interaction Method* - metoda konfiguracijskih interakcija

DCM - diklormetan

DFT - eng. *Density Functional Theory* - teorija funkcionala (elektronske) gustoće

DME - dimetileter

DMF - dimetilformamid

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

E - dietileter

*E* - njem. *entgegen* - nasuprot

EtOAc - etilacetat

EtOH - etanol

PE - petroleter

HAT - eng. *hydrogen atom transfer* - prijenos vodikovog atoma

HF - Hartree-Fock

HOMO - eng. *highest occupied molecular orbital* - najviša okupirana molekulska orbitala

HRMS - eng. *high resolution mass spectrometry* - masena spektrometrija visoke rezolucije

$IC_{50}$  - eng. *half-maximal inhibitory concentration* - koncentracija za polovičnu inhibiciju

IL - interleukin

iNOS - eng. *inducible nitric oxide synthase* - inducibilna sintaza dušikovog oksida

KOtBu - kalijev *tert*-butoksid  
LED - eng. *light-emitting diode* - dioda koja emitira svjetlost  
LPS - lipopolisaharid  
LiAlH<sub>4</sub> - litijev aluminijev hidrid  
LUMO - eng. *lowest unoccupied molecular orbital* - najniža neokupirana molekulska orbitala  
MAPK - mitogenom aktivirane protein kinaze  
MgSO<sub>4</sub> - magnezijev sulfat  
MP - Møller-Plesset  
Na - natrij  
NaOEt - natrijev etoksid  
NaOtBu - natrijev *tert* - butoksid  
NBS - eng. *N-bromosuccinimide* - *N*-bromosukcinimid  
NMR - eng. *Nuclear Magnetic Resonance* - nuklearna magnetska rezonancija  
NO - dušikov monoksid  
PES - eng. *Potential Energy Surface* - ploha potencijalne energije  
PCET - eng. *proton-coupled electron transfer* - prijenos elektrona spregnutog s protonom  
PCM - eng. *Polarizable Continuum Model* - model polarizabilnog kontinuuma  
PolyQ - eng. *polyglutamine* - poliglutamin  
RAF - eng. *radical adduct formation* - formiranje radikalnog adukta  
ROS - eng. *reactive oxygen species* - reaktivne kisikove vrste  
SEPT - eng. *sequential electron proton transfer* - sekvencijalni prijenos elektrona  
Sirt1 - sirtuin1  
THF - tetrahidrofuran  
TiCl<sub>3</sub> - titanijev(III)-klorid  
TiCl<sub>4</sub> - titanijev(IV)-klorid  
TLC - eng. *thin-layer chromatography* - tankoslojna kromatografija  
TMS - tetrametilsilan  
TNF- $\alpha$  - eng. *tumour necrosis factor alpha* - faktor tumorske nekroze alfa  
UV - ultraljubičasta (spektrofotometrija)

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA .....	
SADRŽAJ .....	
1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Stilbeni i hidroksi-stilbeni .....	3
2.2. Biološka aktivnost stilbena i hidroksi-stilbena.....	6
2.2.1. Antioksidativna svojstva hidroksi-stilbena .....	6
2.2.2. Protuupalna svojstva hidroksi-stilbena .....	7
2.2.3. Anti-neurodegenerativna svojstva stilbena i hidroksi-stilbena .....	8
2.3. Sinteza i dobivanje stilbena i stilbenskih analoga .....	10
2.3.1. Wittigova reakcija .....	10
2.3.2. McMurryjeva reakcija.....	11
2.4. Računalno modeliranje .....	13
2.4.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće .....	14
2.4.2. Model polarizabilnog kontinuuma .....	15
2.4.3. Optimizacija geometrije molekula .....	16
2.4.4. Docking .....	17
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
3.1. Uvod .....	20
3.2. Sinteza i karakterizacija novih hidroksi-stilbena.....	22
3.2.1. Sinteza spojeva 1, 2, 6, 7, 9, 10, 13 i 14 Wittigovom reakcijom .....	22
3.2.2. Sinteza hidroksi-stilbena 8 .....	23
3.2.3. Sinteza spojeva 5 i 12 Wittigovom reakcijom .....	25
3.2.4. Sinteza hidroksi-stilbena 3, 4 i 11 McMurryjevom reakcijom .....	26
3.2.5. Spektroskopska karakterizacija novih hidroksi-stilbena 1-14 .....	27
3.3. Biološka aktivnost .....	31
3.3.1. Inhibicija kolinesteraza .....	31
3.3.2. Antioksidativna aktivnost .....	34
3.3.3. Protuupalna aktivnost.....	36
3.4. Računalni rezultati .....	38
4. EKSPERIMENTALNI DIO.....	46
4.1. Opće napomene .....	46
4.2. Sinteza furanskih i tiofenskih fosfonijevih soli .....	47
4.3. Sinteza spojeva 1, 2, 6, 7, 9, 10, 13, 14 .....	48

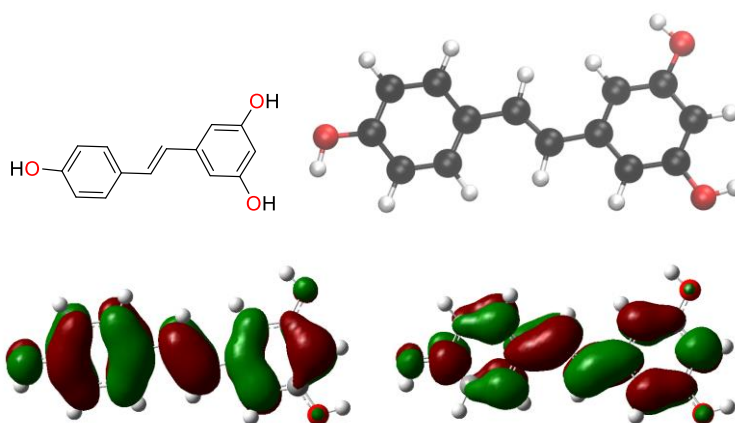
4.4. Sinteza piran-4-onske soli .....	53
4.5. Sinteza spojeva 5 i 12 .....	54
4.6. Sinteza spojeva 15 i 8 .....	56
4.7. Sinteza spojeva 3, 4 i 11 .....	58
5. ZAKLJUČAK .....	60
6. LITERATURA.....	62
SAŽETAK.....	68
SUMMARY .....	69
ŽIVOTOPISI.....	70
PRILOZI.....	71

## 1. UVOD

U cilju pronalaska novih molekula koje bi uz odlična terapijska svojstva zadržala strukturnu stabilnost, velika je pozornost na stilbenima i njihovim derivatima, koji su poznati po izvrsnim terapijskim učincima. Posebice su u tom smislu interesantni njihovi hidroksilni derivati s naglaskom na spoj rezveratrol.

*trans*-Rezveratrol (Slika 1) je molekula koja pripada stilbenima te je najpoznatiji hidroksi-derivat iz ove skupine spojeva. Prisutan je u crnom grožđu, crnom vinu, borovnicama, brusnicama, čokoladi i kikirikiju. Poznato je da djeluje antioksidativno, odnosno protiv starenja stanica te pruža zaštitu od karcinoma i kardiovaskularnih bolesti, a prvi je put izoliran 1940. godine. Prema najnovijim istraživanjima, *trans*-rezveratrol aktivno sudjeluje u više mehanizama u patologiji Alzheimerove bolesti (AD).<sup>1</sup>

U ljudskom organizmu, *trans*-rezveratrol je biosintetiziran pomoću enzima stilben-sintaze,<sup>2,3</sup> a utvrđeno je da uništava i inhibira nastajanje predformiranih agregata, smanjuje aktivaciju mikroglia i sirtuin1 (Sirt1) biološkog puta, čime modulira prijenos živčanih signala u tijelu, odnosno ublažava patofiziološke aspekte bolesti.<sup>4</sup> Unatoč dokazanim pozitivnim učincima, potrebna su daljnja istraživanja da se dokaže sigurnost i funkcionalnost *trans*-rezveratrola u ljudskom organizmu. U ovome znanstvenom radu sintetizirani su novi derivati *trans*-rezveratrola kojima je dokazana izvrsna potencijalna biološka aktivnost, antioksidativna, protuupalna, te inhibicijska prema enzimima kolinesterazama.



**Slika 1.** Struktura *trans*-rezveratrola te pripadajuće HOMO i LUMO orbitale





## 2. OPĆI DIO

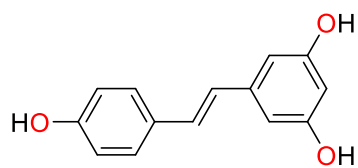
### 2.1. Stilbeni i hidroksi-stilbeni

Na tržištu je sve više potražnje za novim spojevima sa zadovoljavajućim terapijskim učincima i što manje neželjenih nuspojava te što većom stabilnošću. Neki od spojeva koje krase navedene karakteristike su stilbeni, a posebno njihovi hidroksi-derivati. Stilbeni općenito pokazuju zadovoljavajuća antioksidativna i farmakološka svojstva te imaju potencijalnu primjenu u raznim terapijama. Hidroksi-stilbenima smatraju se spojevi s (poli)fenolnom strukturom, odnosno spojevi u čijim strukturama se nalazi određeni broj hidroksilnih skupina na aromatskim prstenovima.<sup>5,6</sup> Do sada je u prirodi pronađeno oko 8000 takvih struktura te se može reći da se radi o raširenoj skupini spojeva, a većinu njih krase odlična terapijska svojstva zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti. Velika je prednost što se mogu naći u prirodi u raznim biljkama koje obiluju polifenolnim spojevima, a najčešće je to razno voće i povrće, sjemenke, čajevi, kava, crno vino i mnoge druge namirnice.<sup>7</sup> Polifenoli kao hidroksi-stilbeni mogu se podijeliti na dvije podskupine, a to su flavonoidi i ne-flavonoidi, temeljem broja fenolnih jedinica, načina povezanosti te supstituenata na aromatskim prstenovima (Slika 2).<sup>8</sup> Struktura flavonoida sačinjena je od tri prstena gdje je srednji prsten određeni heterocikl, najčešće piran, koji povezuje dva aromatska (fenolna) prstena.<sup>9</sup> Gledajući strukturne različitosti, flavonoide se može podijeliti na flavone, flavonole, flavanole, antocijanidine i druge od kojih se navedeni derivati najčešće nalaze u hrani. S druge strane, strukturu ne-flavonoida čine uvijek nekondenzirani aromatski prstenovi. Osnovni predstavnici ovih spojeva su fenolne kiseline, fenolni alkoholi, lignani te već spomenuti stilbeni s rezveratrolom kao svojim glavnim predstavnikom i najvažnijim derivatom.<sup>5,6</sup>

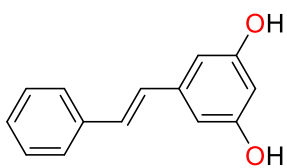
POLIFENOLI			
<p>Fenolne kiseline</p>	<p>Flavonoidi</p>	<p>Stilbeni</p>	<p>Lignani</p>
NAJVAŽNIJE PODSKUPINE			
<p>Benzojeva kiselina Cimetna kiselina i njihovi derivati</p>	<p>Flavonoli Flavoni Flavanoni Izoflavoni Antocijanidini Flavinolignani</p>	<p>Rezveratrol i njegovi derivati</p>	<p>Sekoizolaricirezinol Matairezinol i njihovi derivati</p>

**Slika 2.** Klasifikacija polifenola i najvažnije podskupine.

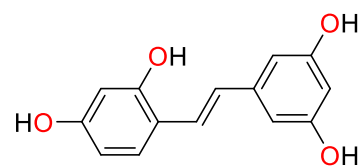
Osnovu hidroksi-stilbena čini skelet od 14 ugljikovih atoma raspoređenih u dva benzenska prstena povezana dvostrukom ugljik-ugljik vezom.<sup>10</sup> Zbog spomenute etilenske poveznice hidroksi-stilbeni postoje kao izomerne strukture, odnosno moguće su *cis*- i *trans*-konfiguracije svake molekule. Prilikom toga treba imati na umu da su *trans*-izomeri češće prisutni u prirodnim spojevima, ali isto tako su i stabilniji i biološki aktivniji od *cis*-izomera.<sup>10</sup> Od trenutno poznatih stilbenskih struktura glavnina pripada derivatima *trans*-rezveratrola, prikazanog na slici 1.<sup>11</sup> Svakako je bitno istaknuti da *trans*-rezveratrol vrlo lako izomerizira u *cis*-rezveratrol ako je izložen UV zračenju, a ta pojava još je izraženija pri izlaganju vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Upravo zbog toga je sve veća potraga za novim rezveratrolnim derivatima koji imaju slična biološka svojstva kao derivati s već dokazanom biološkom aktivnošću (Slika 3), no veću stabilnost pri izlaganju UV-Vis zračenju.<sup>12</sup>



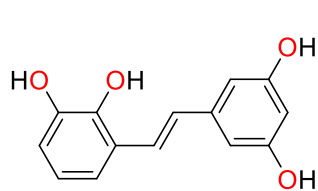
rezveratrol



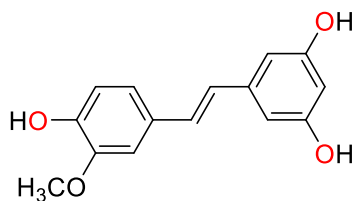
pinosilvin



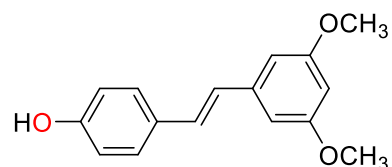
oksi-rezveratrol



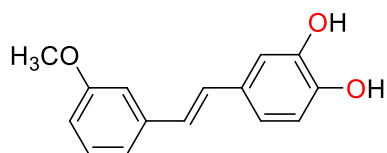
piceatanol



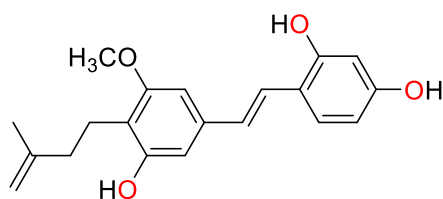
izorapontigenin



pterostilben



3,4-dihidroksi-3'-metoksi-stilben



4-izopentenil-3,2',4'-trihidroksi-5-metoksi-stilben

**Slika 3.** Strukture hidroksi-stilbenskih derivata s dokazanom biološkom aktivnošću.

## **2.2. Biološka aktivnost stilbena i hidroksi-stilbena**

Kao što je već spomenuto, stilbeni se nalaze u raznim prirodnim spojevima, no najčešće u biljkama koje ih sintetiziraju kako bi se zaštitile od nepovoljnih uvjeta u okolišu kao što su UV zračenje, vrućina, insekti i razne infekcije. Osnovna uloga stilbena u biljkama je zaštita stanica od oksidativnog stresa, a neki od njih djeluju i kao toksini protiv raznih patogena.<sup>10</sup>

Brojna istraživanja pokazala su da stilbeni, a posebno rezveratrol i njegovi derivati (Slika 3) sličan učinak imaju i na ljudsko zdravlje te pokazuju

izražena antioksidativna, antitumorska, antimikrobna, protuupalna, anti-neurodegenerativna, protuvirusna te antidijabetička svojstva.<sup>8</sup> Osim navedenih svojstava pokazalo se da stilbeni i analozi zbog mogućnosti interakcije sa zračenjem djeluju kao luminofoori. Preciznije, nalaze primjenu u optičkoj elektronici kao optički pojačivači, u LED uređajima, biološkom oslikavanju i fotonaponskim ćelijama.<sup>13</sup> U nastavku rada bit će izdvojena antioksidativna, protuupalna i anti-neurodegenerativna svojstva hidroksi-stilbena opisana u literaturi, obzirom da su i na novopriredjenim spojevima u okviru ovoga znanstvenog rada upravo te aktivnosti ispitane.

### **2.2.1. Antioksidativna svojstva hidroksi-stilbena**

Antioksidansi se općenito smatraju tvari čija svojstva omogućavaju usporavanje ili čak sprječavanje oksidacije bioloških supstrata koja je uzrokovana reaktivnim tvarima kao što su slobodni radikali.<sup>14</sup> Slobodni radikali su nestabilne molekule koje nastaju u normalnom metabolizmu stanica. Uslijed sve stresnijih uvjeta života u ljudskom organizmu dolazi do nastanka sve više slobodnih radikala, odnosno vrlo reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) koje zatim oštećuju proteine, DNK i lipide što dovodi do raznih bolesti.<sup>8,15</sup> Kako ne bi došlo do oksidativnog stresa, koriste se antioksidansi koji sprječavaju formiranje slobodnih radikala ili neutraliziraju ROS i zaustavljaju lančane radikalske reakcije. Proces pronalaženja slobodnih radikala i zaustavljanja reakcija kreće formiranjem rezonancijom stabiliziranog fenoksi-radikala jednim od četiri mehanizma čime se sprječavaju nepoželjne samopropagirajuće reakcije potaknute izvorom slobodnih radikala. Mehanistički, antioksidativna aktivnost temelji se na sposobnosti antioksidansa da zarobi slobodne radikale u skeletu molekule, ali i mogućnosti otpuštanja vodikovih atoma. Kako bi se sa sigurnošću utvrdila antioksidativna moć molekule, važno je znati mehanizam prema kojem se odvija antioksidativno djelovanje. Četiri moguća mehanizma su: prijenos vodikovog atoma (HAT), prijenos elektrona

spregnutog s protonom (PCET), sekvencijalni prijenos elektrona (SEPT) i formiranje radikalskog adukta (RAF). Uzevši u obzir da je *trans*-rezveratrol najučestaliji hidroksi-stilben te da je hidroksi-radikal najreaktivniji kisikov radikal koji može nastati u ljudskom organizmu, kao primarni antioksidativni mehanizam u vodi i otopinama s fiziološkim pH podrazumijeva se SEPT. SEPT mehanizam uključuje dva koraka pri čemu se prvo odvija prijenos jednog elektrona popraćen deprotoniranjem, a u nekim slučajevima može biti obrnuto. Prijenosom elektrona dolazi do stvaranja radikalskog kationa rezveratrola kao intermedijera nakon čega slijedi deprotoniranje na bilo kojoj od tri fenolne skupine, pošto su one relativno kiselog karaktera.<sup>15</sup> Antioksidativna aktivnost ovisi pretežito o strukturi same molekule pa je tako kod hidroksi-stilbena vidljivo da antioksidativna aktivnost proizlazi iz -OH skupina te se gubitkom te skupine gube i antioksidativna svojstva molekule. S druge strane, ukoliko se odabere povoljna skupina i položaj, antioksidativna aktivnost se može povećati uz pojavu novih učinaka kao što su poboljšana difuzija kroz staničnu membranu te bioraspoloživost.

*trans*-Rezveratrol se pokazao kao agens koji smanjuje promjene u mitohondrijskom potencijalu, čime inhibira akumulaciju ROS.<sup>16</sup> Upravo zbog ove činjenice, hidroksi-stilbeni su prepoznati kao gradivni blok velikog potencijala zbog raznih mogućih strukturnih modifikacija i primjene njihovih terapijskih svojstava u medicini.<sup>10</sup>

### **2.2.2. Protuupalna svojstva hidroksi-stilbena**

Upala je složen proces posredovan reakcijom različitih imunoloških stanica koje nastoje zaštititi organizam od raznih ozljeda. Klinička istraživanja otkrivaju da su vanjski stimulansi, kao što je lipopolisaharid (LPS) - glavna komponenta vanjske membrane u gram-negativnim bakterijama, ključni posrednici u pokretanju akutne i kronične upale aktiviranjem makrofaga. To dovodi do raznih bolesti kao što su akutna ozljeda tkiva, dijabetes i neurološke bolesti povezane sa starenjem. U makrofagima se LPS veže na svoj srodni receptorski kompleks, izazivajući otpuštanje raznih proupalnih medijatora kao što su dušikov monoksid (NO), ROS, faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) i interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )<sup>17,18</sup> te pokreće nizvodne signalne kaskade koje aktiviraju NF- $\kappa$ B kroz I $\kappa$ B kinaze.<sup>19,20</sup> Oslobođeni dimeri NF- $\kappa$ B u citosolu zatim translociraju u jezgri i pojačavaju transkripciju inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) i upalnih citokina.<sup>21</sup> Uključeni signali integriraju se u odgovor makrofaga na upalni podražaj i konačno generiraju složeni odgovor domaćina. Stoga, inhibicija aktivacije NF- $\kappa$ B nalazi primjenu u protuupalnoj terapiji.

Mnoga istraživanja dokazala su kako hidroksi-stilbeni imaju protuupalna svojstva. Polifenolni spojevi pokazali su vrlo dobra svojstva kao inhibitori mitogenom aktivirane kaskade protein kinaza (MAPK) čime se smanjuje nastanak citokina i NO zaslužnih za inflamatorni odgovor organizma. Svakako su potrebna daljnja in vivo ispitivanja.<sup>22</sup>

*trans*-Rezveratrol i njegovi derivati koji su prvotno otkriveni kao polifenolni fitoaleksini prisutni u raznim biljnim vrstama pokazuju protuupalno djelovanje putem inhibicije sinteze i oslobađanja proupalnih medijatora.<sup>23,24</sup> Strukturne značajke *trans*-rezveratrola za protuupalno djelovanje uključuju prisutnost hidroksi/metoksi-skupina, razne mogućnosti OH supstitucije i prirodu heterocikličke/etilenske poveznice koja povezuje dva fenilna prstena.<sup>25,26</sup>

Istraživanja su također pokazala kako protuupalna moć *trans*-rezveratrola i njegovih derivata ublažava parodontitis. Nadalje, dokazano je da polifenoli blokiraju prijenos signala koji u organizmu uzrokuje upalni odgovor te time inhibiraju ekspresiju upalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$  i IL-1.<sup>27</sup>

### 2.2.3. Anti-neurodegenerativna svojstva stilbena i hidroksi-stilbena

Stilbeni, posebice hidroksi-stilbeni pokazali su veliki potencijal u liječenju trovanja organofosfatima koji su skupina kemikalija najčešće korištena kao pesticidi ali i zloupotrebljavana kao bojni (nervni) otrovi.<sup>28</sup> Organofosfati uzrokuju ireverzibilnu inhibiciju enzima acetilkolinesteraze (AChE, EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraze (BChE, EC 3.1.1.8), dva enzima čija funkcija je značajna u kolinergičkoj signalizaciji. Nedostatak aktivne kolinesteraze rezultira trovanjem i kolinergijskom krizom organizma što dovodi do respiratornih bolesti, tresavice i neuroloških napadaja. Kako bi se štetne nuspojave izliječile, nužno je reaktivirati kolinesteraze terapijom oksimima koja je trenutno temeljena na kvaternim piridinijevim spojevima kao što je 2-PAM. 2-PAM i slični spojevi slabo prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (BBB) te imaju nejednak učinak na organofosfate. Stoga je u tijeku potraga za novim oksimima koji bi ispunili tražene uvjete.<sup>29</sup> U našem laboratoriju priređen je niz neutralnih različito supstituiranih 2-tienilnih heterostilbenskih oksima te su na njima provedena istraživanja njihovog potencijala kao reaktivatora. Tiosstilbeni zahvaljujući povećanoj lipofilnosti imaju potencijalno dobar prolazak kroz BBB, a time i bolju bioaktivnost.<sup>30</sup>

Hidroksi-stilbeni također potencijalnu primjenu nalaze u liječenju Alzheimerove i Parkinsonove bolesti zahvaljujući mogućnosti sinteze njihovih malih amfifilnih derivata.

Propusnost BBB za amfifilne derivate nadilazi rezultate za do sada istraživane biološke molekule kao što su antitijela i polipeptidi upravo zbog različitosti hidrofobnih i hidrofilnih dijelova molekula koji dodatno povećavaju afinitet vezanja hidroksi-stilbena na A $\beta$  ( $\beta$ -amiloidi) oligomere koji su uzrok kontinuiranog sinaptičkog oštećenja.<sup>31</sup> Nekoliko epidemioloških istraživanja pokazalo je da umjeren konzumacija crnog vina smanjuje rizik od demencije i AD. Crno vino je bogato antioksidativnim polifenolima s potencijalnim sposobnostima zaštite neurona. Iako postoji skepticizam oko bioraspoloživosti ovih polifenola, dokazano je da prirodni polifenol *trans*-rezveratrol ima povoljan utjecaj na živčani sustav.<sup>32,33</sup> Rezveratrol i derivat pterostilben (Slika 3) štite od sindroma demencije kao što je AD što je utvrđeno istraživanjem na stanicama sisavaca. Usporedbom rezultata vidljivo je da je pterostilben uspješniji u borbi protiv promjena u mozgu do kojih dolazi starenjem. Razlog ovomu je veća lipofilnost od *trans*-rezveratrola, a ona proizlazi iz dvije metoksi-skupine umjesto dvije hidroksilne skupine u *trans*-rezveratrolu (Slika 3). Za utvrđivanje bioraspoloživosti oba spoja potrebno je provesti daljnja istraživanja.<sup>34</sup> Rezveratrol je pokazao velik potencijal u neurološkoj zaštiti, in vitro te in vivo istraživanjima. Utvrđeno je da olakšava razgradnju amiloidnog prekursorskog proteina i potpomaže uklanjanju neurotoksičnih amiloid- $\beta$  peptida. Smanjuje štetu na živčanim stanicama aktivacijom NAD<sup>+</sup> ovisnih histon-deacetilaza poznatih kao sirtuini.<sup>35</sup> Povećanim rješavanjem  $\beta$ -amiloida i moduliranjem unutarstaničnih efektoru vezanih za oksidativni stres, neuronsku energijsku homeostazu, apoptozu i dugovječnost stanica, *trans*-rezveratrol djeluje anti-neurodegenerativno.<sup>36</sup> On djeluje na Sirt1 protein i njegov put te se time ponaša kao mimetik kalorijske restrikcije u više organizama. Testiranjem na miševima dokazano je da *trans*-rezveratrol štiti neurone od poliglutaminske (polyQ) toksičnosti u Huntingtonovoj bolesti te također od wallerijanskog degenerativnog propadanja u istraživanju.<sup>1</sup> Također, djeluje kao neuroprotektor u PC12 stanicama te štiti od A $\beta$ 25-35 inducirane toksičnosti i oslabljuje apoptozu stanica.<sup>16</sup> Nadalje, *trans*-rezveratrol se pokazao sigurnim i lako podnošljivim kod pacijenata s blagom do umjerenom AD.<sup>37,38</sup>

## 2.3. Sinteza i dobivanje stilbena i stilbenskih analoga

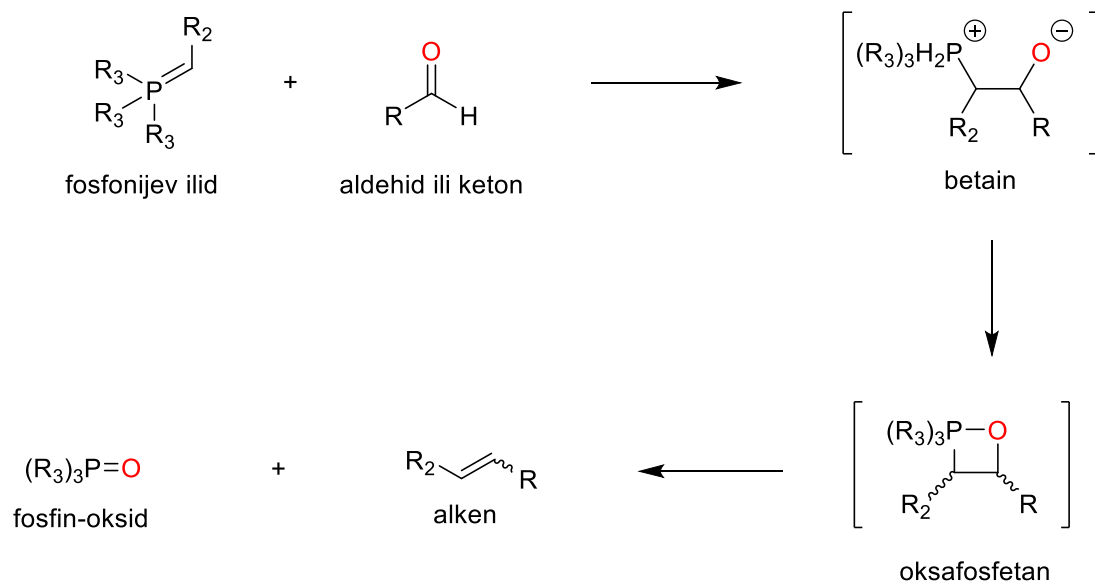
Utvrđeno je da stilbeni imaju veliki potencijal u širokom području primjene, stoga sve važnije postaje i sve se više ulaže u pronalazak pogodnih metoda za sintezu većih količina. Tri trenutne strategije njihovog dobivanja su: direktna ekstrakcija iz biljaka, primjena biotehnoloških metoda te klasična kemijska sinteza.<sup>39</sup> Izravna ekstrakcija iz biljaka je najjednostavnija i trenutno najčešće korištena tehnika za dobivanje stilbena, ali unatoč tomu, većina interesantnih stilbena se ne može naći u biljkama niti izolirati u zadovoljavajućim količinama. Također, stvaranje stilbena u biljkama značajno ovisi o okolišnim uvjetima, pa se ostalim metodama dobivanja pridaje sve više pozornosti za sintezu na makroskali.<sup>40</sup> Nadalje, biotehnološki pristup obuhvaća biotransformacije, metabolički inženjering, a tehnike kulture tkiva su pokazale veliki potencijal za daljnji razvoj. Ovakve metode su veoma skupe te se njima mogu dobiti samo neki određeni spojevi, pa se zato kemijska sinteza smatra daleko najvažnijom tehnikom proizvodnje stilbenskih spojeva.<sup>41</sup> Stilbeni se sintetiziraju raznim reakcijama olefinacije odnosno nastanka alkena spajanjem dva ugljikova atoma formiranjem dvostruke veze, od kojih su najpoznatije Wittigova, McMurryjeva, Mizoroki-Heckova i mnoge druge reakcije.<sup>42</sup>

### 2.3.1. Wittigova reakcija

Wittigova reakcija se uglavnom koristi za sintezu alkena, a time i za sintezu stilbena i njihovih derivata. Za provođenje reakcije potreban je aldehid ili keton koji sadrži karbonilnu funkcijsku skupinu te fosfonijev ilid koji je sintetiziran in situ (Shema 1). Fosfonijev ilid nastaje reakcijom odgovarajuće fosfonijeve soli s jakim bazom koja deprotonira ugljikov atom vezan na fosfor. Od otkrića reakcije, predloženo je mnogo mehanizama sinteze te se kao najbolji pokazao betainski mehanizam koji se provodi u tri koraka. Neki od razloga zašto se baš ovaj mehanizam pokazao najboljim su da je mehanizam reakcije regioselektivan, da nisu potrebni ekstremni uvjeti već se reakcija može izvoditi pri sobnoj temperaturi, te da se stereoselektivnost reakcije može lako podesiti mijenjajući reaktante.<sup>43,59</sup> Wittigova reakcija je često korištena za sintezu raznih hidroksi-stilbena uz razne pristupe sintezi. Prednost Wittigove reakcije je što se može koristiti mnogo različitih kombinacija baza i otapala, a njihov izbor će ovisiti o početnim spojevima koji se koriste. Neka najčešće korištena otapala su THF ili DMF u kombinaciji s NaH,<sup>44</sup> K<sub>2</sub>OtBu,<sup>45</sup> NaOtBu<sup>46</sup> te u našem slučaju bazom



NaOEt. Također je bitno uzeti u obzir i činjenicu da će odabrana kombinacija baze i otapala znatno utjecati na omjer dobivenih *cis*- i *trans*-izomera.<sup>42</sup>



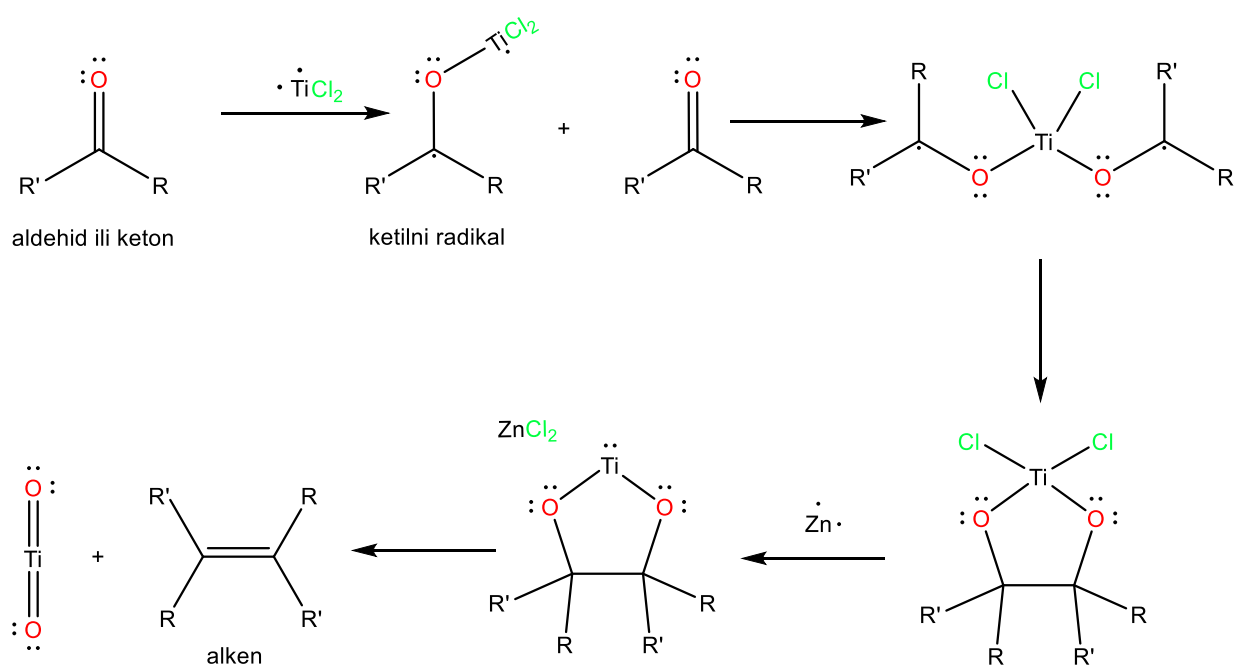
**Shema 1.** Mehanizam Wittigove reakcije.

### 2.3.2. McMurryjeva reakcija

Za sintezu hidroksi-stilbena može se koristiti i McMurryjeva reakcija reduktivnog spajanja karbonila u olefinaciji, a mehanizam je nešto kompliciraniji od onoga Wittigove reakcije (Shema 2). Ponajviše ga karakterizira korištenje niskovalentnog titanijevog reagensa kako bi se sintetizirali alkeni iz karbonilnih prekursora. U ovakvom procesu dolazi do formiranja McMurryjevog reagensa najčešće iz sustava kao što je TiCl<sub>3</sub>/LiAlH<sub>4</sub>, ali je zabilježeno i korištenje drugih metala kao što su cink, krom, željezo, cirkonij te mnogi drugi.<sup>47</sup> Sam McMurry je nakon niza reakcija predložio optimiziran postupak korištenjem kombinacije TiCl<sub>3</sub>(DME)<sub>1,5</sub>-Zn(Cu) koja je dala reproducibilna visoka iskorištenja pri svakom korištenju u reakciji.<sup>48</sup>

Mehanizam se sastoji od dva ključna koraka (Shema 2), pri čemu prvo dolazi do formiranja McMurryjevog reagensa. Prvi korak je redukcija karbonilne skupine aldehida ili ketona koja se zbiva prijenosom jednog elektrona titanija te nastaje ketilni radikal. Takvi radikali zatim dimeriziraju te formiraju metalopinakolatni intermedijer. Deoksigenacija pinakolata se zbiva u drugom koraku rezultirajući nastankom alkena i titanijevog dioksida, najčešće pri uvjetima refluksa. McMurryjeva reakcija je široko korištena, posebno za sintezu srednjih do velikih makrocikličkih sustava te raznih složenih molekula polazeći od

komponentata koje sadrže karbonilnu funkcijsku skupinu u svojoj strukturi.<sup>49</sup> Provedene su razne McMurryjeve reakcije spajanja karbonilnih spojeva koje su rezultirale uspješnom sintezom velikog broja prirodnih spojeva s prstenovima različitih veličina što ovu metodu čini široko primjenjivom.<sup>49,50,51</sup>



**Shema 2.** Mehanizam McMurryjeve reakcije.

## 2.4. Računalno modeliranje

Računalna kemija grana je kemije koja koristi računalno modeliranje i simulacije, što uključuje *ab initio* pristupe temeljene na kvantnoj mehanici, ali i računalne metode koje su razvijene korištenjem empirijskih podataka, u svrhu proučavanja struktura i svojstava molekula i materijala.<sup>52</sup> Nekada su računalno modeliranje koristili samo izrazitoiskusni stručnjaci u tom području, ali danas je tehnološkim napretkom, te razvojem novih algoritama i programskih paketa, to znatno pojednostavljeno i omogućeno je korištenje većem broju znanstvenika.<sup>53</sup> Računalni kvantno-kemijski programi omogućavaju proučavanje te simulaciju kemijskih fenomena bez provedbe laboratorijskih istraživanja pri određivanju svojstava molekula i ispitivanju tijeka kemijskih reakcija. Simulacije nisu savršene i najčešće ne oponašaju realne molekulske sustave sa 100%-tnom točnošću, ali, ovisno o svojstvu ili procesu koji se želi simulirati, daju veoma točne rezultate i zadovoljavajuća predviđanja. Računalno je moguće provesti vrlo kompleksne račune u svrhu optimizacije geometrije molekula te analizu konformacijskog prostora molekulskih sustava. Osim za proučavanje stabilnosti molekula, računalne metode mogu se koristiti i za modeliranje kratko-živućih, nestabilnih intermedijera i prijelaznih stanja, čije se strukture teško mogu opaziti eksperimentalno. Također, mogu poslužiti kao potvrda eksperimentalno dobivenih molekula s određenim svojstvima i strukturnim obilježjima<sup>54</sup>, ali i za predviđanje svojstava molekula koje još nisu eksperimentalno priređene. Osnovna i najkorisnija veličina kojom se služi je energija sustava s obzirom na njegovu strukturu. Energijskom analizom molekula moguće je predvidjeti koji procesi će se moći odviti i s kojom vjerojatnošću. Računalna kemija energiju sustava definira kao opis stabilnosti sustava odnosno najstabilniji sustav onaj je s najmanjim sadržajem energije. Termodinamika je jedan od najrazrađenijih načina matematičkih opisa kemijskih sustava te definira entropiju i slobodnu energiju, stoga se računalna kemija oslanja na termodinamičke opise stanja kemijskog sustava. Kako bi se pojednostavile kompleksne matematičke jednadžbe korištene u računalnoj kemiji, koriste se atomske jedinice uvedene za olakšanje i ubrzavanje izračuna. Kako bi se pobliže opisala i utvrdila točna elektronska struktura molekula, pribjegava se kvantnoj mehanici. Ona se temelji se na osnovnim zakonima fizike ili njihovim aproksimacijama, poput Schrödingerove jednadžbe, Born-Oppenheimerove aproksimacije, varijacijskog teorema. Koncept kvantne mehanike, koja predstavlja temelj za opisivanje subatomske strukture, razvijen je ponajviše zahvaljujući dva znanstvenika, Erwinu Schrödingeru i Werneru Heisenbergu. Valne funkcije elektrona i sva svojstva izvedena iz energije mogu se izračunati rješavanjem Schrödingerove jednadžbe.

Međutim, ta se jednadžba egzaktno može riješiti samo za jednoelektronske sustave. Iz tog razloga, za detaljniji uvid u kvantno-mehanička svojstva i strukturu određenih molekula, potrebno je uzeti u obzir dodatne parametre. *Ab initio* (lat. „od početka“) metode zasnovane na rješavanju vremenski neovisne Schrödingerove jednadžbe. Hartree-Fock (HF) metoda višeelektronsku Schrödingerovu jednadžbu rastavlja na jednostavnije jednoelektronske koje se potom rješavaju za dobivanje valne funkcije jednog elektrona. Metoda je limitirana u smislu da u računu u obzir uzima prosječno odbijanje svih elektrona zbog istoimenih naboja, umjesto pojedinačnih međusobnih odbijanja svakog elektrona s drugim. Vjerojatnost nalaženja elektrona na nekom položaju u prostoru određuje se temeljem njegove udaljenosti od jezgre s obzirom na privlačenje između elektrona i jezgre, a međuelektronska odbijanja procjenjuju se kao interakcija između svakog pojedinog elektrona i prosječnog naboja kojeg čine svi ostali elektroni u sustavu. Drugim riječima, ne uzima se u obzir međusobna korelacija elektrona. Stoga, veliki broj metoda započinje HF izračunom te potom, budući da je zbog točnijih predviđanja molekulske strukture i energije važno uračunati i koreliranje elektrona, određenom korekcijom, odnosno nekom od post Hartree-Fock metoda. Jedna od takvih je Møller-Plesset (MP) skupina metoda te skupina metoda konfiguracijske interakcije (CI).. Navedeni pristupi ne koriste eksperimentalne podatke u svojim izračunima te se oslanjaju isključivo na teorijske zakone kvantne mehanike i koriste osnovne fizikalne konstante poput Planckove konstante, brzine svjetlosti, mase i naboja.<sup>53</sup> Zbog računalne zahtjevnosti *ab initio* pristupa za kvantno-kemijski opis višeelektronskih sustava, razvijene su metode zasnovane na teoriji funkcionala gustoće, koje su manje zahtjevne u smislu duljine računa i korištenja računalnih resursa, ali omogućavaju približno jednako točne karakterizacije proučavanih sustava.<sup>55</sup>

#### **2.4.1. Teorija funkcionala (elektronske) gustoće**

Kao središnja veličina u teoriji funkcionala (elektronske) gustoće (DFT) koristi se elektronska gustoća te se teorija temelji na pretpostavci da je za određivanje energije molekule umjesto računanja valnih funkcija dovoljna elektronska gustoća.. Glavna prednost DFT-a u odnosu na metode temeljene na valnoj funkciji je ta što je elektronska gustoća funkcija samo triju prostornih varijabli, dok valna funkcija ovisi o položaju svih elektrona u sustavu i zbog toga je mnogo zahtjevnija u izračunu. Također, elektronska gustoća manje je apstraktan pojam od valne funkcije elektrona te ju je moguće eksperimentalno vidjeti, primjerice pretražnim tunelirajućim mikroskopom. DFT metode ipak se mogu usporediti s *ab*

*initio* metodama po svojoj preciznosti i točnosti.<sup>57</sup> DFT metode se temelje na Kohn-Sham teoriji koja kaže da energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekulskom sustavu. Za razliku od HF metode, DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu reagiraju na kretanje drugih elektrona omogućavajući tako da su privlačne i odbojne sile unutar molekuli u ravnoteži.<sup>55</sup>

Prvu teoriju funkcionala gustoće razvili su 1927. godine Thomas i Fermi, temeljeći svoj izvod na modelu homogenog elektronskog plina. Na temelju svojih istraživanja zaključili su da je energiju osnovnog stanja elektronskog plina moguće odrediti poznavajući samo njegovu elektronsku gustoću, uz određena ograničenja i aproksimacije. Thomas-Fermijev model prvobitno nije naišao na veću praktičnu primjenu, ali značajan je jer predstavlja osnovu za teoriju funkcionala gustoće kakvu se danas koristi. Za razliku od valne funkcije koja predstavlja matematički konstrukt, DFT pristup se zasniva stvarnoj elektronskoj gustoći odnosno postojećem svojstvu molekula.

Najpoznatiji i najčešće korišten funkcional je Becke Three Parameter Hybrid Functionals (B3LYP), koji se sastoji od Becke funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP), kojeg su razvili Lee, Yang i Parr te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni, tvoreći taj funkcional kombinacijom triju parametara. Uz B3LYP također se često koriste i BP86, PW91, PBE1PBE, M06-2X, wB97XD, OLYP te BMK. Zbog svoje popularnosti, prednosti u brzini nad *ab initio* metodama iteusporidive preciznosti s naprednim *ab initio* metodama, DFT je postao najčešća korištena kvantno-kemijska metoda.<sup>56,57</sup>

#### 2.4.2. Model polarizabilnog kontinuuma

Pri proučavanju reakcija koje se odvijaju u otopini, u proračun se mora uključiti i doprinos otapala na elektronsku strukturu molekula koje sudjeluju u reakciji. Relativno jednostavan model s učinkovitom primjenom zove se model polarizabilnog kontinuuma (PCM), u kojemu je otapalo modelirano kao dielektrični, kontinuirani medij u kojemu je otopljen tvar polarizirana, a ujedno je i on sam polarizabilan te uslijed promjena u elektronskoj strukturi otopljenih molekula dinamički usklađuje svoj odziv. Reakcijsko polje otapala kao homogen polarizabilan kontinuum svoja svojstva ima sadržana u skalarnoj veličini dielektrične konstante ( $\epsilon$ ) ili prema novijem nazivu relativna permitivnost. Uz aproksimaciju da su orijentacija i raspodjela molekula otapala oko otopljenih tvari konstantno

u ravnoteži s njihovom geometrijom i elektronskom gustoćom, uzima se samo statički iznos dielektrične konstante. U modelu se zamišlja da je molekula smještena u šupljinu unutar homogenog, kontinuiranog medija otapala te da je šupljina ispunjena vakuumom, čime  $\epsilon$  unutar šupljine iznosi 1 za vakuum, a izvan je jednaka dielektričnoj konstanti otapala. Problem PCM-a je što su dva otapala istih  $\epsilon$  opisana na identičan način, bez obzira na postojeće razlike kemijskih/fizikalnih svojstava kao što je viskoznost, polarnost ili sposobnost stvaranja vodikovih veza. Unatoč tomu, u većini slučajeva dobiveni su valjani rezultati za slobodne energije solvatacije podešavanjem drugih faktora u izračunu, prvenstveno svojstava spomenute šupljine. Postoje napredniji modeli koji su prošireni eksplicitnim molekulama otapala, što daje znatno bolje rezultate, ali to nužno povećava kompleksnost danog sustava.<sup>56</sup>

### 2.4.3. Optimizacija geometrije molekula

Optimizacija geometrije je iterativni proces izračunavanja strukturnih parametara molekula u određenom koordinatnom sustavu koji opisuje položaj jezgara. Jedan od ciljeva korištenja metoda kvantne kemije jest predviđenu strukturu molekule optimizirati do oblika s najnižom energijom što ju čini termodinamički najstabilnijom u danom sustavu. Energijski najpovoljnije konformacije u našem istraživanju određene su na M06-2X/6-31+G(d) razini teorije, što znači da smo koristili Truhlarov funkcional M06-2X,<sup>58</sup> uz Popleov skup osnovnih funkcija 6-31G(d) za matematički opis molekulskih orbitala. U računima smo koristili programski paket Gaussian16.<sup>59</sup> Pri malim strukturnim promjenama dolazi do promjene energije molekule, a odnos tih dviju promjena prikazan je plohom potencijalne energije (PES). Točke minimuma nazivaju se potencijalne jame i odgovaraju strukturama najnižih potencijalnih energija. Suprotno tome, točke maksimuma na PES odgovaraju prijelaznim stanjima koja se nalaze na putu između dva minimuma na plohi. Geometrijska optimizacija započinje početnim razmještanjem atoma u molekuli na određen način u koordinatnom sustavu. Izračunava se energija i gradijent energije u toj točki, a potom se s obzirom na promjenu sile i energije u različitim smjerovima, iterativnim postupkom određuje promjena geometrije za sljedeći korak optimizacije u smjeru minimuma na PES.<sup>53,56</sup> Kada neka geometrija molekule u dva uzastopna koraka rezultira jednakom vrijednošću energije, postignuta je samousklađenost (engl. *self-consistency*) odnosno minimum na PES te se ta geometrija smatra rješenjem za danu razinu teorije. Molekule koje imaju složeniju strukturu s više jednostrukih i dvostrukih veza imaju mogućnost zauzimanja velikog broja konformacija uslijed rotacija supstituenata oko veza te prostornog razmještanja. Svaka se konformacija

razlikuje u termodinamičkoj stabilnosti za određeni iznos energije. Pri tome, različite početne konformacije neke molekule završavaju u vlastitim minimumima energije, pa je potrebno svaki konformer zasebno optimizirati i potom ih usporediti kako bi se moglo procijeniti koji od njih je najstabilniji, odnosno najniže energije te najviše zastupljen u realnom sustavu.

#### 2.4.4. Docking

Molekulski docking predstavlja znanstvenu disciplinu koja opisuje tzv. pristajanje dviju ili više struktura (npr. pristajanje lijeka i enzima ili proteina). Drugim riječima, molekulski docking čini tehniku molekulskog modeliranja korištenu za predviđanje interakcija između proteina (enzima) i malih molekula, tj. liganada.<sup>60</sup> O mogućnosti interakcije proteina ili enzima s malim molekulama ili ligandima te formiranju njihovih supramolekulskih kompleksa ovisi biološka funkcija samog proteina koja se time može inhibirati ili povećati. Molekulski docking može opisati ponašanje liganada u veznim mjestima određenih proteina čime se uostalom može odrediti željena orijentacija liganda u veznom mjestu proteina kao i afinitet između proteina i liganda. Molekulski docking se s obzirom na vrste liganada može podijeliti na nekoliko skupina. Molekulski docking između proteina i malih molekula (liganada) predstavlja najjednostavniju metodu. S druge strane, molekulski docking između dvije molekule proteina predstavlja nešto kompleksniji sustav zbog fleksibilnosti proteinske strukture te vrlo lake promjene njihove konformacije. Molekulski docking se može izvesti postavljanjem rigidnih molekula ili njihovih fragmenata u aktivno mjesto proteina koristeći različite pristupe kao što su pretraživanje klika, geometrijsko raspršivanje ili grupiranje poza. Izvedba molekularnog dockinga ovisi o algoritmu pretraživanja. Molekulski docking se može podijeliti u dva koraka izvedbe. Prvi korak molekularnog dockinga je stvaranje sastava svih mogućih konformacija i orijentacija proteina uparenog s ligandom. U drugom koraku funkcija bodovanja uzima ulazne podatke i vraća broj koji označava povoljnu interakciju.<sup>61</sup> Kako bi se princip molekularnog docking ispravno razumio, potrebno je definirati neke od najčešćih pojmova korištenih u molekularnom dockingu kao što su receptori i ligandi. Pod receptorima se podrazumijevaju proteini ili polimerne strukture koje specifično prepoznaju i vežu ligande koji su molekule s ulogom kemijskih glasnika („messengera“). Ligandima se smatraju komplementarne molekule koje se vežu u aktivno mjesto receptora čime se ostvaruje efektivan biomolekulski odgovor. Ligandima se najčešće nazivaju male molekule lijeka, neurotransmitori, hormoni, antigeni i mnoge druge molekule.<sup>52</sup>

Kako bi se molekularni docking mogao provesti, potrebno je imati jasne strukture receptorskih molekula. Struktura receptora može se dobiti raznim eksperimentalnim tehnikama kao što su kristalografija X-zrakama ili NMR. Kvaliteta dobivene strukture receptora igra važnu ulogu u uspjehu molekularnog dockinga, te općenito vrijedi da se dobiju bolji rezultati što je veća rezolucija kristalne strukture receptora. Sljedeći važan faktor koji određuje kvalitetu strukture receptora je Debye-Waller faktor ili *B*-faktor koji opisuje slabljenje raspršenja X-zraka ili raspršenje koherentnog neutrona uslijed toplinskog gibanja. *B*-faktor zapravo daje uvid u vibracije različitih dijelova proteinske strukture te ukoliko je njegov iznos mali, tada se taj dio strukture smatra kompaktno i uređeno složenim, a ukoliko je njegov iznos velik struktura se smatra jako fleksibilnom. Važno je odrediti *B*-faktor kako bi se pronašla optimalna mjesta na molekuli receptor gdje se može smjestiti ligand, a to su mjesta na strukturi s malim iznosom *B*-faktora.<sup>54</sup> Kao što je već spomenuto, molekularni docking se može podijeliti u 3 skupine. Najčešće korištena skupina je molekularni docking između proteina i liganda zbog njegove važnosti za razvoj lijekova na temelju struktura. Nadalje, molekularni docking između proteina i liganda se može podijeliti na docking rigidnih struktura, gdje se i receptor i ligand tretiraju kao rigidne molekule, zatim fleksibilan docking liganda, gdje se receptor drži rigidnim, ali se ligand tretira kao fleksibilan i konačno, fleksibilno pristajanje gdje se u obzir uzima i fleksibilnost receptora i liganda. Među njima najčešće korišten je docking između rigidnog receptora i fleksibilnog liganda.<sup>62</sup> Naposljetku, kako bi se odredila preciznost molekularnog dockinga između proteina i liganda koristi se funkcija bodovanja (ocjenjivanja). Glavni parametri svake funkcije bodovanja su brzina i preciznost dockinga. Idealna funkcija bodovanja još uvijek ne postoji, no ona bi trebala biti istovremeno računalno efikasna i dosljedna.<sup>63</sup>

Zadnjih nekoliko godina molekularni docking je doživio značajan napredak, no još uvijek postoji prostor za napredak.<sup>64</sup> Jedan od izazova molekularnog dockinga su molekule vode u proteinima. Molekule vode igraju važnu ulogu u interakcijama između proteina i liganda. Ako se reakcije posredovane vodom tijekom dockinga zanemare, može doći do odstupanja od predviđenih energija interakcije određene konformacije liganda. Također moguće je vezivanje molekule vode u aktivno mjesto proteina ako je ono bogato polarnim aminokiselinskim ograncima čime je onemogućeno vezanje željenog liganda. Sljedeći problem predstavljaju razna tautomerna i protomerna stanja koje molekule mogu zauzeti zbog čega se često znanstvenici pitaju koje tautomerno stanje je potrebno koristiti za uspješan docking.<sup>65</sup> Najveći problem kod molekularnog dockinga predstavljaju receptori s fleksibilnom



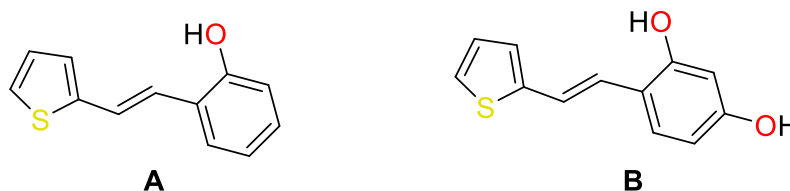
strukturuom pri čemu se često dogodi da isti protein zauzme nekoliko različitih konformacija ovisno o ligandu s kojim se povezuje.<sup>66</sup>

Zaključno, molekularni docking se uspješno primjenjuje u dizajniranju lijekova i procesima otkrivanja novih lijekova te ima tri osnovne svrhe: predviđanje načina vezivanja poznatog aktivnog liganda, identifikacija novih liganada i predviđanje afiniteta vezivanja srodnih spojeva iz poznatih aktivnih skupina. Ova metoda ne samo da igra glavnu ulogu u procesu dizajniranja novih lijekova, već može poslužiti i za traženje potencijalnih meta za identifikaciju različitih bolesti.<sup>64</sup>

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

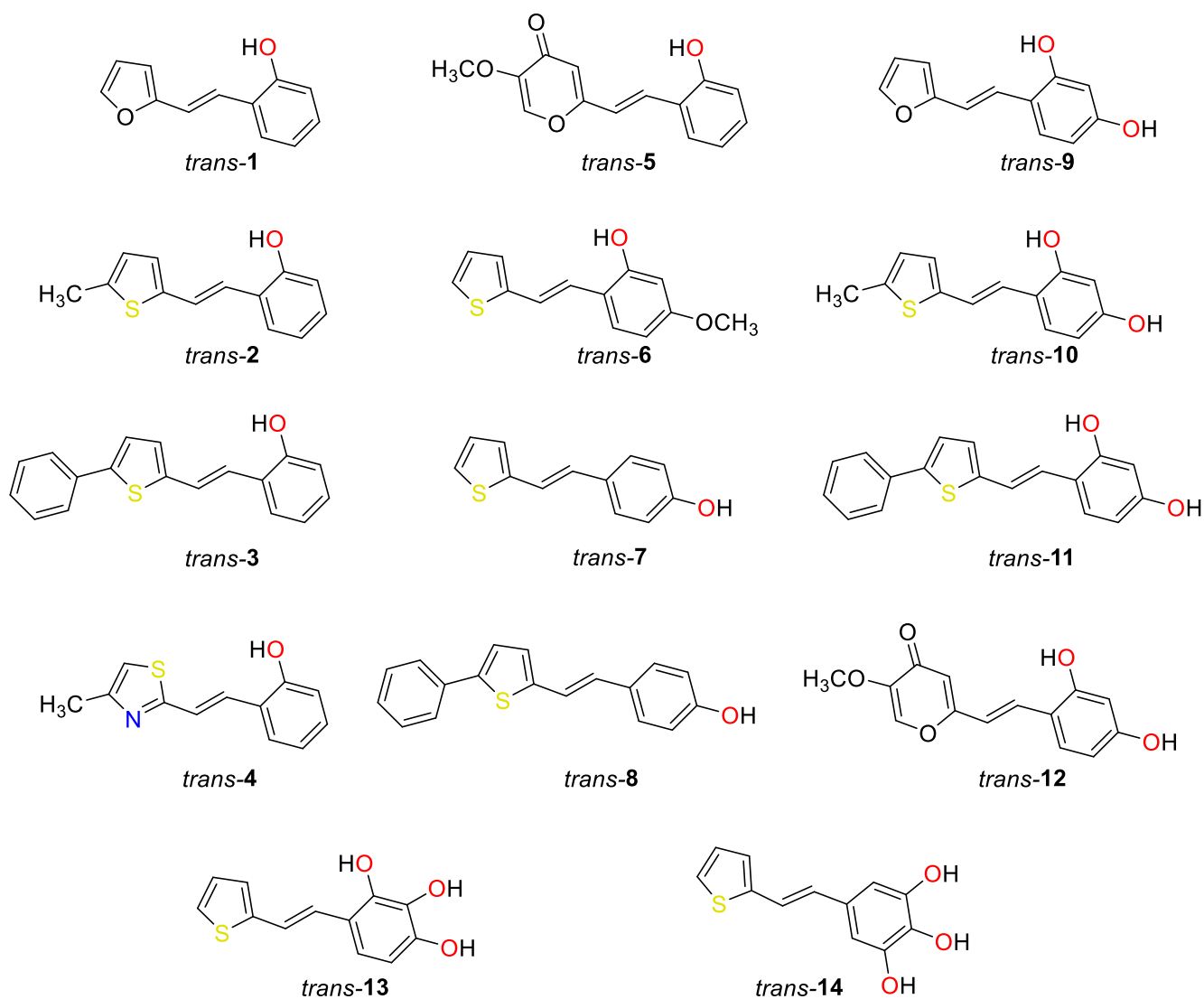
#### 3.1. Uvod

Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju ovoga rada, hidroksi-stilbeni (posebno *trans*-rezveratrol) veoma su interesantni u smislu višestruke koristi u terapijskim primjenama zahvaljujući njihovom biološkom djelovanju. U našem istraživačkom laboratoriju, u prijašnjim znanstvenim istraživanjima, tiofenski analozi hidroksi-stilbena, derivati **A** i **B** (Slika 4), pokazali su dobro biološko djelovanje,<sup>67</sup> s potencijalnom inhibicijom enzima kolinesteraza i visokim vrijednostima za antioksidacijsko djelovanje. Iz navedenoga razloga su u ovome znanstvenom radu upravo spojevi **A** i **B** korišteni kao polazište za razvoj novih rezveratrolnih derivata.



**Slika 4.** Strukture tiofenskih derivata **A** i **B**.

U svrhu dobivanja derivata *trans*-rezveratrola s potencijalnom biološkom aktivnošću, u smislu inhibicijske aktivnosti prema kolinesterazama, antioksidativne i protuupalne aktivnosti, u ovome radu sintetizirano je 14 novih spojeva s različitim brojem i vrstom supstituenata na aromatskim prstenovima (Slika 5), s naglaskom na hidroksilne skupine koje posebno pridonose biološkoj aktivnosti. Dobiveni spojevi pokazali su inhibicijske učinke na kolinesteraze te protuupalna i antioksidativna svojstva što ih čini zanimljivom novom skupinom spojeva za daljnje profiliranje kao aktivnih komponenti.

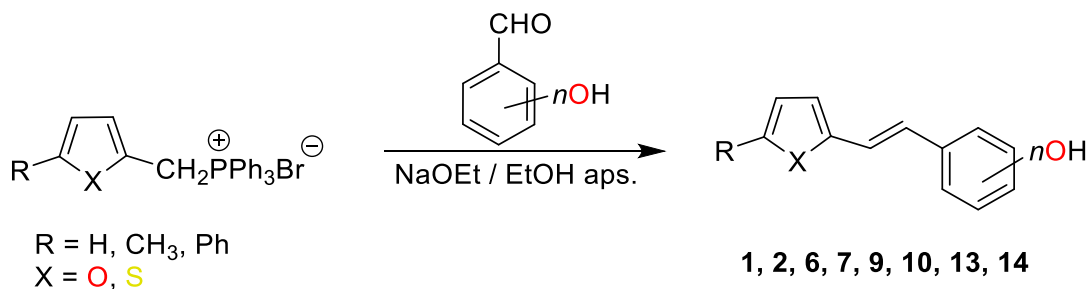


**Slika 5.** Strukture novih sintetiziranih hidroksi-stilbena **1-14**.

## 3.2. Sinteza i karakterizacija novih hidroksi-stilbena

### 3.2.1. Sinteza spojeva 1, 2, 6, 7, 9, 10, 13 i 14 Wittigovom reakcijom

Spojevi **1**, **2**, **6**, **7**, **9**, **10**, **13** i **14** (Slika 5) sintetizirani su Wittigovom reakcijom (Shema 3) iz odgovarajućih fosfonijevih soli i aldehida, koristeći NaOEt kao bazu te apsolutni etanol kao otapalo. Kao produkti dobivene su smjese s različitim udjelima *cis*- i *trans*-izomera navedenih derivata, iz kojih su izolirani isključivo *trans*-izomeri.



**Shema 3.** Sinteza hidroksi-stilbena **1**, **2**, **6**, **7**, **9**, **10**, **13** i **14** Wittigovom reakcijom.

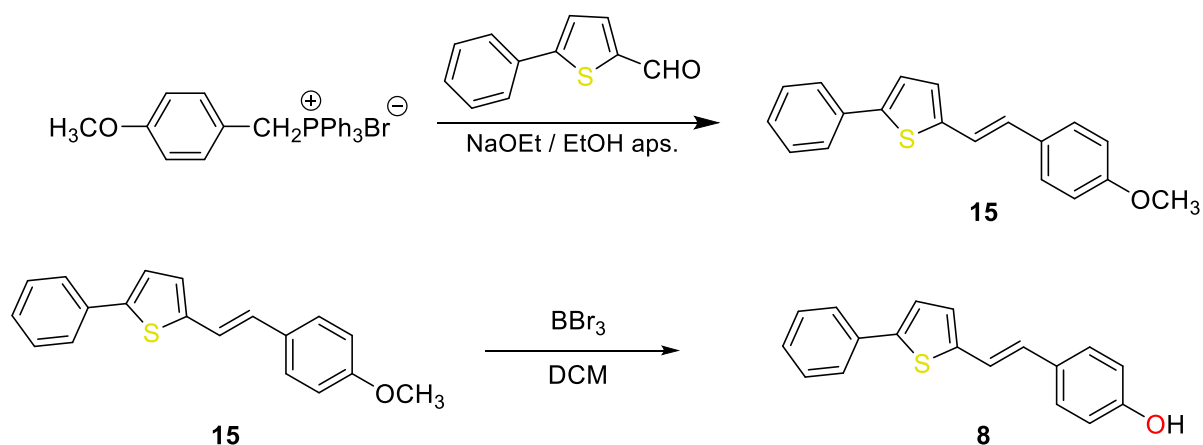
Dobivene smjese pročišćene su kolonskom kromatografijom te su istim principom izolirani čisti *trans*-izomeri. Kolona je punjena silika-gelom, a kao eluens korištene su smjese otapala PE/E i PE/EtOAc različitih polarnosti. Valja napomenuti da su za izoliranje čistih *trans*-**13** i *trans*-**14** izomera potrebni dodatni procesi pročišćavanja, obzirom na veliku sličnost u polarnosti s trifenilfosfin-oksidom. Derivati **1**, **2**, **6**, **13** i **14** pokazuju relativno dobra iskorištenja (redosljedom 28 %, 40 %, 40 %, 50 %, 60 %), dok derivati **7**, **9** i **10** daju vrlo mala iskorištenja (3%, 5 % i 3%). Uspoređujući iskorištenja derivata **1** i **2** s derivatima **7**, **9** i **10** može se zaključiti kako *ortho*-položaj hidroksilne skupine na benzenskoj jezgri više odgovara ovom tipu reakcije te derivati s hidroksilnim skupinama u *ortho*- i *para*-položaju daju slabija iskorištenja. Nadalje, derivat **6** pokazuje kako prisutnost metoksi-skupine u *para*-položaju pozitivno utječe na iskorištenje reakcije, dok derivati **13** i **14** pokazuju da je iskorištenje najveće ukoliko benzenska jezgra sadrži tri hidroksilne skupine, odnosno ukoliko su dvije u *meta*-položaju i jedna u *para*-položaju.



**Slika 6.** Provedba Wittigove reakcije u laboratoriju.

### 3.2.2. Sinteza hidroksi-stilbena **8**

Spoj **8** (Slika 5) sintetiziran je prevođenjem metoksi-skupine prisutne u spoju **15** u hidroksilnu pomoću reagensa  $\text{BBr}_3$  i u DCM kao otapalu. Spoj koji je preveden u derivat **8** prethodno je dobiven Wittigovom reakcijom iz odgovarajuće soli i aldehida. Kao produkt te reakcije dobivena je smjesa *cis*- i *trans*-izomera derivata **15**. Kolonskom kromatografijom izoliran je čisti *trans*-**15**, koji je potom preveden u derivat **8**.



**Shema 4.** Sinteza hidroksi-stilbena **8**.

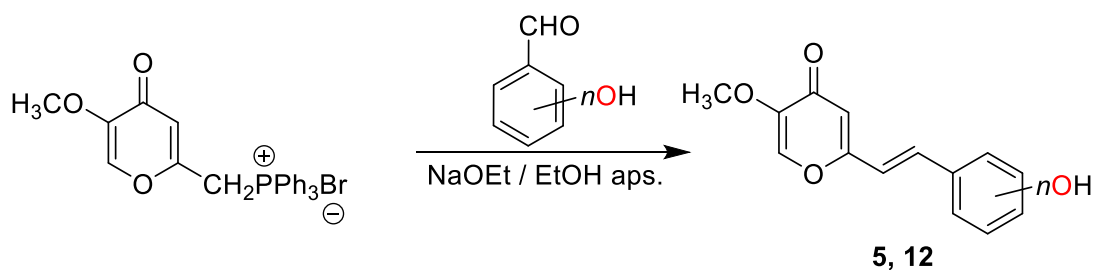
Dobiveni organski produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom do čistog *trans*-**8**. Kolona je punjena silika-gelom, a kao eluens korištene su smjese otapala PE/E i PE/DCM različitih polarnosti. Derivat **8** sintetiziran je uz zadovoljavajuće iskorištenje od 21 %.



**Slika 7.** Provedba sinteze derivata *trans*-**8**.

### 3.2.3. Sinteza spojeva 5 i 12 Wittigovom reakcijom

Spojevi **5** i **12** (Slika 5) sintetizirani su Wittigovom reakcijom (Shema 5) iz odgovarajućih fosfonijevih soli i aldehida, koristeći NaOEt kao bazu te apsolutni etanol kao otapalo. Kao produkti dobivene su smjese različitih udjela *cis*- i *trans*-izomera derivata **5** i **12**.



**Shema 5.** Sinteza hidroksi-stilbena **5** i **12**.

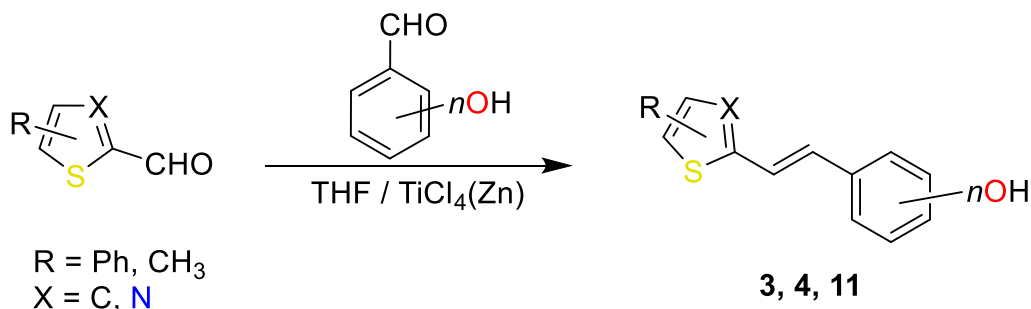
Iz dobivenih smjesa uzastopnom kolonskom kromatografijom izolirani su čisti *trans*-izomeri **5** i **12**. Kolona je punjena silika-gelom, a kao eluens korištene su smjese otapala PE/E i EtOAc/MeOH različitih polarnosti. Niska iskorištenja ovih derivata (8 % i 5 %) ukazuju na to da ovaj pristup sintezi nije idealan, a nastali trifenilfosfin-oksidi dodatno otežava izolaciju čistih *trans*-izomera.



**Slika 8.** Priprava piranonske soli za sintezu derivata *trans*-**5** i *trans*-**12**.

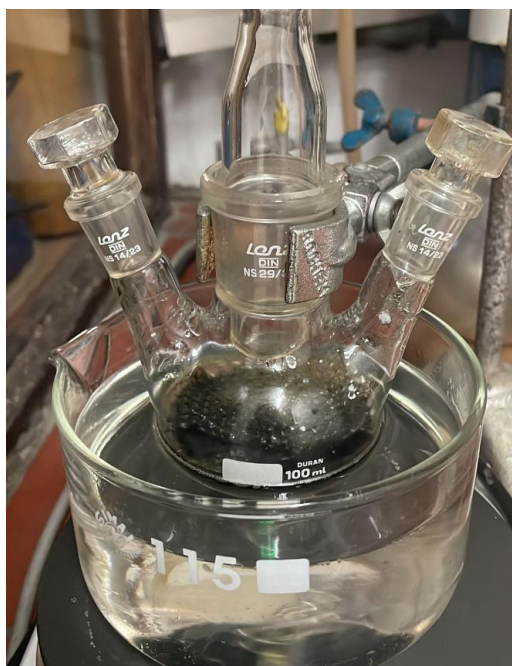
### 3.2.4. Sinteza hidroksi-stilbena **3**, **4** i **11** McMurryjevom reakcijom

Spojevi **3**, **4** i **11** sintetizirani su prateći mehanizam McMurryjeve reakcije koristeći THF kao otapalo te reagens  $\text{TiCl}_4$  i praškasti Zn. Dobiveni organski produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom.



Shema 6. Sinteza hidroksi-stilbena **3**, **4** i **11**.

Kolonskom kromatografijom izolirani su čisti *trans*-izomeri derivata **3**, **4** i **11**. Kolona je punjena silika-gelom, a kao eluens korištene su smjese otapala PE/E i PE/DCM različitih polarnosti. Naspram derivata dobivenih Wittigovom reakcijom, uočeno je bolje iskorištenje kod derivata **11** (10 %) s dvije hidroksilne skupine na benzenskoj jezgri u *ortho*- i *para*-položajima u odnosu na derivate **3** i **4** (5 %) gdje je hidroksilna skupina samo u *ortho*-položaju.



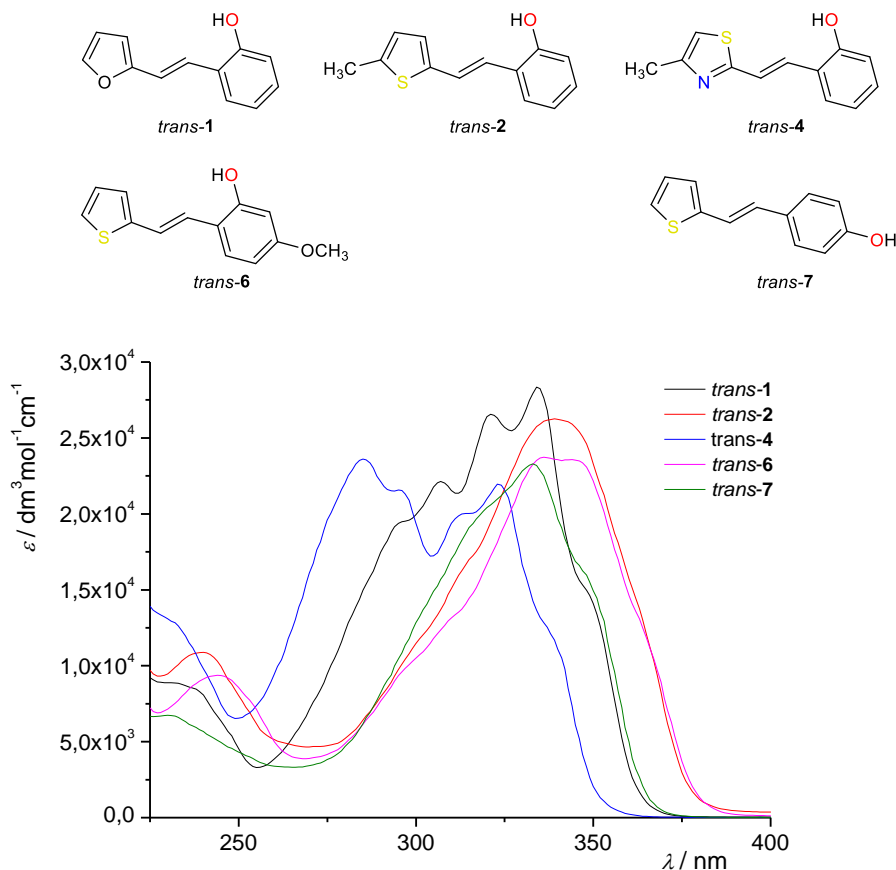
Slika 9. McMurryjeva reakcija.



### 3.2.5. Spektroskopska karakterizacija novih hidroksi-stilbena 1-14

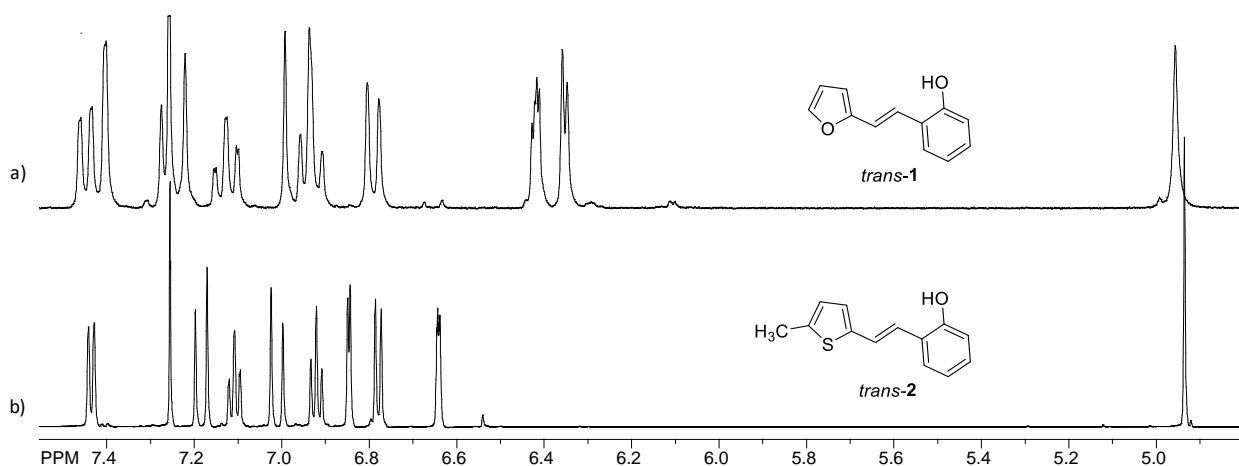
Strukture i čistoće novih hidroksi-stilbena **1-14** potvrđene su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom, UV-Vis spektroskopijom te masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRMS). U nastavku ovoga poglavlja prikazani su neki izdvojeni spektri te prokomentirani signali u njima, kako bi se vidio utjecaj strukture spojeva, broja i tipa supstituenata te određenog prisutnog heteroatoma na spektroskopske karakteristike.

Na slici 10 prikazani su kvantitativni UV spektri molekula *trans-1*, *trans-2*, *trans-4*, *trans-6* i *trans-7*, snimljeni u ACN. Vidljivo je kako najveću vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta postiže derivat *trans-1* ( $\epsilon = 28358 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a najveću valnu duljinu maksimuma apsorpcije postiže *trans-2* derivat (339 nm). U usporedbi s *trans-2* derivatom uočava se kako prisutnost dušikovog atoma u strukturi kod *trans-4* derivata rezultira hipsokromnim pomakom i smanjenjem intenziteta apsorpcije odnosno hipokromnim efektom. Uspoređujući derivate *trans-6* i *trans-7* vidljivo je da prisutnost metoksi-skupine u *para*-položaju kod derivata *trans-6* rezultira batokromnim pomakom u odnosu na derivat *trans-7*.



**Slika 10.** Usporedni prikaz UV spektara za derivate *trans-1*, *trans-2*, *trans-4*, *trans-6* i *trans-7*, snimljene u acetonitrilu.

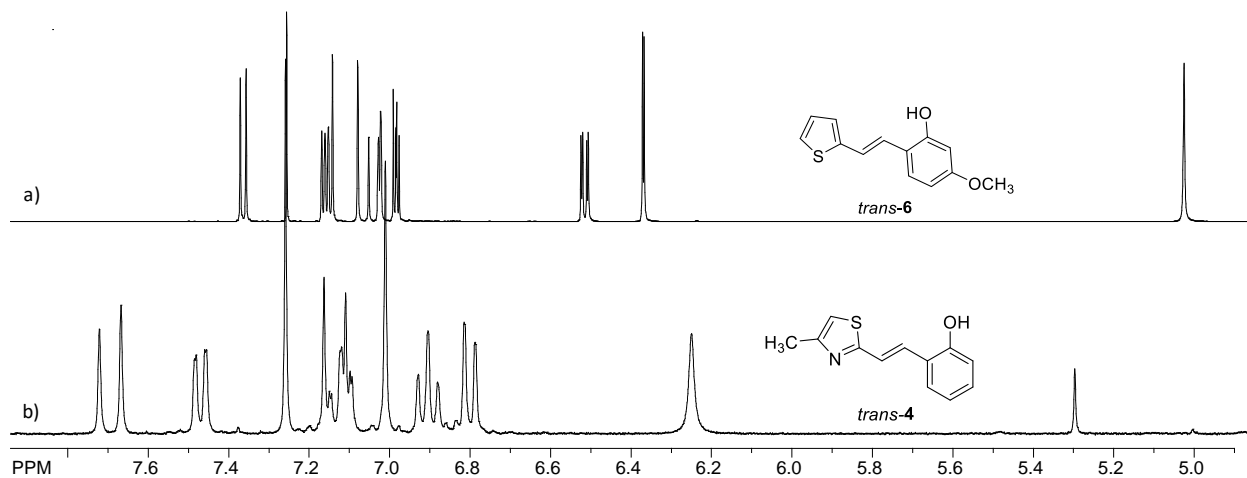
Na Slici 11 prikazani su  $^1\text{H}$  NMR spektri *trans-1* i *trans-2* derivata u području kemijskog pomaka od 4,8-7,5 ppm. Signali za etenske protone, s karakterističnom konstantom sprege od oko 16 Hz za *trans*-derivate, nalaze se na približno jednakim kemijskim pomacima. Isto se može uočiti i za oba signala protona hidroksilne skupine na oko 4,9 ppm. Dodatno, *trans-2* u spektru ima signal metilnih protona kao singlet s integralom 3H na 2,48 ppm. Područje fenolnih protona se kod oba derivata nalazi na gotovo jednakim kemijskim pomacima s očekivanim i odgovarajućim integralima, dok su vidljivi signali furanskih protona u području 6,3-6,4 ppm, što kod tiofenskih nije slučaj već su oni pri višem kemijskom pomaku.



**Slika 11.** Dijelovi  $^1\text{H}$  NMR spektara spojeva *trans-1* (a) i *trans-2* (b).

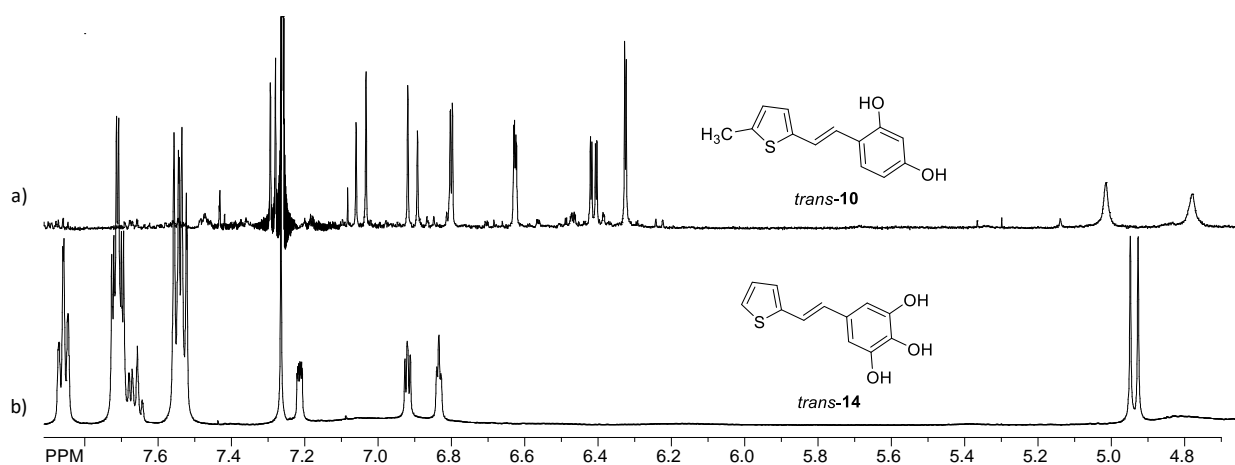
Na Slici 12 prikazani su  $^1\text{H}$  NMR spektri *trans-6* i *trans-4* derivata u području kemijskog pomaka od 4,8-7,8 ppm. Svi signali protona *trans-4* derivata pomaknuti su prema višim kemijskim pomacima odnosno manje su zasjenjeni protoni u usporedbi s protonima *trans-6* derivata. To se najbolje vidi uspoređujući kemijske pomake etenskih protona i protona hidroksilne skupine pri čemu se signali za etenske protone derivata *trans-4* nalaze na oko 7,7 i 7,1 ppm, dok se signali za etenske protone *trans-6* derivata nalaze na oko 7,2 i 7,05 ppm. Također, signal za hidroksilni proton *trans-4* derivata se nalazi na 6,25 ppm, a kod *trans-6* derivata na 5,03 ppm. Nadalje, zbog prisutnosti metoksi-skupine u *para*-položaju uz hidroksilnu u *ortho*-položaju kod derivata *trans-6*, aromatski protoni se nalaze na nižim kemijskim pomacima (6,5 ppm) u odnosu na aromatske protone kod derivata *trans-4* koji sadrži samo hidroksilnu skupinu, Na 2,76 ppm vidljiv je signal metilnih protona s integralom

3H u spoju *trans-4*, a u *trans-6* derivatu na 3,79 ppm se nalazi singlet integrala 3H koji potječe od protona metoksi-skupine.



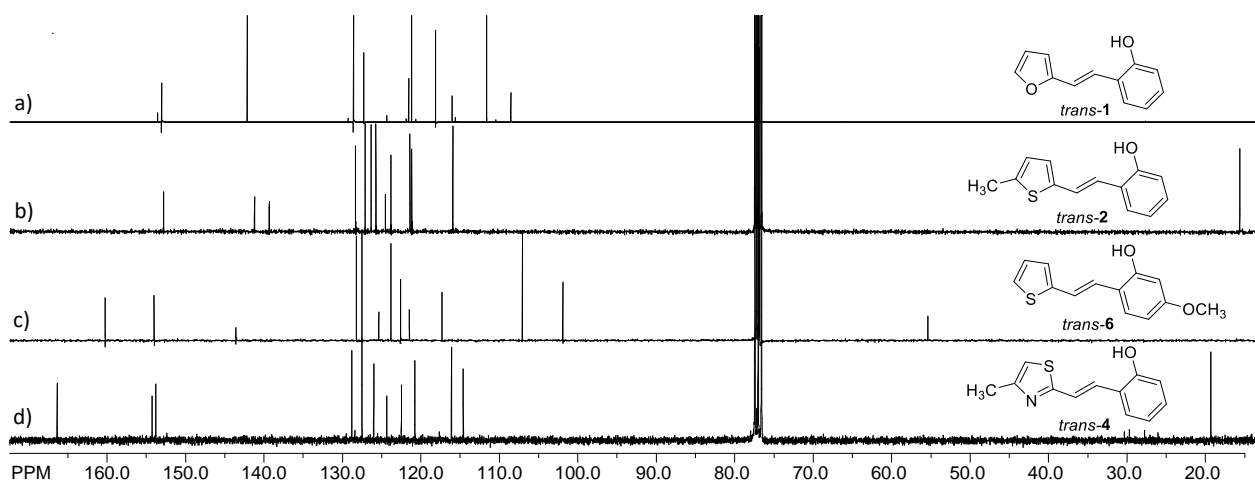
Slika 12. Dijelovi <sup>1</sup>H NMR spektara spojeva *trans-6* (a) i *trans-4* (b).

Na Slici 13 prikazani su <sup>1</sup>H NMR spektri spojeva *trans-10* i *trans-14* u području kemijskog pomaka od 4,8-7,8 ppm. Signali za protone *trans-14* derivata su značajno pomaknuti prema višim kemijskim pomacima u odnosu na signale protona *trans-10* derivata, iako je to slabije uočljivo zbog prisutnog trifenilfosfin-oksida u *trans-14* derivatu na 7,5 i 7,9 ppm. Jasno su vidljivi signali za protone hidroksilnih skupina oba derivata na oko 5 ppm, te se može vidjeti i signal protona treće hidroksilne skupine *trans-14* derivata vidljiv kao široki singlet integrala 1H na 4,8 ppm. Također, u spektru je vidljiv signal metilnih protona integrala 3H u *trans-10* na 2,47 ppm.



Slika 13. Dijelovi <sup>1</sup>H NMR spektara spojeva *trans-10* (a) i *trans-14* (b).

Na Slici 14 prikazani su usporedno  $^{13}\text{C}$  NMR spektri spojeva *trans-1*, *trans-2*, *trans-6* i *trans-4*. Svaki  $^{13}\text{C}$  NMR spektar ima točan broj očekivanih signala koji odgovaraju strukturi analiziranih molekula.



**Slika 14.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri spojeva *trans-1* (a), *trans-2* (b), *trans-6* (c) i *trans-4* (d).

Kod derivata *trans-2* vidi se signal za ugljik metilne skupine na 15 ppm, koji je kod *trans-4* derivata na oko 20 ppm zbog utjecaja tiazolnog prstena umjesto tiofenskog. Ugljik  $\text{CH}_3$  skupine u spoju *trans-6* javlja se na 55 ppm jer je to metoksi-skupina u kojoj je metilna skupina vezana na kisikov atom s induktivnim utjecajem. Za sve derivate su prisutni signali etenskih C-atoma te signali aromatskih ugljika, od kojih su neki u derivatu *trans-6* pomaknuti prema nižim kemijskim pomacima uslijed utjecaja dvije elektron-donorske skupine na aromatskom prstenu. Također se jasno vide signali kvaternih ugljikovih atoma kao niži pikovi slabijeg intenziteta na oko 150 ppm, dok derivat *trans-4* pokazuje signal na oko 170 ppm koji vrlo vjerojatno pripada kvaternom C-atomu smještenom između sumporovog i dušikovog atoma tiazolnog prstena, te ga oni svojim induktivnim utjecajem pomiču prema većim vrijednostima kemijskog pomaka.

### 3.3. Biološka aktivnost

Prethodno je opisana biološka aktivnost i blagotvorna svojstva *trans*-rezveratrola i njegovih poznatih derivata, a novi (u ovom znanstvenom radu) sintetizirani rezveratrolni *trans*-derivati **1-14** pripremljeni su u svrhu ispitivanja njihove potencijalne biološke aktivnosti. Provedena su ispitivanja inhibicije enzima butirilkolinesteraze, antioksidativnog djelovanja, a jedan derivat pokazao je relativno dobra protuupalna svojstva pri ispitivanjima, sve u suradnji sa suradnicima s vanjskih ustanova s kojima postoji kontinuirana suradnja. Svaki od sintetiziranih spojeva ispitan je, a ovisno o razlikama u strukturi, razlikuje se i biološka aktivnost. Glavni čimbenici u odnosu strukture i aktivnosti su vrsta heterocikla, geometrija molekule te vrsta, broj i položaj supstituenata na arilnom prstenu.

#### 3.3.1. Inhibicija kolinesteraza

Istaknute klase organskih spojeva pokazale su potencijalno enzimatsko djelovanje, stoga je važan osvrt na enzime kolinesteraze. Acetilkinolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) dva su srodna enzima prisutna u kralježnjacima i biljkama. Kod ljudi su ti enzimi produkti različitih gena, ali dijele oko 54 % svoje aminokiselinske sekvence.<sup>68</sup> Glavna razlika u njihovom aktivnom mjestu je 14 aromatskih aminokiselinskih ostataka u AChE koji odgovaraju osam aromatskih i šest alifatskih ostataka u BChE. To omogućuje BChE hidrolizu većih supstrata i liganda od AChE koja je odgovorna za selektivnost vezivanja kolinesteraza. AChE ima bitnu fiziološku ulogu u tijelu jer kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkim sinapsama središnjeg i perifernog živčanog sustava hidrolizom neurotransmitera acetilkolina. Također ima ulogu u neuritogenezi, staničnoj adheziji, proliferaciji i međustaničnim interakcijama, sinaptogenezi, aktivaciji dopaminskih neurona, stvaranju amiloidnih vlakana karakterističnih za AD, hematopoezi i trombopoezi. Uloga BChE nije fiziološki bitna, ali bi se mogla pripisati detoksikaciji ksenobiotika (organofosfati i karbamatni pesticidi, kokain, aspirin, sukcinildikolin itd.) i bioaktivaciji lijekova (bambuterol, heroin itd.). Također, BChE služi kao koregulator kolinergičke neurotransmisije i sposoban je katalizirati hidrolizu acetilkolina.<sup>69</sup> Utvrđeno je da su visoke razine BChE povezane s moždanim plakovima i neurofibrilarnim čvorovima, neuropatološkim obilježjima AD.<sup>70</sup> Stoga su obje kolinesteraze farmakološki relevantne mete u neurodegenerativnim bolestima, a današnje liječenje uključuje inhibitore kolinesteraza poput donepezila, galantamina, fizostigmina, rivastigmina itd. Stoga se mnogi drugi spojevi koji djeluju kao inhibitori kolinesteraze smatraju potencijalnim terapijskim sredstvima za AD.

U okviru ovoga rada ispitana je isključivo inhibicija BChE zbog prijašnjih rezultata iz našeg laboratorija koji su pokazali da su spojevi struktura sličnih spojevima *trans-1* do *trans-14* generalno skloniji inhibicijskoj aktivnosti prema BChE u odnosu na AChE. U Tablici 1 dan je prikaz rezultata ispitivanja za svaki derivat, kao i za galantamin koji služi kao standard za usporedbu aktivnosti, jer predstavlja poznati reverzibilni inhibitor. Rezultati su izraženi u obliku potrebne koncentracije spoja za postizanje inhibicije 50 % djelovanja BChE (IC<sub>50</sub>). U tablicama su navedeni i rezultati postignuti od strane tiofenskih derivata **A** i **B** iz našeg laboratorija (Slika 4), koji su uz *trans*-rezveratrol korišteni kao polazište za strukturne modifikacije naših novih spojeva.

Najbolji rezultat postigao je derivat *trans-2* (Tablica 1) s tiofenskim prstenom koji sadrži metilnu skupinu u položaju 5 te jednu hidroksilnu skupinu u *ortho*-položaju na benzenskom prstenu, potrebno je oko deset puta manje spoja za inhibiciju u odnosu na standard galantamin. Neki od derivata nisu pokazali nikakvu inhibicijsku aktivnost prema BChE (*trans-3*, *trans-5*, *trans-7*, *trans-11*, *trans-12*, *trans-15*), a spoj *trans-9* pokazao se nestabilnim, za razliku od *trans-1* koji ima samo jednu hidroksilnu skupinu na benzenskom prstenu. Usporedbom sa spojevima **A** i **B**, vidljivo je da se inhibicijska aktivnost povećava dodatkom metilne ili metoksi-skupine u derivatima s jednom hidroksilnom skupinom, a dvije hidroksilne skupine na benzenu ne rezultiraju većom aktivnošću. Spojevi s nesupstituiranim tiofenom i tri hidroksilne skupine na benzenu (*trans-13*, *trans-14*) također pokazuju bolje rezultate od standarda. Uvođenjem tiazolnog prstena umjesto tiofenskog aktivnost se smanjuje, ali i dalje se postižu dobri rezultati. Očito je da je vrsta heterocikličkog prstena značajna za inhibicijsku aktivnosti, ali isto tako i supstituenti i njihovi položaji.

**Tablica 1.** Rezultati ispitivanja inhibicijske aktivnosti sintetiziranih spojeva **1-14** na BChE.

Spoj	Struktura	IC <sub>50</sub> (μM) BChE	Spoj	Struktura	IC <sub>50</sub> (μM) BChE
<b>A</b>		<b>4,6</b>	<b>B</b>		<b>5,3</b>
<i>trans-1</i>		<b>4,7</b>	<i>trans-9</i>		<i>nestabilan, sklon raspadu</i>
<i>trans-2</i>		<b>0,8</b>	<i>trans-10</i>		<b>129,5</b>
<i>trans-3</i>		/	<i>trans-11</i>		/
<i>trans-4</i>		<b>25,2</b>	<i>trans-12</i>		/
<i>trans-5</i>		/	<i>trans-13</i>		<b>6,2</b>
<i>trans-6</i>		<b>2,4</b>	<i>trans-14</i>		<b>3,4</b>
<i>trans-7</i>		/	<i>trans-15</i>		/
<i>trans-8</i>		/	<b>Galantamin</b>		<b>7,9</b>

### 3.3.2. Antioksidativna aktivnost

Kako je već spomenuto oksidacija je proces koji uzrokuje ubrzano starenje stanica ili čak degradaciju odnosno razvoj bolesti, a sve stanice su tome podložne. Stoga se veliki značaj pridaje otkrivanju spojeva s uspješnim antioksidacijskim svojstvima. Na temelju ispitane i dokazane antioksidativne aktivnosti kod *trans*-rezveratrola i njegovih analoga, sintetizirani derivati *trans*-1 do *trans*-14 ispitani su na antioksidativnu aktivnost DPPH metodom. Tiofenski derivati **A** i **B** također su pokazali dobru aktivnost, pa su uzeti kao predvodni spojevi za daljnju modifikaciju strukture.

Zbog spomenute odlične antioksidacijske aktivnosti, *trans*-rezveratrol se uzima kao standard (Tablica 2). U odnosu na njega potrebna je oko 150 puta manja koncentracija *trans*-1 derivata za isti učinak, koji ujedno pokazuje najbolja antioksidacijska svojstva među sintetiziranim derivatima. Osim njega, spoj *trans*-2 pokazao je odličnu aktivnost (također bolju od standarda) što upućuje na velik doprinos hidroksilne skupine na benzenskom prstenu u *ortho*-položaju te nešto manji doprinos u *para*-položaju (*trans*-7) i da dobru aktivnost uz nesupstituirani furanski prsten postiže metilom supstituiran tiofenski prsten u položaju 5. Dodatna metoksi-skupina u *para*-položaju benzena također znatno povećava antioksidacijsku aktivnost (*trans*-6 također aktivniji od standarda). Fenilni supstituent u položaju 5 tiofenskog prstena nije dobar izbor (*trans*-3, *trans*-8, *trans*-11, *trans*-15), a di- i trihidroksi-supstituirani benzenski prsten u nijednom spoju nije dovoljno povoljan za postizanje IC<sub>50</sub> vrijednosti i zadovoljavajuća antioksidativna svojstva.



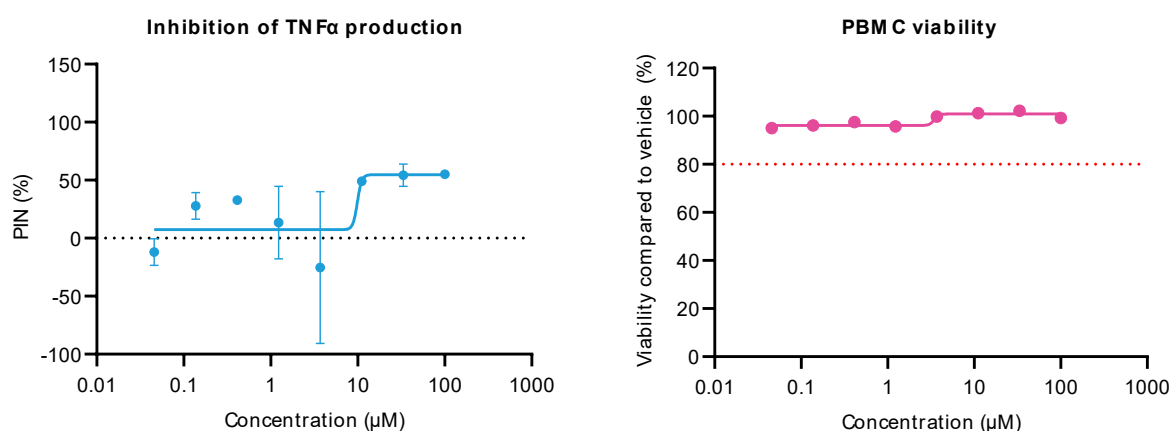
**Tablica 2.** Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti sintetiziranih spojeva 1-14.

Spoj	Struktura	DPPH	Spoj	Struktura	DPPH
A		158,8	B		26,8
<i>trans-1</i>		0,5	<i>trans-9</i>		<i>nestabilan, sklon raspadu</i>
<i>trans-2</i>		45,7	<i>trans-10</i>		/
<i>trans-3</i>		/	<i>trans-11</i>		/
<i>trans-4</i>		/	<i>trans-12</i>		/
<i>trans-5</i>		/	<i>trans-13</i>		/
<i>trans-6</i>		16,4	<i>trans-14</i>		/
<i>trans-7</i>		152,0	<i>trans-15</i>		/
<i>trans-8</i>		/	<i>trans-rezveratrol</i>		75

### 3.3.3. Protuupalna aktivnost

Prva potvrda o snažnoj povezanosti kolinergičkog i imunološkog sustava pojavila se početkom prošlog stoljeća. Uočeno je da je o dozi ovisno smanjenje sistemske proizvodnje TNF- $\alpha$  nakon izazivanja endotoksinom (LPS). Poznato je da je kolinergički protuupalni sustav snažan instrument kojim organizam regulira veličinu upale kako bi osigurao uklanjanje upale. Ključni sudionik u ovom putu je acetilkolin (ACh), a njegovo djelovanje uglavnom je vezano za receptore  $\alpha 7$ nAChR i M1AChR.<sup>71</sup> Kolinergički put funkcionira otpuštanjem ACh, koji agonizira  $\alpha 7$ nAChR receptor i uzrokuje priljev  $\text{Ca}^{2+}$  u stanice. Povećane razine kalcija u stanicama dovode do aktivacije transkripcijskog faktora NF $\kappa$ B i supresije imunološkog odgovora. Ovaj mehanizam mogu prekinuti kolinesteraze (ChE) - enzimi koji razgrađuju ACh na octenu kiselinu i kolin, AChE i BChE. Stoga bi inhibitori ovih enzima mogli imati i protuupalne učinke.<sup>72</sup>

Što se novih spojeva iz ovoga znanstvenog rada tiče, jedino je tiazolni derivat *trans*-**4** pokazao inhibiciju proizvodnje TNF- $\alpha$ . Dakle, jedino hidroksi-stilben koji ima tiazolnu jezgru umjesto furanske ili tiofenske možemo povezati s opisanim mehanizmom povezanosti kolinergičkog i imunološkog sustava.



**Slika 15.** Rezultati ispitivanja protuupalne aktivnosti spoja *trans*-**4**.

Dokazano je da je Alzheimerova bolest multifaktorijalna bolest koja uključuje agregaciju amiloidnih plakova, oksidativni stres i dishomeostazu metalnih iona.<sup>73</sup> U slučaju rezveratrol-maltol hibrida za koje je dokazano da pokazuju mogućnost inhibicije ChE, istraženo je i utvrđeno stvaranje kompleksa s biometalnim ionima kao što je  $\text{Fe}^{3+}$ . Stoga su i spojevi sintetizirani u okviru ovoga rada proučavani kao ligandi za kompleksiranje. Na

derivatima je izvršeno ispitivanje kompleksiranja, no niti jedan derivat nije pokazao mogućnost kompleksiranja s  $\text{Fe}^{3+}$  ionima.

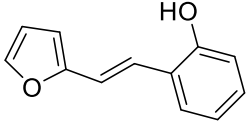
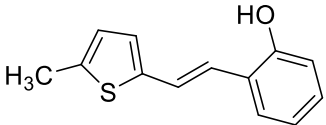
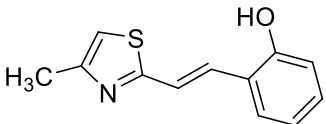
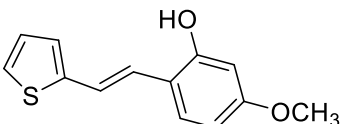
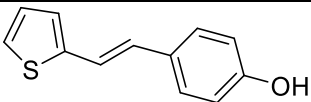
### 3.4. Računalni rezultati

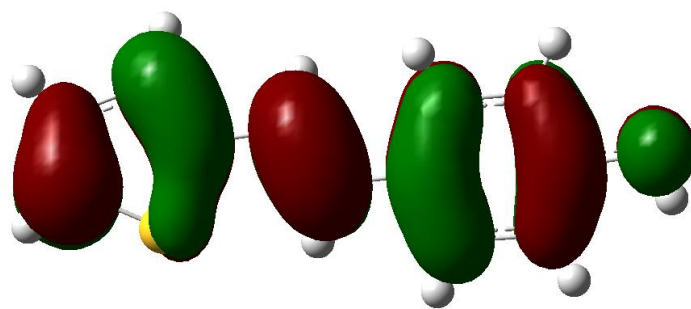
Nakon provedene konformacijske analize za najstabilnije konformere molekula **1**, **2**, **4**, **6** i **7** računani su UV spektri. U obzir su uzeti samo najstabilniji konformeri budući da je razlika između najstabilnijeg konformera i prvog sljedećeg po stabilnosti iznosila više od 5 kJ mol<sup>-1</sup> što znači da je udio tog manje stabilnog konformera u sustavu vrlo mali. U eksperimentalno dobivenim UV-spektrima vidljivi su apsorpcijski maksimumi pri određenim vrijednostima valnih duljina zračenja. Apsorpcijski maksimumi su rezultat elektronskih prijelaza u molekulama, a računalno se može predvidjeti, odnosno izračunati valna duljina svakog određenog prijelaza. U Tablici 3 navedene su eksperimentalno i računski dobivene valne duljine maksimuma apsorpcije UV-zračenja molekula *trans-1*, *trans-2*, *trans-4*, *trans-6* i *trans-7* (Slika 10) te je pripisan određen elektronski prijelaz.

U programu GaussView generirani su prikazi svih molekulskih orbitala između kojih dolazi do prijelaza elektrona uslijed ekscitacije zračenjem. Najznačajniji prijelazi su između energetske najviše okupirane molekulske orbitale (HOMO) te energetske najniže neokupirane molekulske orbitale (LUMO), te kod ispitivanih spojeva energija UV zračenja odgovara upravo tim elektronskim prijelazima. Kod derivata *trans-7* vidljiv je isključivo spomenuti HOMO-LUMO prijelaz (Slike 15 i 16), dok spektri drugih derivata sadrže više pikova od više različitih prijelaza. Derivatu *trans-2* pripisan je HOMO-LUMO prijelaz, ali uz njega dodatna tri elektronska prijelaza (Tablica 3) koji ukupno rezultiraju pikom vidljivim na 208 nm u snimljenom UV-spektru. Kod *trans-4* derivata očuva se slična situacija, dok kod *trans-6* derivata uz HOMO-LUMO prijelaz se može uočiti čak još sedam dodatnih prijelaza koji ukupno rezultiraju pikom vidljivim na 211 nm u snimljenom UV-spektru. HOMO i LUMO te ostale molekulske orbitale koje sudjeluju u prijelazima elektrona prikazane su ispod tablice (Slike 17-22).

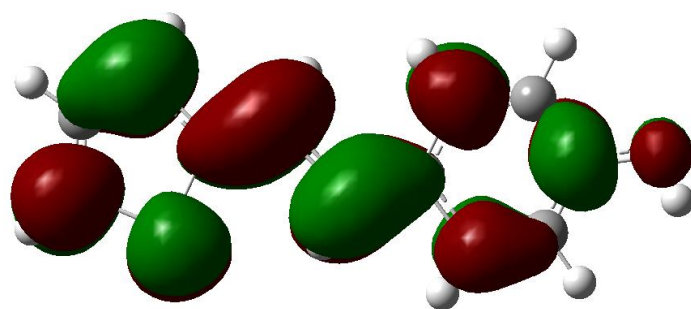
**Tablica 3.** Usporedba eksperimentalno i računalno dobivenih rezultata UV spektara

\* (H-HOMO, L-LUMO)

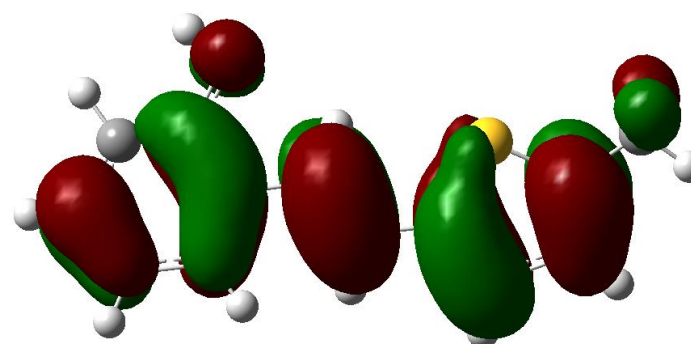
Molekula	Eksperimentalni prijelaz / nm	Računski prijelaz / nm	Asignirani prijelaz
 <p><i>trans-1</i></p>	334	336	H → L
 <p><i>trans-2</i></p>	208	212	H-3 → L+2 H → L+2 H-1 → L+1
 <p><i>trans-4</i></p>	226	234	H → L+3 H → L+2 H-1 → L+1
 <p><i>trans-6</i></p>	211	203	H-3 → L+2 H-2 → L+2 H-1 → L+2 H-4 → L H → L+9 H → L+10 H → L+11
 <p><i>trans-7</i></p>	333	344	H → L



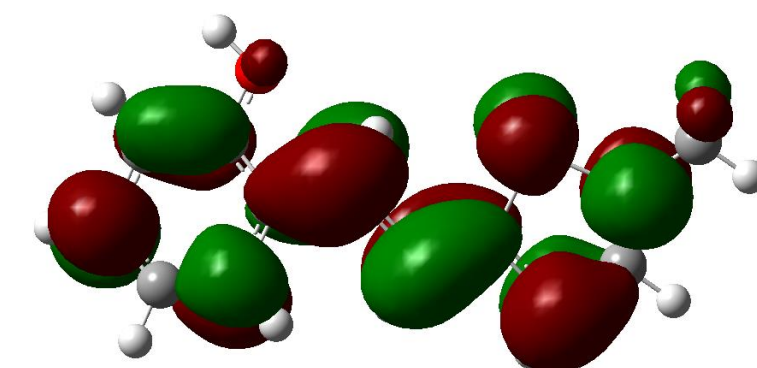
Slika 15. Prikaz HOMO spoja *trans*-7.



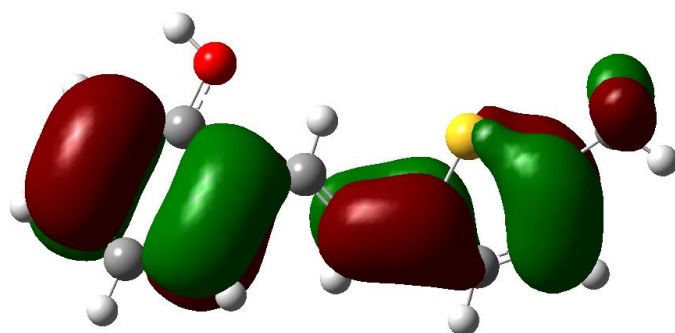
Slika 16. Prikaz LUMO spoja *trans*-7.



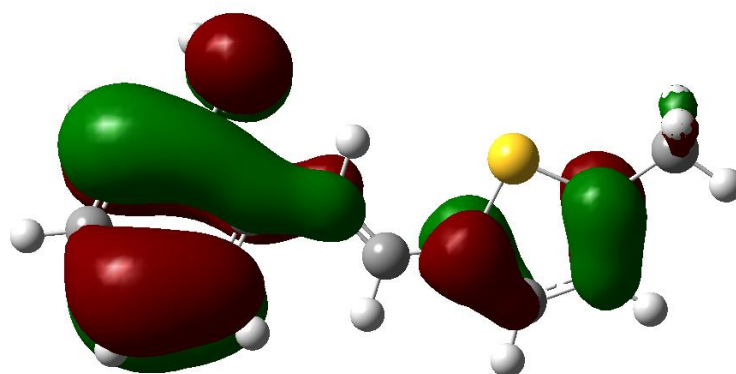
Slika 17. Prikaz HOMO spoja *trans*-2.



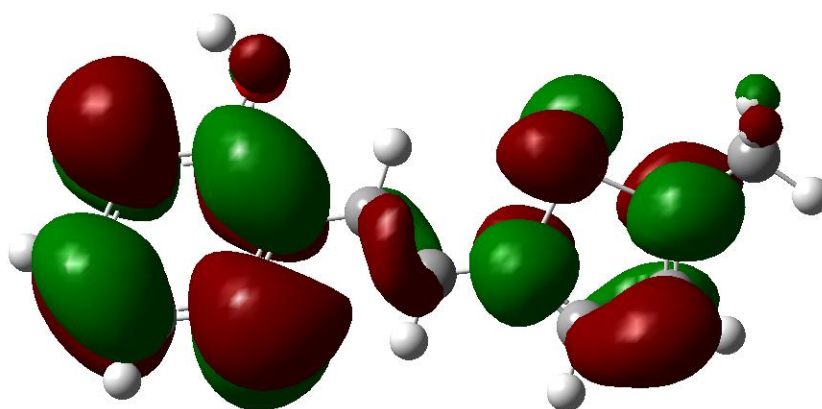
Slika 18. Prikaz LUMO spoja *trans*-2.



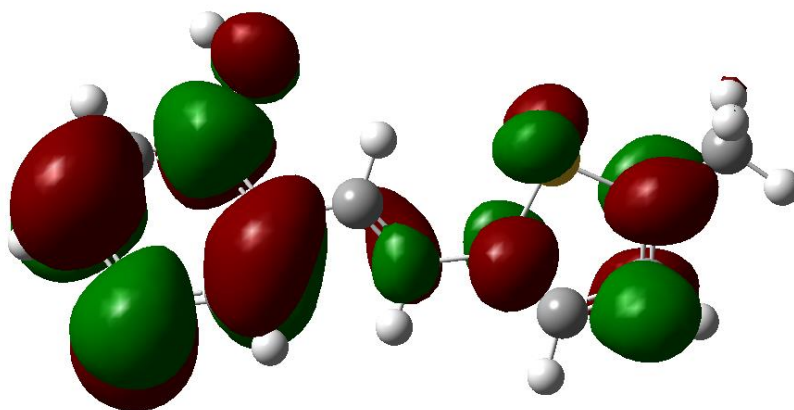
Slika 19. Prikaz H-3 orbitale spoja *trans-2*.



Slika 20. Prikaz H-1 orbitale spoja *trans-2*.



Slika 21. Prikaz L+1 orbitale spoja *trans-2*.



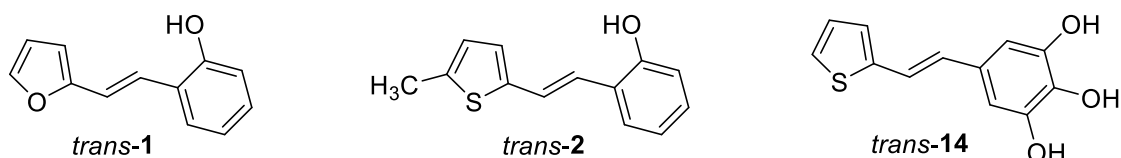
**Slika 22.** Prikaz L+2 orbitale spoja *trans-2*.

Iz eksperimentalnih rezultata prikazanih u Tablici 1 vidimo da je nekoliko spojeva pokazalo snažan potencijal za inhibiciju BChE. Budući da kod ovog tipa molekula očekujemo da će inhibicija biti reverzibilna, tj. da će se inhibitorno djelovanje zasnivati na stvaranju nekovalentnog kompleksa između inhibitora i aktivnog mjesta u enzimu, istražili smo moguće strukture kompleksa odabranih spojeva s BChE. Kompleksi su dobiveni metodom molekuskog dockinga (uklapanja), korištenjem Autodock programa.

Kristalna struktura enzima humane BChE s pdb kodom 1AIY preuzeta je iz proteinske baze podataka. Aktivno mjesto BChE sadrži 15 aminokiselina i podijeljeno je na nekoliko manjih strukturnih domena. Najvažniji dio aktivnog mjesta je katalitička trijada (estersko mjesto) koju čine Ser198, His438 i Glu325 i ono direktno sudjeluje u katalizi. Drugi dijelovi aktivnog mjesta su: anionska subdomena (Trp82, Phe329 i Glu197), oksianionska šupljina koju čine aminokiseline Gly116, Gly117 i Ala199, acilni džep (Leu286 i Val288) te periferno anionsko mjesto (Asp70, Tyr114, Tyr128 i Tyr332). Aktivno mjesto BChE slično je onome kod AChE, s bitnom razlikom u sastavu acilnog džepa: umjesto alifatskih leucina i valina, AChE sadrži dva fenilalanina.

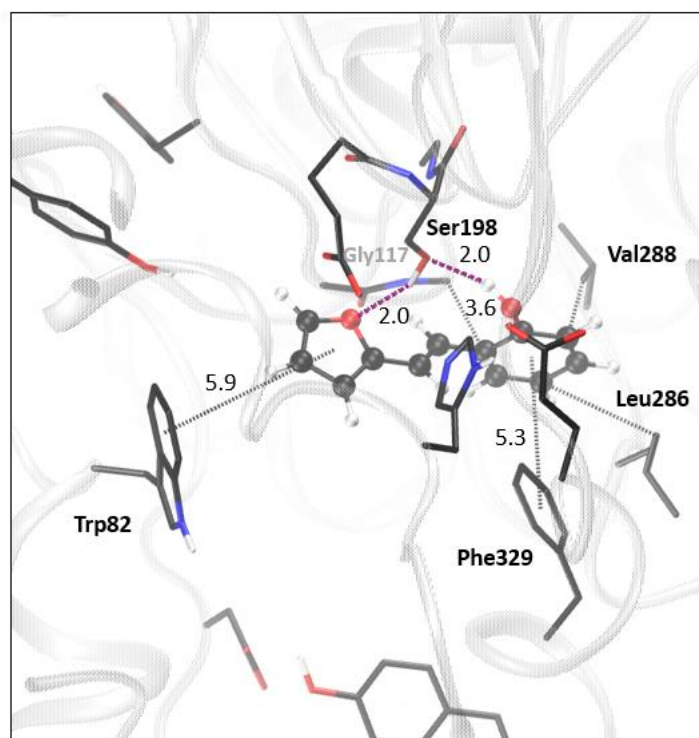
Molekulskim dockingom dobiven je uvid u strukture kompleksa između ispitivanih spojeva i aktivnog mjesta BChE, što je omogućilo identifikaciju međudjelovanja koja su odgovorna za stabilnost kompleksa. Što je kompleks stabilniji, to je raspoloživost kolinesteraze da sudjeluje u katalizi supstrata ograničenija, tj. uspješnija je inhibicija enzima. Za ispitivanje dockingom odabrani su spojevi *trans-1*, *trans-2* i *trans-14* (Slika 23).





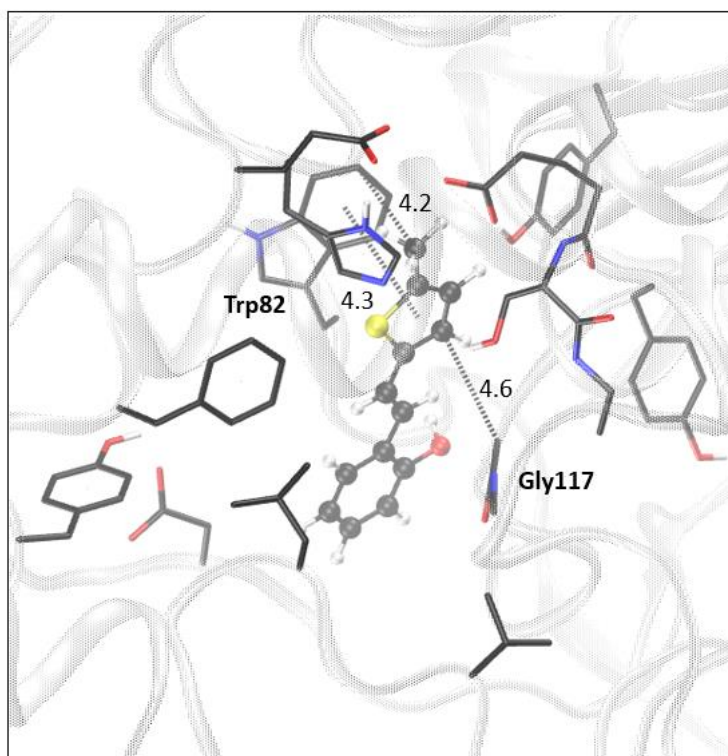
**Slika 23.** Prikaz struktura spojeva *trans-1*, *trans-2* i *trans-14* ispitivanih dockingom.

U strukturi kompleksa koji nastaje smještanjem molekule *trans-1* u aktivno mjesto enzima (Slika 24), vidljivo je nekoliko stabilizirajućih međudjelovanja. Uočava se formiranje vodikovih veza jednakih jakosti između kisika u furanu i vodika na serinu (2,0 Å) kao i između vodika na hidroksilnoj skupini fenilnog fragmenta na ligandu i kisika na Ser198 (2,0 Å). Ovaj sustav funkcionira na principu da kisik na furanu prima proton sa serina koji postaje negativno nabijen, no tada on uzima proton hidroksilnoj skupini fenilnog fragmenta na ligandu i neutralizira negativan naboj. Nadalje, prisutan je  $\pi$ - $\pi$  *stacking* (eng.  $\pi$ - $\pi$  slaganje) između triptofana (Trp82) i furana (5,9 Å) te između fenilnog fragmenta i Phe329 (5,3 Å). Naposljetku, javljaju se hidrofobne interakcije između fenilne jezgre liganda i glicina (Gly117) u oksianionskoj šupljini (3,6 Å).



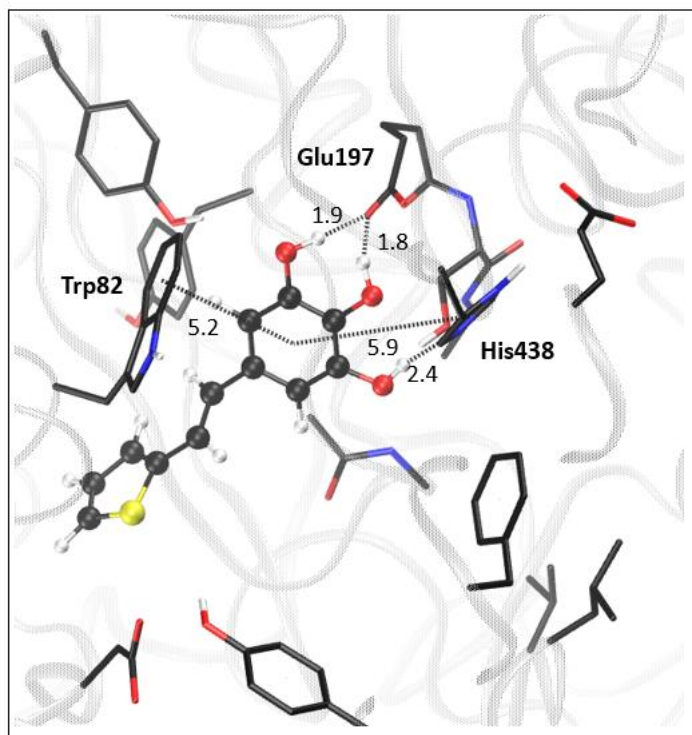
**Slika 24.** Reverzibilni kompleks između spoja *trans-1* i BChE, dobiven molekulskim dockingom. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.

U strukturi kompleksa koji nastaje smještanjem molekule *trans-2* u aktivno mjesto enzima (Slika 25), vidljivo je nekoliko stabilizirajućih međudjelovanja. Prisutan je  $\pi$ - $\pi$  *stacking* između triptofana (Trp82) i tiofenskog prstena na udaljenosti od 4,3 Å. Također, javljaju se hidrofobne interakcije između tiofenske jezgre i glicina (Gly116) na udaljenosti od 4,6 Å te između metilne skupine na tiofenskom prstenu i triptofana (Trp82) na udaljenosti od 4,3 Å. Bitno je napomenuti kako izostanak stvaranja vodikovih veza između hidroksilne skupine na fenilnoj jezgri liganda i određene pogodne aminokiseline u ovoj strukturi ne znači da hidroksilna skupina ne stvara vodikove veze. To se može objasniti pretpostavkom da je došlo do određenih interakcija s nekom od molekula vode koje su konstantno prisutne u aktivnom mjestu, ali u kristalnoj strukturi korištenoj za docking nisu prikazane.



**Slika 25.** Reverzibilni kompleks između spoja *trans-2* i BChE, dobiven molekulskim dockingom. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.

U strukturi kompleksa koji nastaje smještanjem molekule *trans*-**14** u aktivno mjesto enzima (Slika 26), vidljivo je nekoliko stabilizirajućih međudjelovanja. Uočava se formiranje vodikovih veza jednakih jakosti između vodika na prvoj hidroksilnoj skupini fenilnog fragmenta i kisika na Glu197 (1,9 Å) kao i između vodika na drugoj hidroksilnoj skupini fenilnog fragmenta na ligandu i kisika na Glu197 (1,8 Å). Nadalje, potencijalna treća slabija vodikova veza moguća je između vodika na trećoj hidroksilnoj skupini i dušika na  $\varepsilon$ -položaju imidazolnog prstena His438 (2,4 Å). Naposljetku, prisutan je  $\pi$ - $\pi$  *stacking* između fenilne jezgre i Trp82 na udaljenosti od 5,2 Å te između fenilne jezgre i His438 na udaljenosti od 5,9 Å.



**Slika 26.** Reverzibilni kompleks između spoja *trans*-**14** i BChE, dobiven molekulskim dockingom. Udaljenosti su izražene u Å, a nepolarni vodikovi atomi na aminokiselinama izostavljeni su radi preglednosti.

Molekulski docking omogućuje nam dobivanje mogućih položaja i orijentacija molekula liganada u aktivnom mjestu. To je statična slika koja ne nudi kvantitativni opis stabilnosti kompleksa, ali uspješno omogućava vizualizaciju mogućih smještanja liganada.

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. Opće napomene

U eksperimentima su korištena sljedeća otapala i kemikalije: aceton, acetonitril (ACN), borov tribromid ( $\text{BBr}_3$ ), dietil-eter (E), diklormetan (DCM), etanol (EtOH), etil-acetat (EtOAc), kalijev hidroksid (KOH), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), natrijev hidroksid (NaOH), natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), metanol (MeOH), petroleter (PE), tetraklormetan ( $\text{CCl}_4$ ) te toluen. Sva korištena otapala su pročišćena destilacijom i komercijalno su dostupna. Kod sinteze su korišteni reagensi poput azobisisobutironitrila (AIBN), dimetilsulfata ( $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ ), *N*-bromsukcinimida (NBS) i tionil-klorida ( $\text{SOCl}_2$ ). Za sintezu fosfonijevih soli korišten je trifenilfosfin ( $\text{PPh}_3$ ) kao kupovna kemikalija. U Wittigovim reakcijama korišten je natrij (Na) čuvan u PE koji je reakcijom s EtOH dao natrijev etoksid (NaOEt). Za sušenje organskog sloja nakon ekstrakcije korišten je bezvodni magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ). Za provođenje tankoslojne kromatografije (TLC) korištene su pločice prevučene silika-gelom (0.2 mm, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>). Kod provođenja kolonske kromatografije korištene su kolone punjene silika-gelom (60 Å, tehnički), a otapala su uparena pomoću rotacijskog uparivača pod sniženim tlakom.

$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektri NMR snimani su na spektrometru Bruker Avance koji radi na frekvenciji od 600 MHz za  $^1\text{H}$  jezgre i frekvenciji od 150 MHz za  $^{13}\text{C}$  jezgre, na Institutu Ruđer Bošković. Za otapanje spojeva korišteni su deuterirani kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) i deuterirani metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), a kao standard za snimanje NMR spektara korišten je tetrametilsilan (TMS). Kemijski pomaci izraženi su u ppm (eng. *parts per million*), a kod karakterizacije signala korištene su sljedeće oznake: s - singlet, d - dublet, dd - dublet-dubleta, t - triplet i m - multiplet. UV spektri su snimani na UV/Vis spektrofotometru, a kao otapalo za spojeve je korišten ACN. HRMS analize za potvrdu čistoće uzoraka provedene su u suradnji s tvrtkom PLIVA na masenom spektrometru (MALDI TOF/TOF analizator) opremljen Nd:YAG laserom koji radi na 355 nm s brzinom prilagođavanja od 200 Hz.

## 4.2. Sinteza furanskih i tiofenskih fosfonijevih soli

Sinteza brom(4-metoksibenzil)trifenil- $\lambda^5$ -fosfana, brom(furan-2-il-metil)trifenil- $\lambda^5$ -fosfana, brom(tiofen-2-il-metil)trifenil- $\lambda^5$ -fosfana i brom((5-metiltiofen-2-il)metil)trifenil- $\lambda^5$ -fosfana provedena je u okruglim tikvicama (0,5 dm<sup>3</sup>) pripremom odgovarajućih furanskih odnosno tiofenskih bromida koristeći AIBN i NBS reagense. Otopini 4-metoksitoluena, 2-metilfurana, 2-metiltiofena ili 2,5-dimetiltiofena (100,0 mmol) u CCl<sub>4</sub> (0,05 dm<sup>3</sup>) dodani su NBS (110,0 mmol) i AIBN (1,28 mmol). Reakcijska smjesa u tikvici je potom zagrijavana na temperaturu refluksa pomoću hladila s klor-kalcijskom cijevi na temperaturi vrelišta CCl<sub>4</sub> koristeći uljnu kupelj.

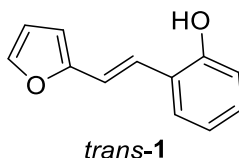
Nakon dva sata refluksa, nastali sukcinimid odfiltriran je u okruglu tikvicu (0,25 dm<sup>3</sup>), uparen je CCl<sub>4</sub>, te zaostaje svijetlo smeđe ulje bromida. Dobivenom bromidu u tikvici je dodan PPh<sub>3</sub> (100,0 mmol) prethodno otopljen u toluenu (0,08 dm<sup>3</sup>), te je smjesa miješana na sobnoj temperaturi 40 sati. Provedeno je vakuumfiltriranje pomoću Büchnerovog lijevka nakon čega je sol sušena u eksikatoru pod vakuumom šest sati i nakon toga tri dana ostavljena u eksikatoru. Suha sol je korištena dalje u sintezi željenih spojeva različitim sintetskim putevima.

### 4.3. Sinteza spojeva 1, 2, 6, 7, 9, 10, 13, 14

Spojevi 1, 2, 6, 7, 9, 10, 13, 14 su kao smjese *cis*- i *trans*-izomera sintetizirani Wittigovom reakcijom. Prije provođenja reakcije aparatura je propuhana dušikom 15 minuta. Reakcija je provedena u trogrloj tikvici (0,25 dm<sup>3</sup>) na čija dva sporedna grla su stavljeni klor-kalcijska cijev i balon s N<sub>2</sub>, spojen putem igle i septuma na grlo tikvice. Na srednje grlo tikvice pričvršćen je lijevak za dokapavanje u kojeg je dodano 50 cm<sup>3</sup> EtOH, te pola volumena ispušteno u tikvicu. U tikvicu je zatim dodana odgovarajuća fosfonijeva sol (2,2 - 4,7 mmol) i smjesa se počela miješati pomoću magnetne miješalice. U preostalih 25 cm<sup>3</sup> EtOH dodan je postupno kroz 20 minuta odvagani Na (1,1 ekv). Smjesa je ostavljena da se miješa dok sav Na nije izreagirao u NaOEt. Zatim je u reakcijsku smjesu uz dokapavanje NaOEt dodan aldehid (1 ekv), te je reakcijska smjesa ostavljena da se miješa određeno vrijeme (1, 2, 6, 7, 9, 13, 14 - 72 h, 10 - 168 h) na određenoj temperaturi (1, 6, 7, 9, 13, 14 - 25 °C, 2, 10 - 100 °C). Reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču pod sniženim tlakom, te otopljena u toluenu (1,2) ili CHCl<sub>3</sub> (6, 7, 9, 10, 13, 14). Smjesa je zatim ekstrahirana toluenom (1, 2) ili CHCl<sub>3</sub> (6, 7, 9, 10, 13, 14) (3x15 mL), ovisno o topivosti produkta. Organski sloj je odvojen u Erlenmayerovu tikvicu te sušen iznad MgSO<sub>4</sub> koji služi kao sredstvo za sušenje. Nakon 30 minuta sušenja, otapalo je upareno, a organski produkt kao smjesa izomera (s različitim udjelima *cis*-izomera) pročišćen na koloni punjenoj silika-gelom. Čisti *trans*-izomeri izolirani su također uzastopnom kolonskom kromatografijom ili tankoslojnom kromatografijom. Kao eluens korišteni su sustavi otapala PE/E i PE/EtOAc različitih polarnosti.

#### 2-(2-(furan-2-il)vinil)fenol (1)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-50 %).

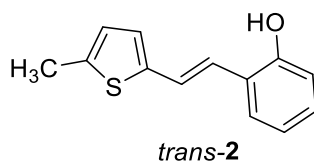


**(E)-2-(2-(furan-2-il)vinil)fenol (*trans*-1):** iskorištenje 28 %; žuti prah; T<sub>t</sub> = 78-82 °C; R<sub>f</sub> (PE/E(30 %)) = 0,43; UV (ACN) λ<sub>max</sub>/nm (ε<sup>dm<sup>3</sup></sup>mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) 334 (28358), 321 (26567), 307 (22128), 297 (sh, 19523); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ/ppm: 7,46 - 7,40 (m, 2H), 7,28 - 7,22 (m, 1H), 7,13 (t, 1H, J = 7,8 Hz), 6,99 - 6,91 (m, 2H), 6,79 (d, 1H, J = 7,9 Hz), 6,43 -

6,41 (m, 1H), 6,35 (d, 1H,  $J = 3,6$  Hz), 4,96 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 153,5 (s), 153,1 (s), 142,1 (s), 128,6 (s), 127,3 (s), 124,3 (s), 121,6 (s), 121,2 (s), 118,1 (s), 116,0 (s), 111,6 (s), 108,5 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 187 (100 % ,  $\text{M}^+$ ), 121 (15); HRMS ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  računato za  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$  186,0681 eksp. 186,0683.

## 2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (2)

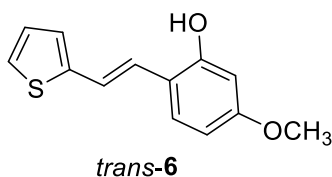
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-10 %).



**(E)-2-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-2*):** iskorištenje 40 %; žuti prah;  $T_t = 88-92$  °C;  $R_f(\text{PE/E}(20\%)) = 0,54$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 339 (26378), 240 (10925), 208 (19311);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,44 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz), 7,18 (d, 1H,  $J = 16,6$  Hz), 7,11 (t, 1H,  $J = 7,9$  Hz), 7,01 (d, 1H,  $J = 16,6$  Hz), 6,92 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz), 6,85 (d, 1H,  $J = 2,9$  Hz), 6,78 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz), 6,64 - 6,64 (m, 1H), 4,93 (s, 1H), 2,48 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 152,8, 141,2, 139,3, 128,3, 127,1, 126,3, 125,7, 124,5, 123,8, 121,4, 121,2, 115,9, 115,6; MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 217 (100 % ,  $\text{M}^+$ ); HRMS ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  računato za  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{OS}$  216,0609 eksp. 216,0607.

## 5-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (6)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-100 %).

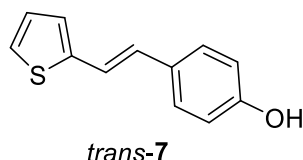


**(E)-5-metoksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-6*):** iskorištenje 40 %, žuti prah;  $T_t = 91-94$  °C;  $R_f(\text{PE/E}(60\%)) = 0,35$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 336 (23732), 244 (9367), 211 (15320);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,36 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz), 7,17-7,14 (m, 2H), 7,06 (d, 1H,  $J = 16,2$  Hz), 7,03 (d, 1H,  $J = 3,4$  Hz), 6,98 (dd, 1H,  $J = 4,9/3,7$  Hz), 6,51 (dd, 1H,  $J = 8,5/2,6$  Hz), 6,37 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz), 5,03 (s, 1H), 3,79 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 160,2 (s), 153,9 (s), 143,6 (s), 128,2 (s), 127,2 (s), 125,4 (s), 123,8 (s),

122,6 (s), 121,5 (s), 117,3 (s), 107,1 (s), 101,9 (s), 55,4 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 233 (100 %,  $M^+$ ); HRMS ( $m/z$ ) [ $M+H$ ] $^+$  računato za  $C_{13}H_{12}O_2S$  232,0558 eksp. 232,0556.

#### 4-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (7)

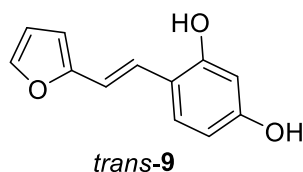
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/EtOAc (0-20 %).



**(E)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-7*):** iskorištenje 3 %; žuti prah;  $T_f = 123-124$  °C;  $R_f$  (PE/DCM(40 %)) = 0,17; UV (ACN)  $\lambda_{max}/nm$  ( $\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$ ) 333 (23297);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta/ppm$ : 7,35 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 7,15 (d, 1H,  $J = 5,6$  Hz), 7,09 (d, 1H,  $J = 16,2$  Hz), 7,02 (d, 1H,  $J = 3,4$  Hz), 6,99-6,98 (m, 1H), 6,87 (d, 1H,  $J = 16,2$  Hz), 6,81 (d, 2H,  $J = 8,5$  Hz), 4,93 (s, 1H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz)  $\delta/ppm$ : 155,8 (s), 143,2 (s), 129,9 (s), 127,9 (s), 127,7 (s), 127,5 (s), 125,4 (s), 123,8 (s), 119,8 (s), 115,6 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 203 (100 %,  $M^+$ ), 140 (70 %); HRMS ( $m/z$ ) [ $M+H$ ] $^+$  računato za  $C_{12}H_{10}OS$  202,0452 eksp. 202,0448.

#### 4-(2-(furan-2-il)vinil)benzen-1,3-diol (9)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-100 %). Dobiveno je 30 mg smjese (*trans-9* : aldehyd = 1 : 1). Smjesa se zatim stavila na 2 preparativne TLC ploče (15 mg na svaku ploču) pri čemu se dobilo ukupno 5 mg čistog *trans-9* izomera.



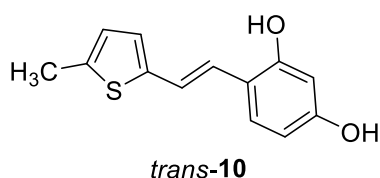
**(E)-4-(2-(furan-2-il)vinil)benzen-1,3-diol (*trans-9*):** iskorištenje 5 %; žuti prah;  $T_f = 143-146$  °C;  $R_f$  (PE/E(45 %)) = 0,46; UV (ACN)  $\lambda_{max}/nm$  ( $\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$ ) 346 (18170), 335 (18249), 309 (15573), 297 (14308), 285 (15800);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta/ppm$ : 7,41 (d,



1H,  $J = 1,9$  Hz), 7,27 (d, 1H,  $J = 9,0$  Hz), 7,19 (d, 1H,  $J = 16,5$  Hz), 6,86 (d, 1H,  $J = 16,5$  Hz), 6,42-6,40 (m, 1H), 6,31-6,29 (m, 2H), 6,26 (d, 1H,  $J = 3,3$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 153,7 (s), 145,8 (s), 141,8 (s), 128,5 (s), 128,4 (s), 121,2 (s), 116,3 (s), 111,5 (s), 109,2 (s), 108,5 (s), 107,7 (s), 103,2 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 203 (100 % , M<sup>+</sup>), 137 (35 %); HRMS ( $m/z$ ) [M+H]<sup>+</sup> računato za C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> 202,0630 eksp. 202,0629.

#### 4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)benzen-1,3-diol (10)

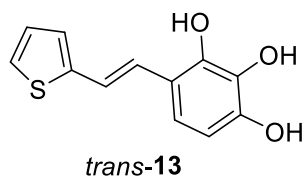
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-50 %). Dobiveno je 25 mg smjese (*trans*-10 : aldehyd = 1 : 5). Smjesa se zatim stavila na TLC preparativnu ploču pri čemu se dobilo 3 mg čistog *trans*-10 izomera.



(*E*)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)benzen-1,3-diol (*trans*-10): iskorištenje 12 %; žuti prah;  $T_f = 149-151$  °C;  $R_f(\text{PE/E}(30\%)) = 0,43$ ; UV (ACN)  $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 341 (15202);  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,28 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,05 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H), 6,91 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H), 6,80 (d,  $J = 3,5$  Hz, 1H), 6,63-6,62 (m, 1H), 6,41 (dd,  $J = 8,4, 2,3$  Hz, 1H), 6,33 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 4,77 (s, 1H), 2,47 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 155,9, 153,9, 141,5, 138,8, 128,2, 125,7, 125,6, 122,1, 121,1, 117,7, 108,5, 103,2, 15,6; MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 233 (100 % , M<sup>+</sup>).

#### 4-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzen-1,2,3-triol (13)

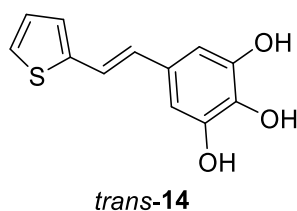
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala EtOAc/MeOH (50 %). Dobiveno je 300 mg spoja u smjesi s trifenilfosfin-oksikom. Za izoliranje čistog *trans*-13, trebat će dodatni eksperimenti pročišćavanja, obzirom na veliku sličnost u polarosti obje komponente u smjesi.



**(E)-4-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzen-1,2,3-triol (*trans*-13):** iskorištenje 50 %;  $R_f$ (EtOAc/MeOH (10 %)) = 0,56;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,81-7,74 (m, 2H), 7,68-7,62 (m, 2H), 7,18 (t, 1H,  $J = 3,2$  Hz), 7,14-7,11 (m, 1H), 6,86 (t, 1H,  $J = 4,2$  Hz), 5,81 (s, 1H), 5,77 (s, 1H); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 235 (100 % ,  $\text{M}^+$ ).

#### **5-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzen-1,2,3-triol (14)**

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala EtOAc/MeOH (50%). Dobiveno je 280 mg spoja u smjesi s trifenilfosfin-oksikom. Za izoliranje čistog *trans*-14, trebat će dodatni eksperimenti pročišćavanja, obzirom na veliku sličnost u polarosti obje komponente u smjesi.



**(E)-5-(2-(tiofen-2-il)vinil)benzen-1,2,3-triol (*trans*-14):** iskorištenje 60 %;  $R_f$ (EtOAc/MeOH = 10 %) = 0,56;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,80 - 7,74 (m, 2H), 7,65 - 7,61 (m, 2H), 7,18 (t, 1H,  $J = 3,5$  Hz), 7,14 - 7,11 (m, 1H), 6,85 (t, 1H,  $J = 4,6$  Hz), 5,81 (s, 1H), 5,76 (s, 1H); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 235 (100 % ,  $\text{M}^+$ ).

#### 4.4. Sinteza piran-4-onske soli

Sinteza 2-((klortrifetil- $\lambda^5$ -fosfanil)metil)-5-metoksi-4*H*-piran-4-ona provedena je u tri koraka. U prvom koraku priređen je piranonski klorid na sljedeći način: 5-hidroksi-2(hidroksimetil)-4*H*-piran-4-on (50,0 mmol) i DCM (0,82 mL) dodani su u trogrlu tikvicu (0,25 dm<sup>3</sup>) s klor-kalcijskom cijevi na jednom grlu, te je smjesa ohlađena na 0 °C pomoću ledene kupelji. Potom je preko igle kroz drugo grlo dokapan SOCl<sub>2</sub> (50,0 mmol, 1 ekv) i smjesa je miješana pet sati, nakon čega je upareno otapalo, a u tikvici je zaostao odgovarajući klorid.

U sljedećem koraku, pripremljenom žućkastom kloridu (48,8 mmol) u trogrloj tikvici (0,25 dm<sup>3</sup>) s klor-kalcijskom cijevi dodan je 10% KOH (0,0026 dm<sup>3</sup>), a preko igle dokapan (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,0045 dm<sup>3</sup>). Smjesa se miješala sat vremena u ledenoj kupelji, nakon čega je dodan još jedan obrok 10% KOH (0,03 dm<sup>3</sup>), a zatim je iglom dodano još (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,0045 dm<sup>3</sup>). Dobivena smjesa je ekstrahirana pomoću CHCl<sub>3</sub> (5 x 15cm<sup>3</sup>). Dobivena je tamnocrvena otopina kao organski sloj, osušena iznad MgSO<sub>4</sub>, te filtrirana i uparena na rotacijskom uparivaču nakon čega je zaostalo tamnocrveno ulje.

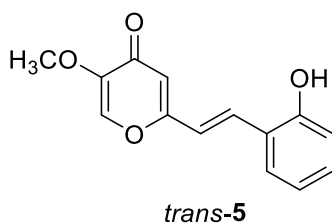
U zadnjem koraku u trogrlu tikvicu (0,25 dm<sup>3</sup>) dodan je nastali klorid (24,81 mmol), te u toluenu (0,04 dm<sup>3</sup>) otopljen PPh<sub>3</sub> (24,81 mmol, 1 ekv). Smjesa je zagrijana na temperaturu refluksa, te se u tim uvjetima reakcija provodila četiri dana, nakon čega je reakcijska smjesa filtrirana pod tlakom i potom sušena u eksikatoru 12 h.

## 4.5. Sinteza spojeva 5 i 12

Prije provođenja Wittigove reakcije aparatura je propuhana dušikom 15 minuta. Reakcija je provedena u trogloj tikvici (0,25 dm<sup>3</sup>) na čija dva sporedna grla su stavljene klor-kalcijska cijev i balon s N<sub>2</sub>, spojen preko šprice i septuma na grlo tikvice. Na srednje grlo tikvice pričvršćen je lijevak za dokapavanje u kojeg je dodano 0,05 dm<sup>3</sup> EtOH, te pola volumena ispušteno u tikvicu pa je dodana fosfonijeva sol (5,74 mmol, 1 ekv, 5,07 mmol, 1 ekv), a u preostalih 0,025 dm<sup>3</sup> je dodan Na (1,1 ekv). Smjesa se miješala dok sav Na nije izreagirao, a potom je uz polagano dokapavanje NaOEt dodan aldehid (5,74 mmol, 1 ekv, za spoj **5** odnosno 5,07 mmol, 1 ekv za spoj **12**). Reakcijska smjesa ostavljena je da se miješa određeno vrijeme (72 h) na sobnoj temperaturi. Potom je reakcijska smjesa uparena na rotacijskom uparivaču kako bi se uklonio etanol, te nakon uparavanja, zaostalo ulje otopljeno je i ekstrahirano toluenom (5 x 15cm<sup>3</sup>). Organski sloj se filtrirao preko naboranog filter papira i sušio iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, a potom se upario do suhog produkta. Iz dobivenih sirovih produkata uzastopnom kolonskom kromatografijom na silika-gelu izolirani su *trans*-izomeri spojeva **5** i **12**, koristeći PE/E i EtOAc/MeOH sustave otapala različitih polarnosti.

### 2-(2-hidroksistiril)-5-metoksi-4H-piran-4-on (**5**)

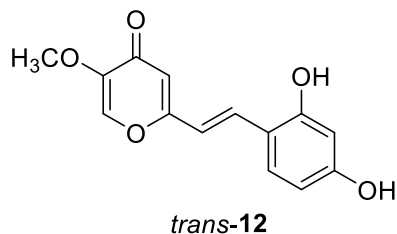
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-100 %) i EtOAc/MeOH (50 %).



**(E)-2-(2-hidroksistiril)-5-metoksi-4H-piran-4-on (*trans*-5):** iskorištenje 8 %, žućkasti prah; T<sub>f</sub> = 174-176 °C; R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0,18; UV (ACN) λ<sub>max</sub>/nm (ε/dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) 353 (17133), 276 (16184); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ/ppm: 7,97 (s, 1H), 7,75 (d, 1H, J = 16,5 Hz), 7,54 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,19 (t, 1H, J = 8,7 Hz), 7,03 (d, 1H, J = 16,5 Hz), 6,88 - 6,85 (m, 2H), 6,52 (s, 1H), 1,29 (s, 3H); MS m/z (% , fragment) (ESI): 245 (5 %, M<sup>+</sup>), 233 (100 %).

### 2-(2,4-dihidroksistiril)-5-metoksi-4H-piran-4-on (12)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-100 %), te čisti EtOAc i MeOH.



**(E)-2-(2,4-dihidroksistiril)-5-metoksi-4H-piran-4-on (*trans*-12):** iskorištenje 5 %; žuti prašak,  $R_f$  (EtOAc) = 0,08;  $T_i = 195-197$  °C; UV (ACN)  $\lambda_{max}/nm$  ( $\epsilon/dm^3mol^{-1}cm^{-1}$ ) 357 (10980);  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ , 600 MHz)  $\delta/ppm$ : 6,49 (s, 1H), 6,19 (d, 1H,  $J = 16,1$  Hz), 5,87 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz), 5,32 (d, 1H,  $J = 16,1$  Hz), 4,85 (s, 1H), 4,83 - 4,81(m, 2H), 2,28 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ , 150 MHz)  $\delta/ppm$ : 148,0, 138,4, 133,3, 131,7, 130,5, 129,4, 128,5, 114,5, 114,1, 112,2, 108,8, 107,6, 101,9, 29,4; MS  $m/z$  (% fragment) (ESI): 261 (100 %,  $M^+$ ), 166 (60 %); HRMS ( $m/z$ )  $[M+H]^+$  računato za  $C_{14}H_{12}O_5$  260,0685 eksp. 260,0684.

## 4.6. Sinteza spojeva **15** i **8**

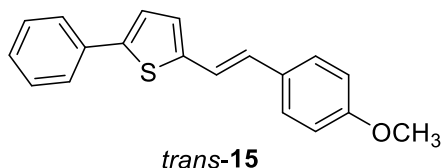
U okruglu tikvicu (0,5 dm<sup>3</sup>) dodan je 4-metoksitoluen (12,2 g), NBS (19,6 g) i AIBN (0,21 g), te je smjesa zagrijavana uz refluks na 100 °C. Nakon uspostavljanja refluksa uočena je promjena boje u bijelu, a nakon dva sata refluksa uočena je promjena boje otopine u narančastu, a nastali sukcinimid plivao je na površini otopine. Nastali sukcinimid odfiltriran je u tikvicu (0,25 dm<sup>3</sup>), te je filtrat uparen do suha. Dobiveno je crveno ulje, koje je otopljeno u toluenu (0,08 dm<sup>3</sup>) i dodan je PPh<sub>3</sub> (26,23 g). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 40 h. Sljedeći dan reakcijska smjesa je odfiltrirana preko Büchnerovog lijevka i dobivena fosfonijeva sol je sušena u eksikatoru 24 h.

Prije provođenja Wittigove reakcije aparatura je propuhana dušikom 15 minuta. Reakcija je provedena u trogrloj tikvici (0,25 dm<sup>3</sup>) na čija dva sporedna grla su stavljene klor-kalcijska cijev i balon s N<sub>2</sub>, spojen preko šprice i septuma na grlo tikvice. Na srednje grlo tikvice je pričvršćen lijevak za dokapavanje u kojeg je dodano 0,040 dm<sup>3</sup> EtOH, te pola volumena ispušteno u tikvicu. U tikvicu je zatim dodana priređena *p*-metoksi-fosfonijeva sol (0,97 mmol) i smjesa se počela miješati pomoću magnetne miješalice. U preostalih 0,02 dm<sup>3</sup> EtOH dodan je odvagani Na (1,1 ekv). Smjesa je ostavljena da se miješa dok sav Na nije izreagirao. Zatim je u reakcijsku smjesu uz dokapavanje NaOEt dodan i aldehid (1 ekv), te je reakcijska smjesa ostavljena da se miješa 72 h na sobnoj temperaturi. Smjesa je zatim ekstrahirana toluenom, te je organski sloj sušen iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub> koji služi kao sredstvo za sušenje. Nakon 30 minuta sušenja, otapalo je upareno, a organski produkt kao smjesa *cis*- i *trans*-izomera pročišćena je na koloni punjenoj silika-gelom. Kao eluens korišten je sustav otapala PE/E promjenjive polarnosti. Naknadnom kolonskom kromatografijom uz isti sustav otapala, izoliran je čisti *trans*-izomer spoja **15** u zadnjim frakcijama.

Izolirani *trans*-**15** (0,05 g) je dodan u tikvicu (0,25 dm<sup>3</sup>) s DCM (0,045 dm<sup>3</sup>). Tikvica je uronjena u kupelj s acetonom i suhim ledom kada je postignuta temperatura temperatura suhog leda od -78 °C. Staklenom špricom dodana je 1 M otopina BBr<sub>3</sub> u DCM (0,004 dm<sup>3</sup>) kroz jedan sat. Nakon što je sav reagens dodan, tikvica je polako izdignuta iz kupelji, te ostavljena da se miješa 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h miješanja, tikvica je prenesena u ledenu kupelj i neutralizirana s 1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH. Reakcijska smjesa je zatim ekstrahirana uz EtOAc, te je organski sloj sušen iznad MgSO<sub>4</sub>. Nakon 30 minuta sušenja, otapalo je upareno, a organski produkt pročišćen na koloni punjenoj silika-gelom pri čemu je dobiven čisti *trans*-**8**. Kao eluens korišten je sustav otapala PE/E promjenjive polarnosti.

## 2-(4-metoksi-stiril)-5-feniltiofen (15)

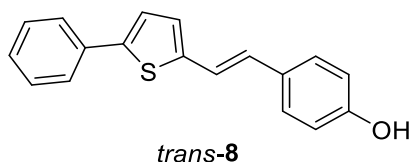
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-25 %).



**(E)-2-(4-metoksi-stiril)-5-feniltiofen (*trans-15*):** iskorištenje 28 %; žuti prah;  $T_t = 125-127$  °C;  $R_f$  (PE/E(50 %)) = 0,78; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 368 (37536), 266 (8433), 226 (13302);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,61 (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz), 7,41 (d, 2H,  $J = 8,9$  Hz), 7,38 (t, 2H,  $J = 7,7$  Hz), 7,27 (t, 1H,  $J = 7,7$  Hz), 7,21 (d, 1H,  $J = 3,8$  Hz), 7,07 (d, 1H,  $J = 16,6$  Hz), 6,98 (d, 1H,  $J = 3,9$  Hz), 6,90 - 6,88 (m, 3H), 3,83 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 159,3 (s), 142,7 (s), 142,4 (s), 134,3 (s), 129,8 (s), 128,9 (s), 127,9 (s), 127,6 (s), 127,4 (s), 126,6 (s), 125,6 (s), 123,5 (s), 119,9 (s), 114,2 (s), 55,3 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 293 (100 % ,  $\text{M}^+$ ).

## 4-(2-(5-feniltiofen-2-il)vinil)fenol (8)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E i PE/DCM (0-100 %).



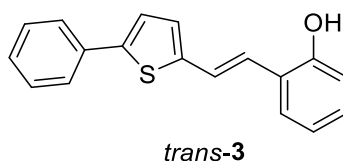
**(E)-4-(2-(5-feniltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-8*):** iskorištenje 21 %; žuti prah;  $T_t = 85-90$  °C;  $R_f$  (PE/E = 70 %) = 0,22; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 298 (83083);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,54 (d, 2H,  $J = 7,7$  Hz), 7,50 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 7,34 - 7,29 (m, 3H), 7,11 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 6,80 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz), 6,78 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 6,68 (d, 1H,  $J = 3,1$  Hz), 4,81 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 147,8 (s), 146,9 (s), 146,4 (s), 143,8 (s), 142,5 (s), 130,4 (s), 129,4 (s), 128,7 (s), 127,1 (s), 125,5 (s), 125,2 (s), 122,6 (s), 115,4 (s), 115,3 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 279 (100 % ,  $\text{M}^+$ ).

## 4.7. Sinteza spojeva 3, 4 i 11

Spojevi 3, 4 i 11 sintetizirani su McMurryjevom reakcijom. Prije provođenja reakcije aparatura je propuhana argonom 15 minuta. Reakcija je provedena u trogloj tikvici (0,25 dm<sup>3</sup>) na magnetskoj miješalici. Praškasti cink (6,65 mmol) i THF (0,04 dm<sup>3</sup>) dodani su u tikvicu. Reakcijska smjesa je ohlađena do -5 °C te je kap po kap dodan TiCl<sub>4</sub> (0,003 dm<sup>3</sup>) preko šprice uz održavanje temperature ispod 0 °C. Nakon toga reakcijska smjesa je zagrijana na sobnu temperaturu i miješana 30 minuta. Nakon 30 minuta, reakcijska smjesa je zagrijana do temperature refluksa, te je tako ostavljena 3 sata. Kada je refluks prekinut, reakcijskoj smjesi nakon hlađenja (- 5 °C) dodana je smjesa aldehida (1,33 mmol, 1,2 ekv, u omjeru 1:1,2) u THF, kap po kap preko igle. Kada su dodani aldehidi, reakcijska smjesa je ponovno zagrijana do temperature refluksa i tako ostavljena dva sata, nakon čega je ohlađena do sobne temperature i ostavljena preko noći uz miješanje na magnetskoj miješalici. Reakcijska smjesa je potom neutralizirana vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>. Neutralizirana reakcijska smjesa ekstrahirana je pomoću EtOAc (3 x 25cm<sup>3</sup>), a potom je organski sloj sušen iznad MgSO<sub>4</sub>. Nakon 30 minuta sušenja, otapalo je upareno, a organski produkt pročišćen na koloni punjenoj silika-gelom. Kao eluensi korišteni su sustavi otapala PE/E i PE/DCM različitih polarnosti.

### 2-(2-(5-feniltiofen-2-il)vinil)fenol (3)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-20 %).

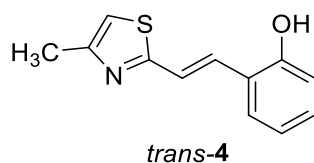


**(E)-2-(2-(5-feniltiofen-2-il)vinil)fenol (*trans-3*):** iskorištenje 5 %; žuti prah;  $T_f = 113-115$  °C;  $R_f$  (PE/DCM(30 %)) = 0,78; UV (ACN)  $\lambda_{max}/nm$  ( $\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ ) 353 (6553), 234 (2149); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta/ppm$ : 7,64 (d, 2H,  $J = 8,3$  Hz), 7,55 (d, 1H,  $J = 7,7$  Hz), 7,49 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz), 7,46 (d, 1H,  $J = 3,9$  Hz), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz), 7,32 - 7,30 (m, 2H), 7,28 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz), 7,23 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz), 6,98 (s, 1H), 6,88 (d, 1H,  $J = 1,1$  Hz); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta/ppm$ : 154,6 (s), 151,1 (s), 144,7 (s), 135,8 (s), 133,9 (s), 129,1 (s), 129,0 (s), 127,9 (s), 125,8 (s), 125,5 (s), 124,4 (s), 123,9 (s), 123,2 (s), 120,8 (s), 111,0 (s), 101,2 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 279 (100 %, M<sup>+</sup>).



#### 2-(2-(2-metiltiazol-5-il)vinil)fenol (**4**)

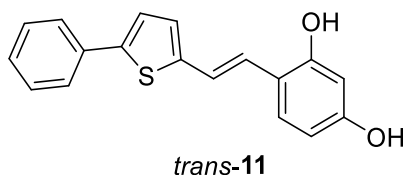
Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-80 %).



**(E)-2-(2-(2-metiltiazol-5-il)vinil)fenol (*trans-4*):** iskorištenje 5 %; žuto ulje;  $R_f$ (PE/E(80 %)) = 0,50; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 345 (sh, 6109), 332 (21971), 315 (sh, 20036), 300 (sh, 19398), 285 (23628);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,69 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H), 7,47 (d,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 7,16-7,09 (m, 2H), 7,01 (s, 1H), 6,90 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H), 6,79 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 6,25 (s, 1H), 2,76 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 116,3, 154,2, 153,8, 128,8, 127,5, 126,0, 124,3, 122,5, 120,8, 116,1, 114,6, 19,3; MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 218 (100 % ,  $\text{M}^+$ ).

#### 4-(2-(5-feniltiofen-2-il)vinil)benzen-1,3-diol (**11**)

Kolonska kromatografija je provedena na silika-gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (0-100 %). Dobivena je frakcija od 25 mg iz kolonske kromatografije s većinskim udjelom produkta *trans-11*, koja je zatim stavljena na preaprativnu TLC ploču te je dobiveno 2 mg čistog *trans-11* izomera.



**(E)-4-(2-(5-feniltiofen-2-il)vinil)benzen-1,3-diol (*trans-11*):** iskorištenje 10 %; žuti prah;  $T_f = 128-130$  °C;  $R_f$ (PE/DCM = 30 %) = 0,69; UV (ACN)  $\lambda_{\max}/\text{nm}$  ( $\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ):  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,54 (d, 2H,  $J = 7,1$  Hz), 7,35 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz), 7,26 - 7,21 (m, 3H), 7,10 (d, 1H,  $J = 3,9$  Hz), 6,98 (s, 2H), 6,73 - 6,71 (m, 1H), 5,00 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 151,5 (s), 141,9 (s), 139,5 (s), 135,8 (s), 134,7 (s), 130,0 (s), 128,8 (s), 128,3 (s), 126,9 (s), 126,2 (s), 125,6 (s), 125,5 (s), 125,5 (s), 125,4 (s), 125,4 (s), 122,9 (s); MS  $m/z$  (% , fragment) (ESI): 295 (100 % ,  $\text{M}^+$ ).

## 5. ZAKLJUČAK

U svrhu pronalaženja novih rezveratrolnih derivata s potencijalnom terapijskom primjenom, sintetizirani su derivati *trans-1-14*. Rezveratrolni derivati *trans-1-14* sintetizirani su Wittigovom reakcijom, McMurryjevom reakcijom ili reakcijom uz BBr<sub>3</sub> kao reagens preko prekursora s metoksi-skupinom, pri čemu su nastale smjese *cis-* i *trans-*izomera. Izolirani su ciljano *trans-*izomeri, te je fokus u radu usmjeren na njih zbog veće stabilnosti i boljih bioloških svojstava *trans-*rezveratrola u odnosu na *cis-*rezveratrol. Dobiveni spojevi spektroskopski su okarakterizirani pomoću NMR tehnika, UV-Vis spektroskopije te spektrometrije masa visoke rezolucije, čime je potvrđena njihova struktura i čistoća.

Sintetizirani rezveratrolni derivati *trans-1-14* podvrgnuti su biološkim testiranjima u svrhu ispitivanja potencijalne inhibicije enzima butirilkolinesteraze te antioksidacijske i protuupalne aktivnosti. Derivati *trans-1*, *trans-2*, *trans-4*, *trans-6*, *trans-13* i *trans-14* pokazali su zadovoljavajuće vrijednosti inhibicije BChE. Kod ispitivanja antioksidacijske aktivnosti najbolje rezultate je postigao derivat *trans-1* koji bilježi čak oko 150 puta manju potrebnu koncentraciju u odnosu na standard *trans-*rezveratrol. Također, zadovoljavajuću vrijednost prilikom ispitivanja antioksidacijske aktivnosti postigli su i derivati *trans-2* i *trans-6*. Jedini spoj koji pokazuje potencijalnu protuupalnu aktivnost (uz inhibicijsku), odnosno jedini koji inhibira proizvodnju TNF- $\alpha$  je *trans-4*, koji sadrži tiazolni prsten. Dakle, jedino *trans-4* derivat možemo povezati sa zajedničkim mehanizmom kolinergičkog i imunološkog sustava. Derivati *trans-1*, *trans-2* i *trans-6* postigli su veoma dobre rezultate u ispitivanjima potencijalne antioksidativne, ali istovremeno i inhibicijske aktivnosti prema BChE. Stoga, imaju velik potencijal za daljnje istraživanje i razvoj.

Naposljetku, provedeno je računalno ispitivanje konformacijskog prostora i termodinamičke stabilnosti derivata **1-14** te je proveden izračun UV-Vis spektara. Na temelju dobivenih podataka vidljivo je da postoje određena odstupanja između vrijednosti dobivenih eksperimentalno i računski, ali ona su zadovoljavajuća s obzirom na to da prate jednak trend odnosno računalno dobivene valne duljine prijelaza su sustavno pomaknute prema većim vrijednostima. Nadalje, određeni su elektronski prijelazi određenih apsorpcijskih vrpca te su im pripisane orbitale između kojih dolazi do prijelaza. Budući da su neki od pripremljenih rezveratrolnih derivata pokazali sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze, napravljena je studija molekuskog dockinga kojom su utvrđene strukture nekovalentnih kompleksa između liganda i enzima. Uvid u dobivene strukture omogućio je identificiranje

elektrostatskih međudjelovanja koja doprinose stabilnosti kompleksa i time povećavaju inhibični potencijal testiranih spojeva.

Derivati **1**, **2**, **6**, **8**, **13** i **14** sintetizirani su uz dobra iskorištenja, dok ostali derivati pokazuju nešto slabija iskorištenja. Treba naglasiti da u ovom radu cilj nije bio postići maksimalno moguće iskorištenje svake reakcije, već prvenstveno ciljano dobivanje *trans*-rezveratrolnih analoga. Stoga se nije išlo u optimizaciju reakcija i pronalaženje idealnih uvjeta za postizanje što višeg iskorištenja, no određeni derivati sa slabijim iskorištenjima (*trans*-**4**) su pokazali potencijalno dobru biološku aktivnost te je svakako isplativo daljnje istraživanje i razvoj procesa u smislu optimizacije sinteze, pogotovo za potencijalni *scale-up*.

Računalno modeliranje osim za pobliži opis elektronske strukture i termodinamičke stabilnosti konformera, poslužilo je za simulaciju mogućeg inhibičijskog djelovanja sintetiziranih spojeva. Određeni spojevi su pokazali obećavajuće rezultate u inhibiciji butirilkolinesteraze, te je stoga napravljen molekularni docking odnosno računalna simulacija pristajanja spojeva *trans*-**1**, *trans*-**2** i *trans*-**14** u aktivno mjesto enzima BChE.

## 6. LITERATURA

- [1] S. A. Thimmappa, Resveratrol-a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res. Rev.* 52 (2006) 316-326.
- [2] U. Stervbo, O. Vang, C. Bonnesen, A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.* 101 (2007) 449-457.
- [3] V. Fornara, E. Onelli, F. Sparvoli, M. Rossoni, R. Aina, G. Marino, S. Citterio, Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 233 (2008) 83-93.
- [4] J. C. E. Sousa, A. C. F. Santana, G. J. P. Magalhães, Resveratrol in Alzheimer's disease: a review of pathophysiology and therapeutic potential. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 78 (2020) 501-511.
- [5] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Réme'sy, L. Jimenez, Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 727-747.
- [6] S. J. Dentali, C. Amarillas, T. Blythe, P. N. Brown, A. Bzhelyansky, C. Fields, H. E. Johnson, S. Krepich, A. Kuszak, C. Metcalfe, M. Monagas, E. Mudge, S. Parisi, K. Reif, C. A. Rimmer, M. Sasser, A. M. Solyom, J. Stewart, J. Szpylka, M. C. Tims, R. Van Breemen, H. You, H. Zhao, G. Zielinski, S. G. Coates, Determination of kavalactones and/or flavokavains from kava (*Piper methysticum*). *J. AOAC Int.* 101 (2018) 1256-1260.
- [7] R. E. Aluko, Functional foods and nutraceuticals. Food science text series, New York, NY: Springer Publishers (2012).
- [8] C. Di Lorenzo, F. Colombo, S. Biella, C. Stockley, P. Restani, Polyphenols and human health: the role of bioavailability. *Nutrients* 13 (2021) 273.
- [9] X. Han, T. Shen, H. Lou, Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8 (2007) 950-988.
- [10] E. Giacomini, S. Rupiani, L. Guidotti, M. Recanatini, M. Roberti, The use of stilbene scaffold in medicinal chemistry and multi-target drug design. *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 2439-2489.
- [11] V. Neveu, J. Perez-Jimenez, et al., Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database: the Journal of Biological Databases and Curation* (2010).
- [12] C. Gomez Silva, J. Monteiro, R. R. N. Marques, A. M. T. Silva, C. Martínez, L. Canle, J. L. Faria, Photochemical and photocatalytic degradation of *trans*-resveratrol. *Photochemical and Photobiological Sciences* 12 (2013) 638-644.

- [13] F. S. Richardson, J. P. Riehl, Circularly polarized luminescence spectroscopy. *Chem. Rev.* 77 (1977) 773-792.
- [14] A. Galano, R. Álvarez-Diduk, M. T. Ramírez-Silva, G. Alarcón-Ángeles, A. Rojas-Hernández, Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chemical Physics* 363 (2009) 13-23.
- [15] M. A. Soobrattee, V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, T. Bahorun, Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat. Res.* 579 (2005) 200-213.
- [16] J. H. Jang, Y. J. Surh, Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1100-1110.
- [17] J. Park, J.S. Min, B. Kim, U.B. Chae, J.W. Yun, M.S. Choi, I.K. Kong, K.T. Chang, and D.S. Lee, Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Neurosci. Lett.* 584 (2015) 191-196.
- [18] R. Núñez Miguel, J. Wong, J.F. Westoll, H.J. Brooks, L.A. O'Neill, N.J. Gay, C.E. Bryant, and T.P. Monie, A dimer of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One* 2 (2007) 788.
- [19] F. Ueda, K. Iizuka, K. Tago, Y. Narukawa, F. Kiuchi, T. Kasahara, H. Tamura, and M. Funakoshi-Tago, Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* 28 (2015) 967.
- [20] U. Feroze, K. Kalantar-Zadeh, K.A. Sterling, M.Z. Molnar, N. Noori, D. Benner, V. Shah, R. Dwivedi, K. Becker, C.P. Kovesdy, and D.S. Raj, Examining associations of circulating endotoxin with nutritional status, inflammation and mortality in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.* 22 (2012) 317.
- [21] H. Szaefer, M. Cichocki, V. Krajka-Kuz'niak, T. Stefan' ski, S. Sobiak, B. Licznerska, W. Baer-Dubowska, The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways in HaCaT keratinocytes. *Pharmacological Reports* 66 (2014) 732-740.
- [22] H. J. Zhang, Z. Zhao, Antioxidant and anti-inflammatory effects of polyphenols extracted from *Ilex latifolia* Thunb. *RSC Advances* 8 (2018) 7134-7141.
- [23] S. Sánchez-Fidalgo, A. Cárdeno, I. Villegas, E. Talero, and C.A. de la Lastra, Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 78 (2010) 633.

- [24] L.G. Wood, P.A. Wark, and M.L. Garg, Antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol in airway disease. *Antioxid. Redox Signal* 13 (2010) 1535.
- [25] S. He, and X. Yan, From resveratrol to its derivatives: new sources of natural antioxidant. *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 1005.
- [26] M. Gobec, T. Tomašič, T. Markovič, I. Mlinarič-Raščan, M.S. Dolenc, and Z. Jakopin, Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1,2,4-oxadiazole analogs of resveratrol. *Chem. Biol. Interact.* 240 (2015) 200.
- [27] Y. T. Chin, G. Y. Cheng, Y. J. Shih, C. Y. Lin, S. J. Lin, H. Y. Lai, J. Whang-Peng, H. C. Chiu, S. Y. Lee, E. Fu, H. Y. Tang, H. Y. Lin, L. F. Liu, Therapeutic applications of resveratrol and its derivatives on periodontitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1403 (2017) 101-108.
- [28] E. Dolgin, Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs. *Nat. Med.* 19 (2013) 1194.
- [29] G. Cassel, L. Karlsson, L. Waara, K. W. Ang, A. Göransson-nyberg, Pharmacokinetics and effects of HI-6 in blood and brain of soman-intoxicated rats: A microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* 332 (1997) 43-52.
- [30] M. Mlakić, T. Čadež, D. Barić, I. Puček, A. Ratković, Ž. Marinić, K. Lasić, Z. Kovarik, I. Škorić, New uncharged 2-thienostilbene oximes as reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases. *Pharmaceuticals* 14 (2021) 1147.
- [31] P.O. Freskgård and E. Urich, Antibody therapies in CNS diseases. *Neuropharm.* 120 (2017) 38-55.
- [32] P. Marambaud, H. Zhao, & P. Davies,. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2005) 37377-37382.
- [33] V. Vingtdeux, U. Dreses-Werringloer, H. Zhao, P. Davies, & P. Marambaud, Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC euroscience* 9 (2008) 6.
- [34] K. W. Lange, & S. Li, Resveratrol, pterostilbene, and dementia. *BioFactors* 44 (2018) 83-90.
- [35] N. Braidy, B. E. Jugder, A. Poljak, T. Jayasena, H. Mansour, S. M. Nabavi, P. Sachdev, R. Grant, Resveratrol as a potential therapeutic candidate for the treatment and management of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 16 (2016) 1951 - 1960.
- [36] S. Bastianetto, C. Ménard & R. Quirion Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852 (2015) 1195-1201.

- [37] G. M. Pasinetti, J. Wang, L. Ho, W. Zhao, L. Dubner, Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochim. Biophys. Acta.* (2015) 1852.
- [38] S. S. Kulkarni, C. Cantó, The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852 (2015) 1114-1123.
- [39] A. Sharma, B. Shahzad, A. Rehman, R. Bhardwaj, M. Landi, B. Zheng, Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24 (2019) 2452.
- [40] T. Shen, X. N. Wang, H. X. Lou, Natural stilbenes: an overview. *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 916-935.
- [41] I. Raskin, D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk et al. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 522-531.
- [42] J.H. Hart, Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19 (1981) 437-458.
- [43] E. Khaskin, D. Milstein, Catalytic, oxidant-free, direct olefination of alcohols using Wittig reagents. *Chemical Communications* 43 (2015) 9002-9005.
- [44] J. Yan, Yueyan Guo, Yali Wang, F. Mao, L. Huang, Xingshu Li, Design, synthesis, and biological evaluation of benzoselenazole-stilbene hybrids as multi-target-directed anti-cancer agents. *Eur J Med Chem.* 95 (2015) 220-229.
- [45] B. I. Roman, L. M. De Coen, S. T. F. C. Mortier, T. De Ryck, B. W. A. Vanhoecke, A. R. Katritzky, M. E. Bracke, C. V. Stevens, Design, synthesis and structure-activity relationships of some novel, highly potent anti-invasive (*E*)- and (*Z*)-stilbenes. *Mol Cell Biochem* 402 (2013) 54-63.
- [46] B.C. Das, X. Zhao, X-Y. Tang, F. Yang, Design, synthesis and biological study of pinacolyl boronate-substituted stilbenes as novel lipogenic inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 21 (2011) 5638-5641.
- [48] J. E. McMurry, T. Letcka and J. G. Rico, An optimized procedure for titanium-induced carbonyl coupling. *J. Org. Chem.* 54 (1989) 3748.
- [49] J. E. McMurry, Carbonyl-coupling reactions using low-valent titanium. *Chem. Rev.* 89 (1989) 1513-1524.
- [50] H. R. Diéguez, A. López, V. Domingo, J. F. Arteaga, J. A. Dobado, M. M. Herrador, J. F. Q. d. Moral, A.F. Barrero, Weakening C-O bonds: Ti(III), a new reagent for alcohol deoxygenation and carbonyl coupling olefination. *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 254-259.

- [51] A. Fürstner, A. Ernst, H. Krause, A. Ptock, Low-valent titanium induced indole formation: syntheses of secofascaplysin, indolopyridocoline and an endothelin-receptor-antagonist. *Tetrahedron* 52 (1996) 7329-7344.
- [52] F. Jensen, Introduction to computational chemistry. Second edition, Chichester (2007) 16-20.
- [53] D. C. Young, Introduction In Computational Chemistry. John Wiley and Sons (2001).
- [54] J. B. Foresman, A. Frisch, I. Gaussian, Exploring chemistry with electronic structure methods. Second edition, Gaussian (1996).
- [55] D. Šakić, Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka. Disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (2015).
- [56] I. Nikšić-Franjić, Računalno istraživanje reakcija slobodnih radikala s halogeniranim organskim spojevima u vodenim otopinama. Doktorski rad, Zagreb (2020).
- [57] S. M. Bachrach, Computational organic chemistry. Wiley-Interscience: Hoboken, New Jersey (2007) 496.
- [58] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2008) 215-241.
- [59] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc. Wallingford CT (2016).
- [60] P. Kirkpatrick, Virtual screening: gliding to success. *Nat. Rev. Drug Disc.* 3 (2004) 299.
- [61] J. A. T. Ewing, I. D. Kuntz, Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 1175.
- [62] P. Kolb, R. S. Ferreira, J. J. Irwin, B. K. Shoichet. Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets. *Curr. Opin. Biotech.* 20 (2009) 429-436.



- [63] A. N. Jain, Scoring functions for protein ligand docking. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7 (2006) 407-420.
- [64] R. T. Kroemer, Structure-based drug design: docking and scoring. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8 (2007) 312-328.
- [65] S. J. Teague, Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2 (2003) 527-541.
- [66] G. P. A. Vigers, J. P. Rizzi, Multiple active site corrections for docking and virtual screening. *J. Med. Chem.* 47 (2004) 80-89.
- [67] M. Mlakić, L. Fodor, I. Odak, O. Horváth, M. J. Lovrić, D. Barić, V. Milašinović, K. Molčanov, Ž. Marinić, Z. Lasić, I. Škorić, Resveratrol-maltol and resveratrol-thiophene hybrids as cholinesterase inhibitors and antioxidants: synthesis, biometal chelating capability and crystal structure. *Molecules* 27 (2022) 6379.
- [68] P. Taylor, Z. Radić, The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 33 (1994) 281-320.
- [69] M. M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E. G. Duysen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110 (2002) 627-639.
- [70] S. Darvesh, R. Walsh, R. Kumar, A. Caines, S. Roberts, D. Magee, K. Rockwood, E. Martin, Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 17 (2003) 117-126.
- [71] S. Hu, Y. Wang, H. Li, The Regulation Effect of  $\alpha 7$ nAChRs and M1AChRs on Inflammation and Immunity in Sepsis. *Mediat. Inflamm.* 9059601 (2021) 1-10.
- [72] M. Pohanka, Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase MeetImmunity. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 9809-9825.
- [73] M. Citron, Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 387-398.

## SAŽETAK

### *Novi rezveratrolni derivati kao potencijalno biološki aktivne strukture - dizajn, sinteza i računalno modeliranje*

Novi derivati *trans*-rezveratrola, spojevi *trans*-**1-14** sintetizirani su s ciljem proučavanja njihove potencijalne biološke aktivnosti s naglaskom na inhibicijsku prema enzimu butirilkolinesterazi (BChE), antioksidativnu te protuupalnu aktivnost koje su ispitane. Novi analozi *trans*-rezveratrola sintetizirani su Wittigovom i McMurryjevom reakcijom, te u slučaju spoja *trans*-**8** uz pomoć BBr<sub>3</sub> reagensa, u umjerenim-dobrim iskorištenjima. U sva tri sintetska puta nastale su smjese *cis*- i *trans*-izomera, iz kojih su kromatografski izolirani *trans*-izomeri. Spektroskopska karakterizacija svih novih dobivenih spojeva provedena je pomoću 1D NMR tehnika, UV-Vis spektroskopijom i HRMS analizom. Biološka ispitivanja su pokazala veliki antioksidativni potencijal spojeva *trans*-**1**, *trans*-**2** i *trans*-**6** s nižom IC<sub>50</sub> vrijednošću u odnosu na standard. Uočeno je da potencijal za protuupalno djelovanje ima isključivo tiazolni analog *trans*-**4**. Što se tiče inhibicije BChE, spojevi *trans*-**1**, *trans*-**2**, *trans*-**6**, *trans*-**13** i *trans*-**14** dali su vrlo dobre rezultate, s nižim IC<sub>50</sub> vrijednostima u odnosu na standard, na temelju čega je provedena računalna simulacija molekuskog dockinga sintetiziranih potencijalnih inhibitora u aktivno mjesto enzima. Računalnim modeliranjem istražena je elektronska struktura i termodinamička stabilnost dobivenih *trans*-rezveratrolnih derivata. Također, ispitano je i njihovo kompleksiranje s biometalima.

**Ključne riječi:** biološka aktivnost, McMurryjeva reakcija, računalno modeliranje, sinteza, spektroskopska karakterizacija, *trans*-rezveratrolni derivati, Wittigova reakcija

## SUMMARY

### *New resveratrol derivatives as potential biologically active structures - design, synthesis and computational modeling*

New derivatives of *trans*-resveratrol, compounds *trans*-**1-14** were synthesized with the purpose of studying their potential biological activity with the emphasis on the inhibition of enzyme butyrylcholinesterase (BChE), antioxidative and anti-inflammatory activity which were all examined. New *trans*-resveratrol analogues were all synthesized through Wittig or McMurry reaction and in case of *trans*-**8** using BBr<sub>3</sub> reagent in moderate-to-good yields. In all three synthetic pathways mixtures of *cis*- and *trans*-isomers were obtained, which were then separated by chromatography and *trans*-isomers were isolated. Spectroscopic characterisation of all newly acquired compounds was done by using 1D NMR techniques, UV-Vis spectroscopy and HRMS analysis. Biological tests which were performed have shown great antioxidative potential of compounds *trans*-**1**, *trans*-**2** i *trans*-**6** as they have exhibited lower IC<sub>50</sub> values compared to the standard. An observation stating that only the thiazole analogue *trans*-**4** has anti-inflammatory potential was made. Regarding the BChE inhibition, compounds *trans*-**1**, *trans*-**2**, *trans*-**6**, *trans*-**13** and *trans*-**14** have given very good results, as they have exhibited lower IC<sub>50</sub> values compared to the standard, which was the basis for doing a computer simulated molecular docking of the synthesized potential inhibitors of enzyme's active site. Computational modeling allowed further exploration of electronic structure as well as thermodynamic stability of obtained *trans*-resveratrol derivatives. In addition, their potential ability to form coordinative complexes with biometals was explored.

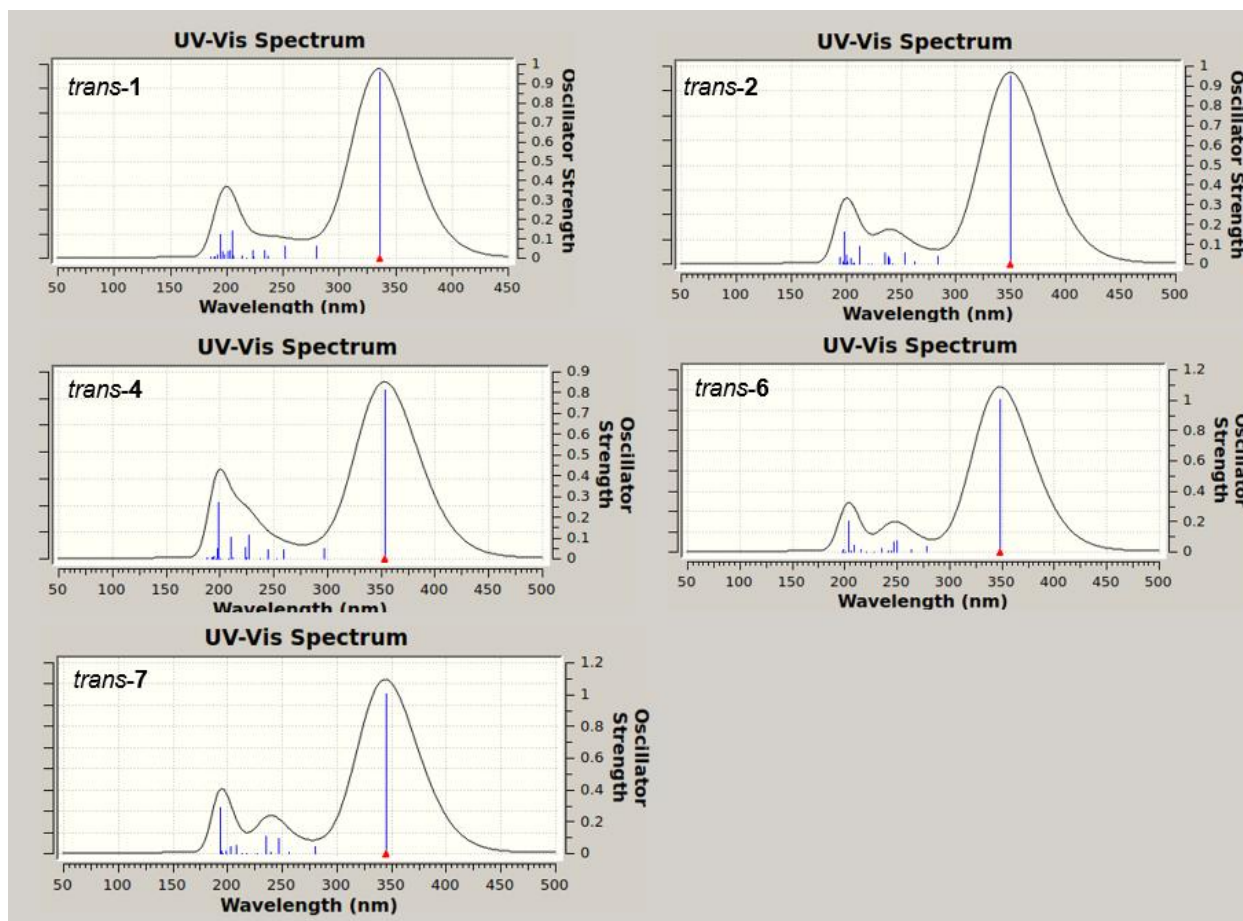
**Keywords:** biological activity, computational modeling, McMurry reaction, *trans*-resveratrol derivatives, spectroscopic characterisation, synthesis, Wittig reaction

## ŽIVOTOPISI

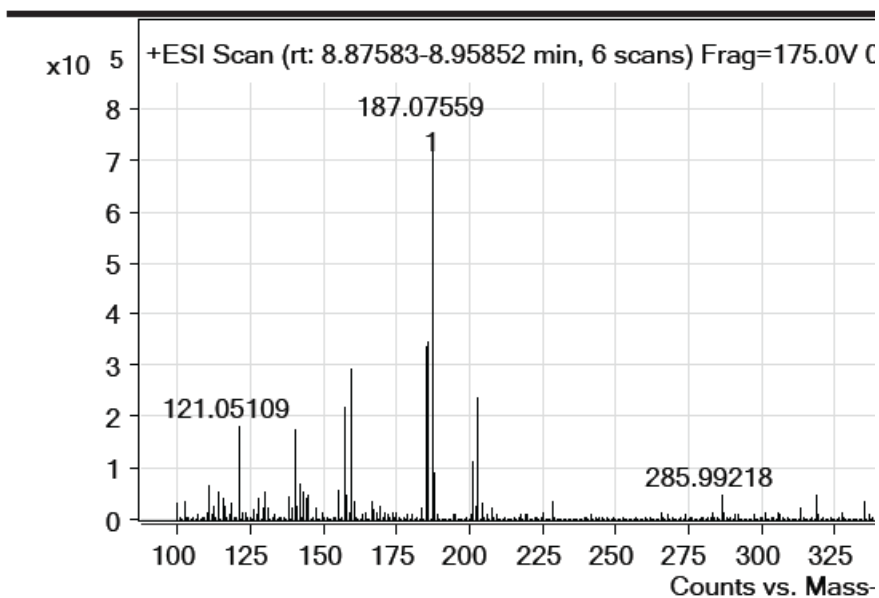
**Ingo Borić** rođen je 24. studenog 2000. godine u Koprivnici. Osnovnu školu “prof. Blaž Mađer” završio je 2015. godine. Iste godine upisuje smjer farmaceutski tehničar Srednje škole Koprivnica u Koprivnici gdje je maturirao 2019. godine. Studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2019. godine. Akademske godine 2021./2022. postaje STEM stipendist. Tijekom preddiplomskog studija stručnu praksu odradio je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za fizikalno-organsku kemiju. Preddiplomski studij završava 2022. s iznadprosječnim težinskim prosjekom ocjena od 3,889, čime dobiva akademski naziv prvostupnika primijenjene kemije. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Uz studijske obaveze, redovito obavlja studentski posao 30 h tjedno. U periodu između 2006. i 2022. godine trenirao je nogomet u 3 različita kluba.

**Ian Horvat** rođen je 20. prosinca 2000. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Pavleka Miškine završio je 2015. godine te je upisao X. gimnaziju Ivan Supek gdje je 2019. maturirao. Iste godine upisuje preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Od četvrtog razreda srednje škole do druge godine preddiplomskog studija primao je Stipendiju grada Zagreba za izvrsnost. Na drugoj godini preddiplomskog studija odradio je stručnu praksu u Selviti d.o.o. - istraživanje i razvoj, gdje je napravio i eksperimentalni dio završnog rada pod neposrednim vodstvom dr. sc. Marine Modrić i uz mentorstvo prof. dr. sc. Irene Škorić. Preddiplomski studij završava 2022. s pohvalom CUM LAUDE i iznadprosječnim težinskim prosjekom ocjena od 4,311, čime dobiva akademski naziv prvostupnika ekoinženjerstva. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. godine trenirao je rukomet u tri različita kluba, 2013. dobiva Open Water Diver certifikat za položeni tečaj ronjenja s bocama te je od 2016. do 2020. godine bio član dva atletska kluba.

# PRILOZI



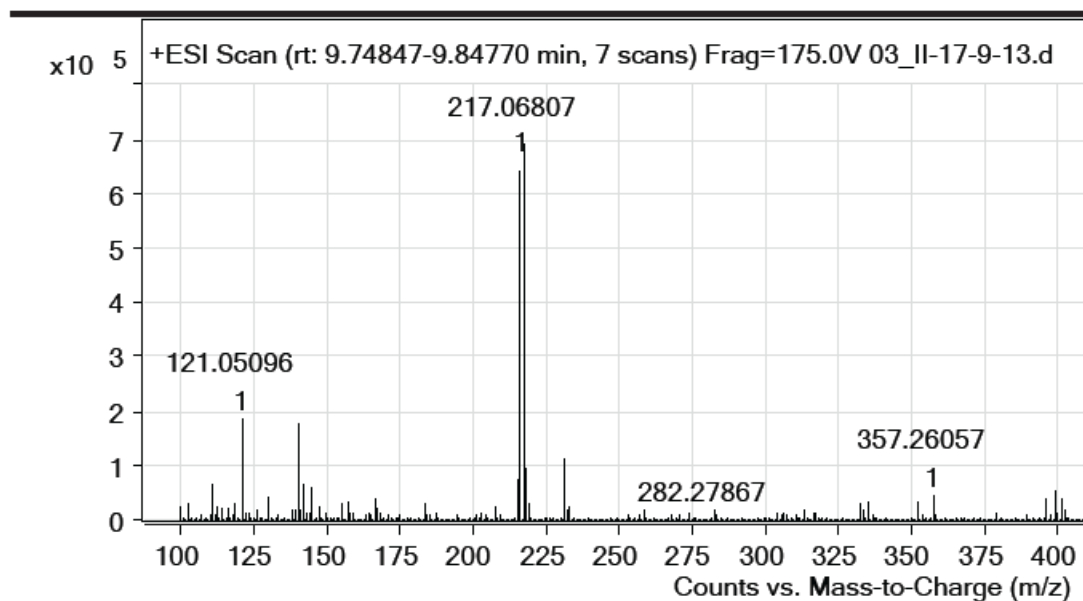
Prilog 1. Slike računatih UV spektara.



**Formula Calculator Results**

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C12 H10 O2	True	186.06829	186.06808	-1.14	C12 H11 O2	99.61

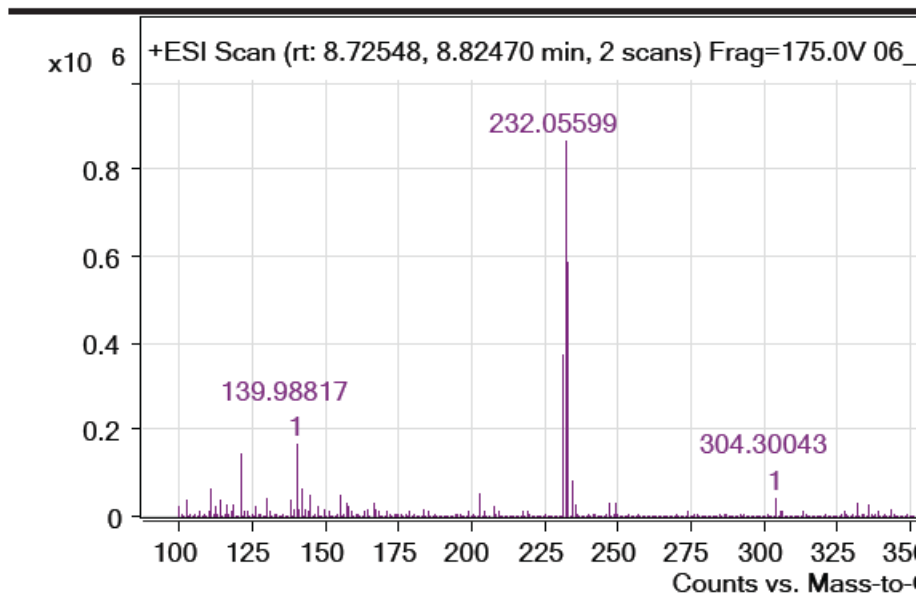
**Prilog 2.** MS spektar i HRMS analiza spoja *trans*-1.



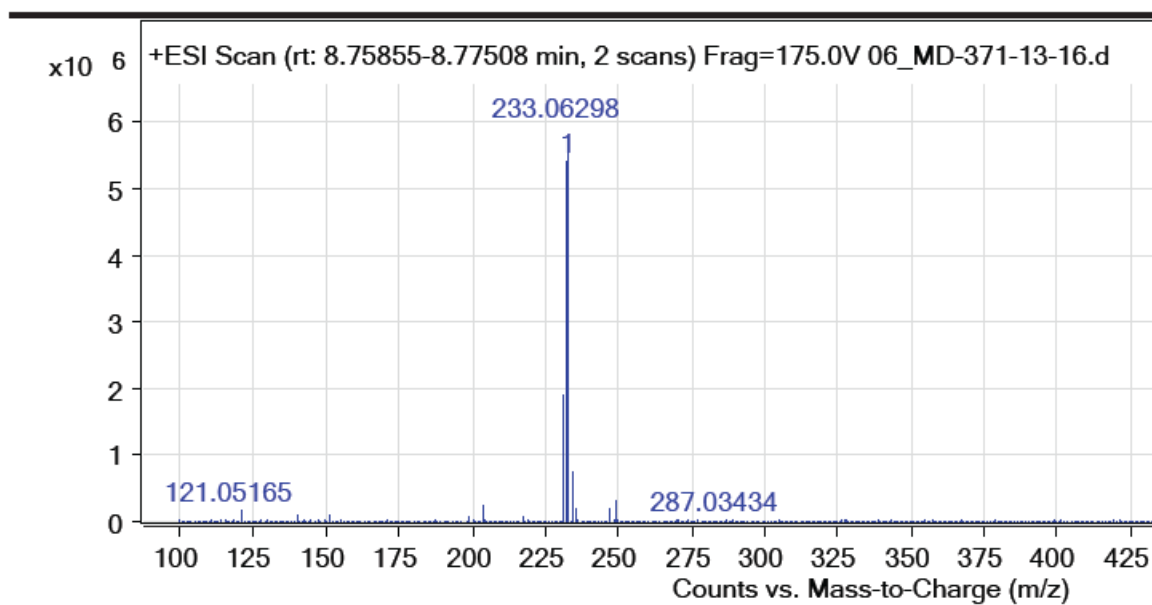
**Formula Calculator Results**

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C13 H12 O S	True	216.0607	216.06089	0.85	C13 H13 O S	97.96

**Prilog 3.** MS spektar i HRMS analiza spoja *trans*-2.



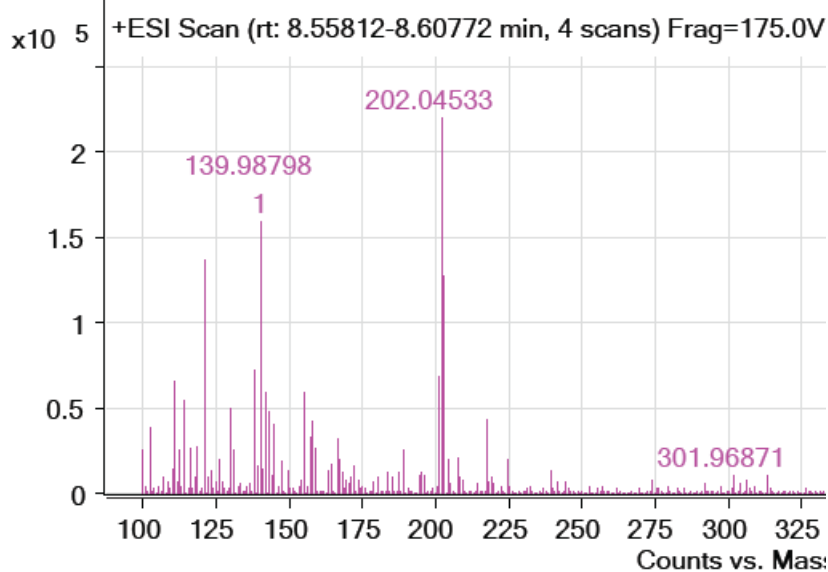
Prilog 4. MS spektar spoja *trans*-5.



Formula Calculator Results

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C13 H12 O2 S	True	232.05563	232.0558	0.73	C13 H13 O2 S	97.17

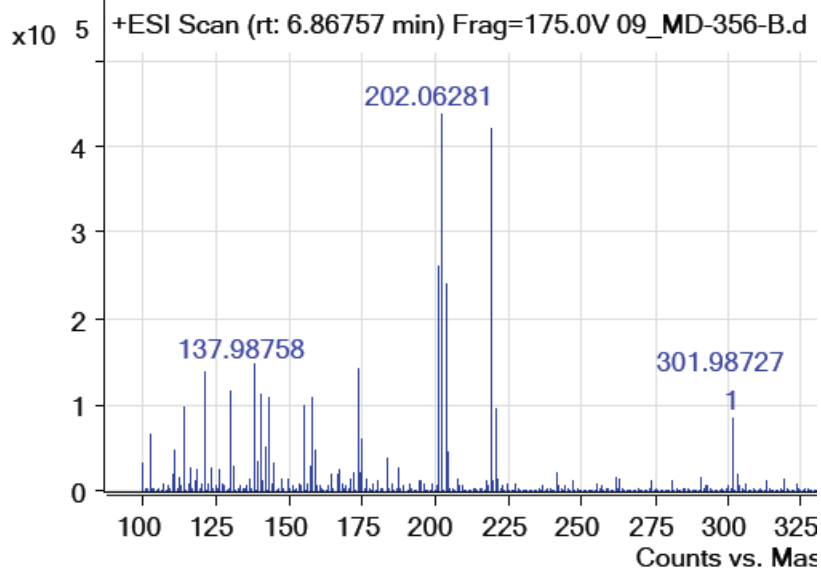
Prilog 5. MS spektar i HRMS analiza spoja *trans*-6.



**Formula Calculator Results**

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C12 H10 O S	True	202.04484	202.04524	1.97	C12 H11 O S	91.36

**Prilog 6.** MS spektar i HRMS analiza spoja *trans*-7.

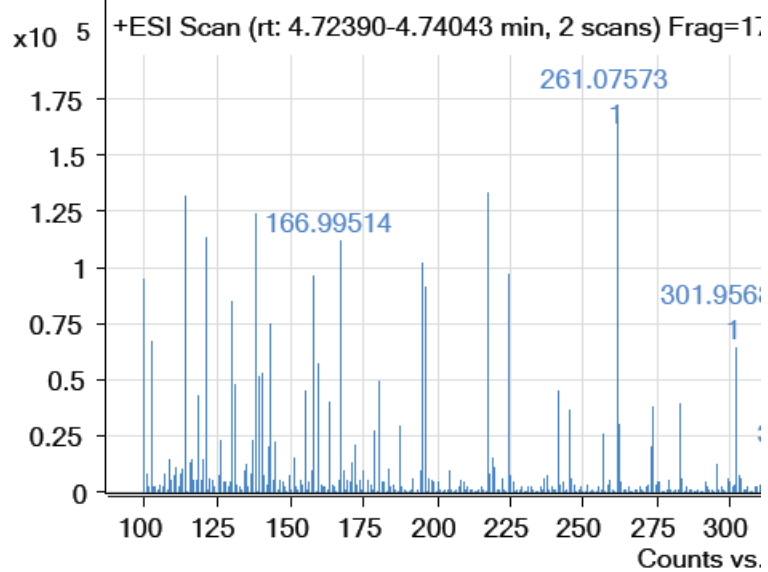


**Formula Calculator Results**

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C12 H10 O3	True	202.06294	202.06299	0.28	C12 H11 O3	91.16

**Prilog 7.** MS spektar i HRMS analiza spoja *trans*-9.





**Formula Calculator Results**

Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Ion Species	Score
C14 H12 O5	True	260.0684	260.06847	0.27	C14 H13 O5	97.83

**Prilog 8.** MS spektar i HRMS analiza spoja *trans*-12.