



Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Paulina Natalia Mech-Warda

**BADANIA *IN SILICO* ZALEŻNOŚCI STRUKTURA - AKTYWNOŚĆ
WYBRANYCH ZWIĄZKÓW *N*-HETEROCYKLICZNYCH**

Promotor:

dr hab. Agnieszka Chylewska, prof. UG

Praca doktorska wykonana w Katedrze Chemii Bionieorganicznej

Gdańsk 2022

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	3
1. Wstęp	4
1.1. Związki heterocykliczne	5
1.2. Pirazyna i jej pochodne	10
1.3. Sulfonamidy	13
1.4. Parametry fizykochemiczne	15
2. Metody obliczeniowe	20
2.1. Teoria funkcyjności gęstości (DFT)	21
2.1.1. Metody hybrydowe	24
2.2. Bazy funkcyjne	25
2.3. Modele rozpuszczalników stosowanych w obliczeniach <i>in silico</i>	27
2.3.1. Model PCM	28
2.3.2. Model SMD	29
2.4. Dokowanie molekularne	30
3. Cel badań	33
4. Metodyka badań własnych	35
5. Wyniki i ich dyskusja	39
5.1. 2-hydrazynopirazyna i jej chlorkowa pochodna (2HP, 2Cl3HP)	39
5.1.1. Analiza strukturalna	39
5.1.2. Widma IR oraz UV-Vis, orbitale graniczne	49
5.1.3. Ustalenie form jonowych	59
5.1.4. Wartości stałych kwasowo-zasadowych	63
5.1.5. Lipofilowość	65
5.1.6. Oddziaływania z DNA	66
5.2. Pochodne sulfonamidowe (ScB_A, ScB_B)	70
5.2.1. Analiza strukturalna	70
5.2.2. Ustalenie form jonowych	77
5.2.3. Wartości stałych kwasowo-zasadowych	81
6. Podsumowanie	84
7. Literatura	87
8. Dorobek naukowy	96
9. Załączniki	99

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

HCA: heterocykliczne aminy aromatyczne (ang. *Heterocyclic Aromatic Amine*)

PhIP: 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo(4,5-b)pirydyna

PZA: Z-pirazynamid

STZ: sulfatiazol (nazwa zwyczajowa)

SAM: sulfacetamid (nazwa zwyczajowa)

ScB: zasada Schiffa (ang. *Schiff Base*)

DFT: teoria funkcjonału gęstości (ang. *Density Functional Theory*)

STO: orbitale slaterowskie (ang. *Slater Type Orbitals*)

GTO: orbitale gaussowskie (ang. *Gaussian Type Orbitals*)

PCM: ang. *Polarizable Continuum Model*

SMD: ang. *Solvation Model based on Density*

2HP: 2-hydrazynopirazyna

2Cl3HP: 2-chloro-3-hydrazynopirazyna

2Cl5HP: 2-chloro-5-hydrazynopirazyna

2Cl6HP: 2-chloro-6-hydrazynopirazyna

pKa: stała deprotonowania (podana w formie jej ujemnego logarytmu)

pKaH: stała deprotonowania sprzężonego kwasu (podana w formie jej ujemnego logarytmu)

1. Wstęp

Choroby nowotworowe, znane i pojawiające się w dokumentach z czasów sprzed naszej ery, a także sposoby przeciwdziałania im oraz ich leczenia od lat stanowią wyzwanie. Mimo setek lat doświadczenia w leczeniu operacyjnym i farmakologicznym, wciąż są globalnym problemem XXI wieku, ze względu na ciągle rosnącą ilość ich rodzajów i nadal ograniczone możliwości terapii. W związku z czym wyzwaniem stało się ograniczanie zagrożenia poprzez unikanie substancji potencjalnie kancerogennych w życiu codziennym jak i środowisku pracy. Jednakże kluczem jest tutaj wyselekcjonowanie tych związków, które mogą sprzyjać powstawaniu chorób nowotworowych. Od lat wiadomo, że do najliczniejszej grupy związków kancerogennych należą związki aromatyczne, szczególnie z grupy amin (wielopierścieniowe aminy aromatyczne, nitrozoaminy czy alkilaniliny), wykazujące bezpośrednie działanie mutagenne wywołujące choroby nowotworowe u zwierząt i ludzi. Istnieje także grupa tzw. aromatycznych amin heterocyklicznych (HCA), których efekt kancerogeny wywołuje dopiero powstający w organizmie addukt aminy z DNA. Na związki te narażeni są wszyscy spożywający mięso po obróbce termicznej [1].

Istotne jest także poszukiwanie związków o aktywności przeciwnowotworowej. Jednym z możliwych sposobów otrzymywania nowych substancji aktywnych jest modyfikacja strukturalna związków o udowodnionej aktywności biologicznej, co może prowadzić do uzyskania nowej substancji o właściwościach innych niż jej prekursor. Przewidywanie wpływu zmian strukturalnych związku na jego aktywność pozwala na ocenę stabilności, skuteczności i ewentualnego zastosowania nowo otrzymanego produktu leczniczego. W takim przypadku, w pierwszej kolejności należy określić właściwości kwasowo-zasadowe związków oraz możliwość występowania równowag w roztworze, które mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia aktywności biologicznej, rozpuszczalności i lipofilowości substancji, a także wskazać możliwość oddziaływania z molekułami obecnymi w środowisku naturalnym lub biomolekułami obecnymi w komórce organizmu żywego. Poszukiwanie nowych związków o działaniu leczniczym oraz wielokierunkowym zastosowaniu farmakologicznym to zakres tematyki naukowej, który jest chętnie podejmowany i rozwijany, czego dowodzi nieustannie rosnąca liczba doniesień dotycząca sposobu ich projektowania oraz modyfikacji procedur syntetycznych [2, 3].

Ważną grupę związków wykazujących istotną aktywność biologiczną, pozyskiwanych z produktów naturalnych bądź otrzymywanych syntetycznie w laboratoriach stanowią

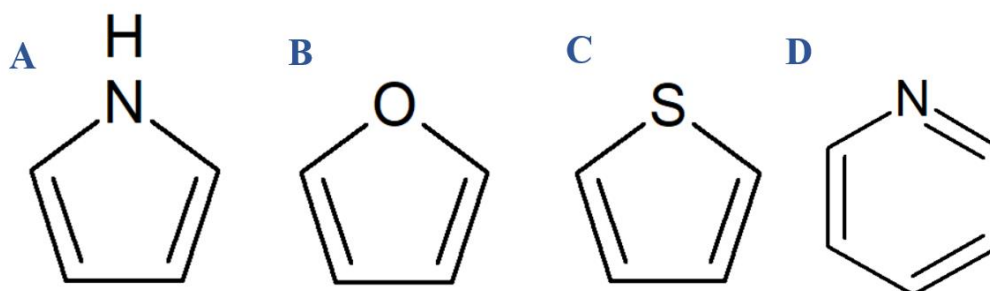
te zawierające w swojej strukturze aromatyczne ugrupowanie(a) heterocykliczne. Analiza efektów dotychczasowych badań sugeruje, że obecność *N*-heterocyklicznego fragmentu strukturalnego w substancjach aktywnych różnych leków jest bezpośrednio odpowiedzialna za wykazywane przez nie właściwości terapeutyczne [4].

1.1 Heterocykliczne związki aromatyczne

Aromatyczne związki heterocykliczne posiadają szkielet z cyklicznym ugrupowaniem aromatycznym, zawierającym więcej niż jeden rodzaj pierwiastka. W pierścieniu jeden bądź kilka atomów węgla zostało zastąpionych heteroatomem (N, O, S). Do tej grupy należą składające się z jednego bądź kilku połączonych ze sobą pierścieni. Najczęściej spotykane są układy pięcio- lub sześcioczłonowe, choć znane są związki zawierające od trzech do siedmioczłonowych pierścieni.

Związki monoheterocykliczne

Do najczęściej spotykanych związków monoheterocyklicznych należą pochodne przedstawione na **Rysunku 1**: pirol, furan, tiofen czy pirydyna.

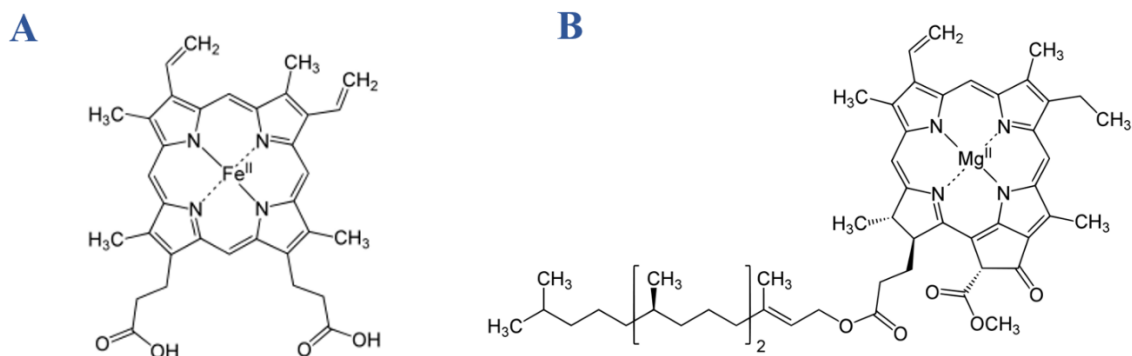


Rysunek 1. Wzory: **A.** pirolu, **B.** furanu, **C.** tiofenu i **D.** pirydyny.

Pirol wykazuje bardzo słabe własności kwasowe, wartość pK_a wynosi około 15 dla procesu deprotonowania. Wymienione pięcioczłonowe układy heterocykliczne dużo łatwiej (w porównaniu z benzenem) ulegają substytucji elektrofilowej, co jest spowodowane znacznie zwiększoną gęstością elektronową (w przeciwieństwie do sześcioczłonowych układów heterocyklicznych). W związku z powyższym nie ulegają w ogóle substytucji nukleofilowej. Ponadto łatwo ulegają utlenianiu [5].

Pierścień pirolu stanowi ważny element struktury wielu istotnych związków makrocyclicznych. Cztery pierścienie pirolu, połączone mostkami metinowymi tworzące układ sprzężonych wiązań podwójnych znane są jako porfiryny. Nie występują one samodzielnie, a jako część większych układów, na przykład hemoglobina zawierająca cztery cząsteczki porfiryń związanych z kationem żelaza(II), czyli hemu oraz

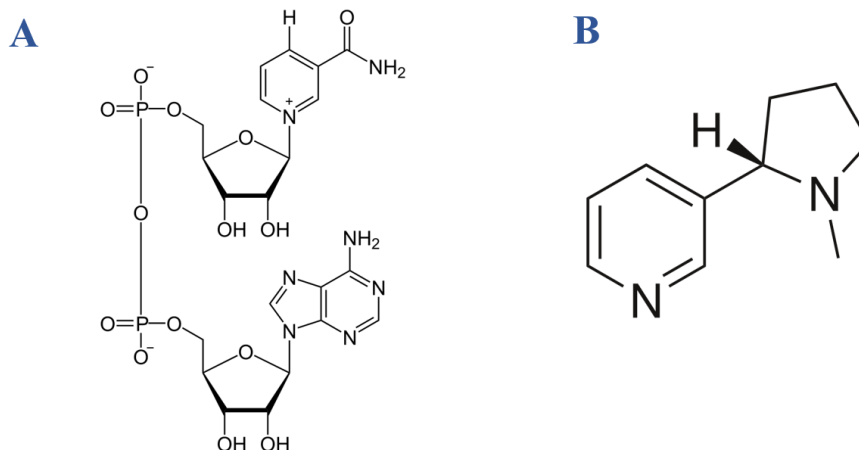
chlorofil, w którym pochodna porfiryny jest związana z kationem magnezu. Strukturę hemu i chlorofilu przedstawia **Rysunek 2**. Związki te są bardzo trwałe, mają charakterystyczne zabarwienie, dzięki jonom metali, z którymi tworzą połączenia koordynacyjne.



Rysunek 2. Struktura: **A.** hemu i **B.** chlorofilu.

Pirydyna (**Rysunek 1D**) ma charakter aromatyczny ze względu na delokalizację sześciu elektronów π , pięciu z atomów węgla oraz jednego z atomu azotu. Atomy węgla oraz azotu są w stanie hybrydyzacji sp^2 i leżą w jednej płaszczyźnie tworząc pierścień. Także niezaangażowana w wiązania wolna para elektronowa atomu azotu na orbitalu sp^2 leży w płaszczyźnie pierścienia, co sprawia, że cały układ jest płaski. Pirydyna jest bezbarwną cieczą o nieprzyjemnym zapachu. Ma charakter polarny, miesza się zarówno z wodą jak i rozpuszczalnikami organicznymi. W wodzie wykazuje właściwości słabo zasadowe (wartość pK_aH wynosi 5,2). Jest ona dużo słabszą zasadą niż aminy alifatyczne i ulega reakcjom typowym dla pierścienia aromatycznego na przykład substytucji elektrofilowej. Sześcioczłonowe układy aromatyczne nie są podatne na utlenianie. [5–7]

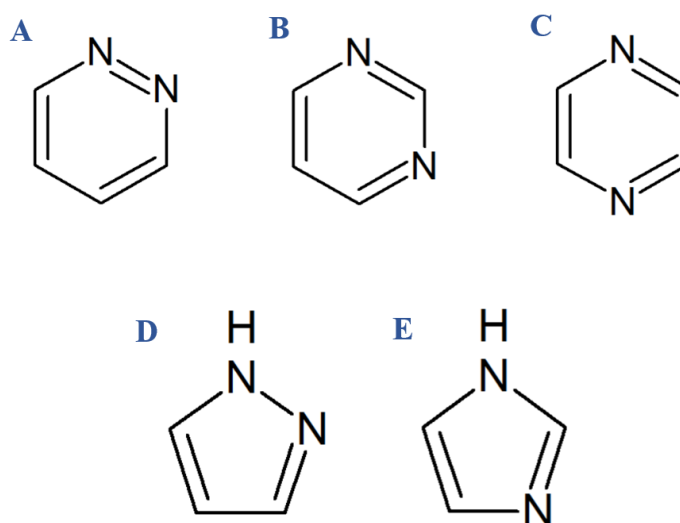
Z kolei, większe układy zawierające pierścień pirydyny pełnią biologicznie ważne funkcje. Pirydyna wchodzi w skład dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (**Rysunek 3A**), który pełni istotną rolę w procesie oddychania komórkowego jak też uzależniającego alkaloidu – nikotyny (**Rysunek 3B**).



Rysunek 3. Przykłady związków zawierających pierścień pirydyny: **A.** dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy i **B.** nikotyina.

Związki diheterocykliczne

Wśród związków zawierających kilka heteroatomów warto wymienić diazyny: pirydazyna (1,2-diazyna), pirymidyna (1,3-diazyna) i pirazyna (1,4-diazyna). Innymi przykładami mogą być pirazol czy imidazol. Wzory wymienionych związków przedstawia **Rysunek 4** [8].



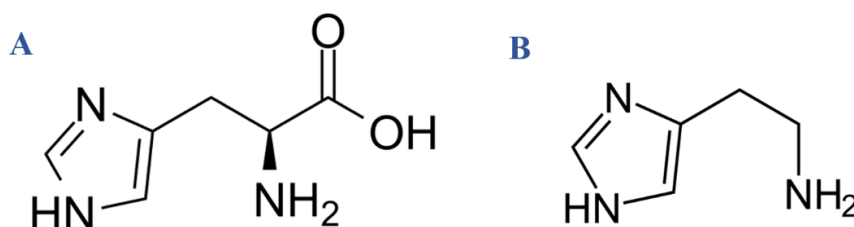
Rysunek 4. Przykłady diazyn: **A.** pirydazyny, **B.** pirymidyny, **C.** piazyny, **D.** piarazolu i **E.** imidazolu.

Wśród diazyn o sześciocząłowym pierścieniu najbardziej znana jest pirymidyna (**Rysunek 4B**), której pochodne stanowią trzy zasady azotowe tworzące kwasy nukleinowe: cytozynę, tyminę i uracyl. Pochodne te wiążą się z pentofuranozami wiązaniem β -*N*-glikozydowym tworząc nukleozydy, a następnie z resztą fosforanową(V) tworząc nukleotydy. Cytozyna i tymina z deoksyrybofuranozą i resztą fosforanową(V)

tworzą nukleotydy, czyli podstawowe jednostki budujące DNA. Pirydazyna (**Rysunek 4A**) naturalnie występuje rzadko, i dopiero jej pochodne znajdują zastosowanie jako herbicydy lub leki. Pirazyna (**Rysunek 4C**) stanowi szkielet strukturalny wielu związków biologicznie aktywnych bądź jej pierścień jest niewielkim elementem rozbudowanych układów. Jej dwie pochodne są badane w pracy, w związku z tym pirazyna zostanie dokładniej omówiona w kolejnym podrozdziale. Wymienione trzy diazyny są przedstawicielami rodziny amin trzeciorzędowych, wykazują bardzo słabe właściwości zasadowe (wartości pKaH sprotonowanych układów mają wartości 2,2 dla pirydazyny i 0,5 dla pirazyny) [8, 9].

W przypadku pięcioczłonowych związków di-*N*-heterocyklicznych wyróżnia się 1,2- oraz 1,3-diazyny. Pirazol (**Rysunek 4D**) i jego pochodne stosowane są do produkcji leków (niesteroidowych leków przeciwzapalnych), barwników i pestycydów. Jego izomerem jest imidazol (**Rysunek 4E**) [8, 9].

W cząsteczkach obydwu diazyn wolna para elektronowa jednego z atomów azotu nie należy do aromatycznego sekstetu π elektronów, w wyniku czego atom ten wykazuje charakter zasadowy i może ulegać protonowaniu. Taki układ powszechnie występuje w przyrodzie, a kation ten jest bardzo stabilny, ze względu na równomierny rozkład ładunku na obydwa atomy azotu. Imidazol jest bardzo słabym kwasem, jego pKa ma wartość 13,4, co świadczy o tym, że jest słabszy od kwasów karboksylowych czy fenoli. Pierścień imidazolu występuje na przykład w cząsteczce histydyny (**Rysunek 5A**) – aminokwasu białkowego oraz histaminy (**Rysunek 5B**) – hormonu naturalnie produkowanego przez organizm ludzki będący między innymi mediatorem odpowiedzi alergicznej czy neuroprzekaźnikiem. Szkielet imidazolowy występuje także w polibenzoimidazolu, który ma zastosowanie w przemyśle oraz w alkaloidach imidazolowych czy lekach np. o charakterze przeciwgrzybicznym [8, 9].



Rysunek 5. Struktury: **A.** histydyny i **B.** histaminy.

Wiele HCA wykazuje działanie biologiczne i wchodzi w skład witamin, używek czy leków. Jednakże sporo związków należących do HCA wykazuje działanie kancerogenne,

a powstaje w wyniku obróbki cieplnej mięsa wołowego, wieprzowego, drobiowego i ryb. Obecnie zidentyfikowano 30 różnych mutagennych HCA w gotowanych produktach bogatych w białko. W zależności od sposobu tworzenia można je podzielić na pirolityczne i termiczne. Termiczne HCA powstają głównie w reakcjach wolnych aminokwasów z heksozami i kreatyniną w zakresie temperatur 100 - 300°C. Pirolityczne HCA są otrzymywane w temperaturach powyżej 300°C w reakcjach białek i aminokwasów [10]. Najczęściej występujące heterocykliczne aminy aromatyczne to pochodne chinoliny, pirydyny, indolu oraz imidazolu. Za najliczniej występującą, bo w ok. 75% uznaje się 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo(4,5-b)pirydynę (PhIP). Wśród substratów w reakcji otrzymywania PhIP można wyróżnić cukry redukujące, kreatyninę i fenyloalaninę. W schemacie przemian opisywanym w literaturze wyróżnia się tworzenie fenyloacetaldehydu z fenyloalaniny poprzez rozkład w reakcji Streckera. Następnie tworzenie się aldehydu fenylooctowego podczas reakcji z aldolem i kreatyniną w celu otrzymania produktu aldolowego. PhIP powstaje w wyniku kondensacji aldolu w ostatnim etapie. Ponadto na różnych poziomach metabolizmu powstają prekursorzy, takie jak kreatynina, aminokwasy, zasady azotowe, sacharydy, białko i nukleozydy [11]. Jak większość chemicznych mutagenów/kancerogenów, PhIP tworzy addukty z DNA. Ich utworzenie poprzedza aktywacja metaboliczna HCA do *N*-hydroksylowych pochodnych z charakterystyczną grupą aminową o charakterze silnie elektrofilowym. Aktywowana pochodna wiąże się kowalencyjnie z nukleofilowymi fragmentami DNA (często w pozycji C8 lub N2 guaniny) i dochodzi do utworzenia adduktu. Estryfikacja octanem lub siarczanem(VI) dodatkowo zwiększa reaktywność HCA [12, 13].

W **Tabeli 1** poniżej, zestawiono wartości pKaH (pKa sprzężonego kwasu) oraz pKa opisanych wcześniej związków *N*-heterocyklicznych.

Tabela 1. Literaturowe wartości pKa (NH) lub pKaH (NH⁺) wybranych aromatycznych związków *N*-heterocyklicznych.

Związek	Wartość pKaH/pKa
pirol (NH ₂ ⁺ /NH)	17,5/23,1 [14]
imidazol (NH ₂ ⁺ /NH)	7,0/13,4 [15]
pirydyna (NH ⁺)	5,2 [16]
pirydazyna (NH ⁺)	2,1 [16]
pirymidyna (NH ⁺)	1,3 [17]
pirazyna (NH ⁺)	0,6 [9]

1.2 Pirazyna i jej pochodne

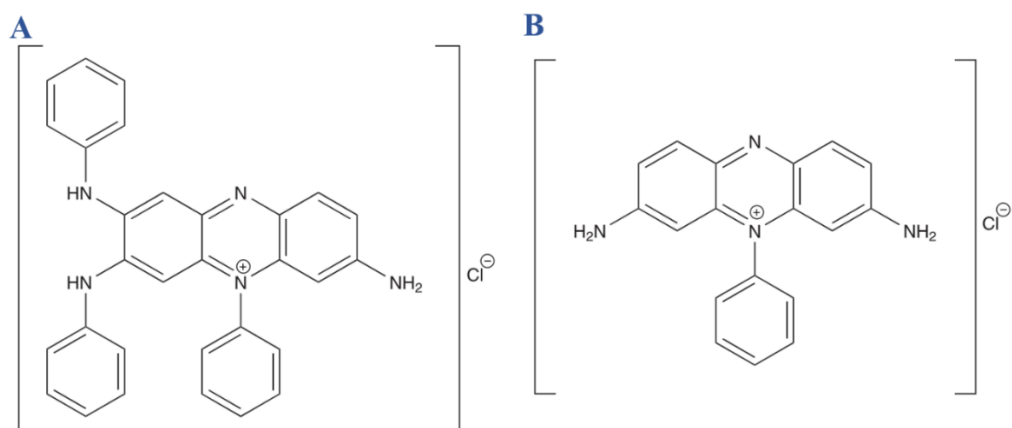
Heterocykliczne związki aromatyczne, zawierające atomy azotu w pierścieniu stanowią, szczególnie w ostatnich latach, największą grupę stosowanych leków. Z tego względu cieszą się również dużą popularnością wśród naukowców poszukujących nowych związków o znaczeniu biologicznym, wykazujących efekt terapeutyczny i zastosowanie farmakologiczne [14-16]. W opisany naukowy trend świetnie wpisuje się grupa pochodnych pirazyny. Pirazyna zawiera w swojej strukturze sześciocząłowy pierścień heteroaromatyczny z dwoma atomami azotu (w 1 i 4 pozycji pierścienia). Jej pochodne posiadają podstawnik w pierścieniu, (często umiejscowiony w drugiej pozycji) lub stanowią małą część większej struktury.

Rodzina pochodnych pirazyny to klasa związków, które występują niemal wszechobecnie w przyrodzie. Alternatywnie, mogą być syntetyzowane chemicznie lub biologicznie i stosowane również jako dodatki smakowe.

Pirazyna jest słabszą zasadą, ($pK_{aH} = 0,6$), niż pirydyna ($pK_{aH} = 5,2$), pirymidyna ($pK_{aH} = 1,3$) czy pirydazyna ($pK_{aH} = 2,3$) zgodnie z danymi zebranymi w **Tabeli 1**.

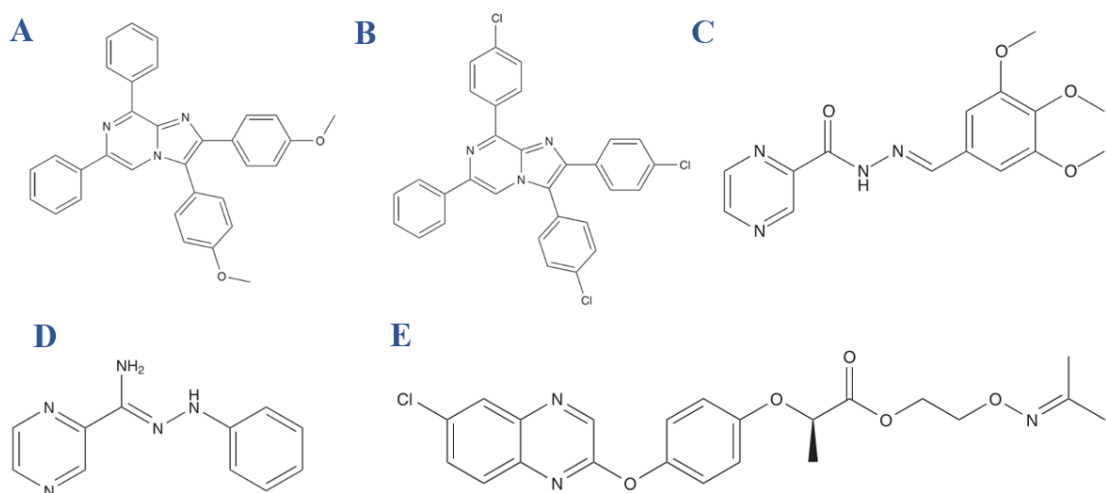
Pochodne pirazyny są obecne w żywności poddawanej obróbce cieplnej, takiej jak produkty wołowe, prażony jęczmień, kakao, kawa, orzeszki ziemne, popcorn, chipsy ziemniaczane, chrupki chleb żytni, a także w świeżej żywności, takiej jak pomidory, groszek, zielona papryka, szparagi, kalarepa i produkty mleczne. Uważa się, że powstają one w wyniku spontanicznej reakcji wywołanej ciepłem pomiędzy aminokwasami i cukrami. Wiele alkilowanych i metoksyłowanych pochodnych pirazyny wykazuje silne właściwości zapachowe i z tego względu stanowi substancje, które odpowiadają za niepowtarzalny smak i aromat artykułów spożywczych i win [7, 9, 21].

Pierścień pirazyny można uznać za najważniejszą diazynę, choćby ze względu na występowanie w grupach układów skondensowanych barwników azynowych (np. induleniny i safraniny, których wzory przedstawia **Rysunek 6**) oraz zastosowaniu w chemioterapii czy obecnie jako fragment wielu związków policyklicznych o znaczeniu biologicznym i/lub przemysłowym [22].



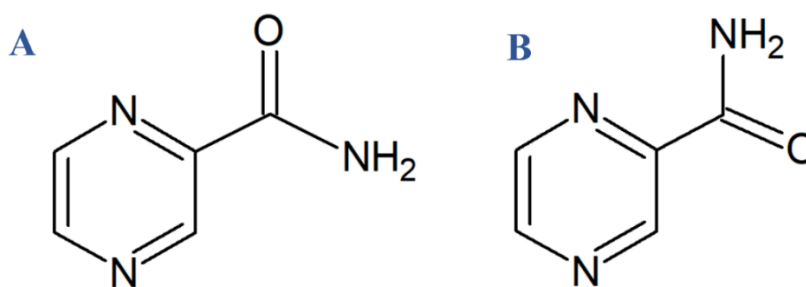
Rysunek 6. Wzory barwników: **A.** indulenu i **B.** feno-safraniny.

Większość pochodnych pirazyny, których charakterystykę i opis można znaleźć w literaturze wykazuje aktywność biologiczną [23, 24]. Jako przykład można tu wymienić właściwości przeciwnowotworowe pochodnych imidazo[1,2-a]pirazyny (**Rysunek 7A** i **7B**) [25–27], przeciwzapalne pirazyno - N-acylohydrazonu (**Rysunek 7C**) [27–29], przeciwgrzybicze pochodnych pirazynokarbohydrazynu (**Rysunek 7D**) [25, 28, 30, 31] czy przeciwbakteryjne pirazynamidu (**Rysunek 8**) [28, 30, 32–37]. Znaleźć można także należące do tej grupy herbicydy np. propachizafof (**Rysunek 7E**) czy etylopropachizafof lub związki fitotoksyczne [28, 30]. Szerokie zastosowanie oraz duże możliwości modyfikacji struktury, a dodatkowo dość nieskomplikowana budowa pochodnych pirazyny sprawiają, że stanowią one ciekawą grupę związków do badań.



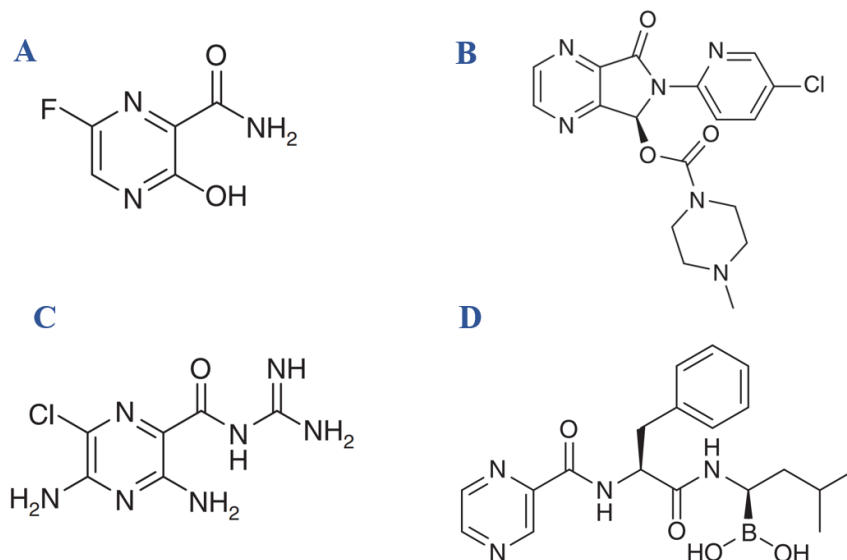
Rysunek 7. Przykłady pochodnych pirazyny: **A.** i **B.** pochodnych imidazo[1,2-a]pirazyny o działaniu przeciwnowotworowym, **C.** pochodnej pirazyno-N-acylohydrazonu o działaniu przeciwzapalnym, **D.** pochodnej pirazynokarbohydrazynu o działaniu przeciwgrzybiczym i **E.** propachizafofu będącego herbicydem.

Jednym z ważniejszych członków rodziny, którą stanowią pochodne pirazyny jest znany i stosowany lek przeciwgruźliczy – pirazynamid (PZA) - prosty związek organiczny zawierający pierścień pirazyny i ugrupowanie amidowe w pozycji drugiej pierścienia (**Rysunek 8**) [38, 39]. Jego właściwości i działanie są znane od wielu lat i zostały dokładnie zbadane i szczegółowo opisane w literaturze. Obecnie naukowcy interesują się jego analogami strukturalnymi, pochodnymi i związkami kompleksowymi. Przykładami analogów strukturalnych mogą być pirazyno-2-amidoksym (PAOX), pirazyno-2-tiokarboksyamid (PTCA) czy 2-amino-5-bromo-3-(metyloamino)pirazyna (ABMAP), w strukturze których ugrupowanie amidowe zostało zamienione na inne zawierające atom azotu. Wykazano przeciwbakteryjne działanie PAOX, przeciwgrzybicze działanie PAOX i PTCA oraz możliwość tworzenia połączeń koordynacyjnych wszystkich trzech analogów z jonami metali na przykładzie jonu rutenu(II) [40–42].



Rysunek 8. Struktura A. Z-pirazynamidu (PZA) i B. E-pirazynamidu.

Kilka pochodnych lub analogów strukturalnych pirazynamidu jest znanych jako stosowane klinicznie leki. Ich struktury przedstawiono na **Rysunku 9**. Należą do nich: Favipiravir (**Rysunek 9A**) o działaniu przeciwwirusowym stosowaniu w leczeniu grypy głównie w Japonii; Eszopiclone (**Rysunek 9B**), stosowany w leczeniu bezsenności; Amiloride (**Rysunek 9C**) działający moczopędnie czy Bortezomib (**Rysunek 9D**) - inhibitor proteasomu 26S stosowany w leczeniu chorych na szpiczaka plazmocytoowego [43].



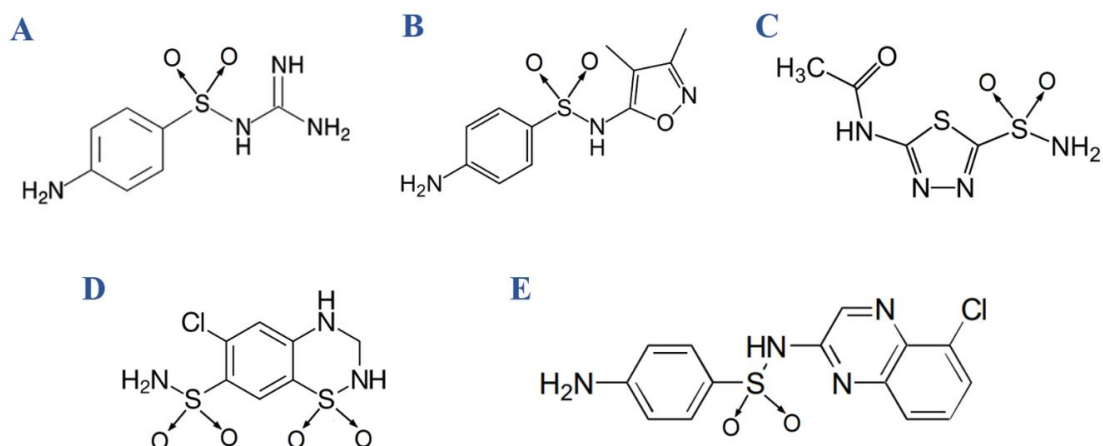
Rysunek 9. Przykłady leków o nazwach handlowych: **A.** Favipiravir, **B.** Eszopiclone, **C.** Amilorid i **D.** Bortezomib.

1.3 Sulfonamidy - budowa, występowanie, aktywność biologiczna

Od odkrycia w latach 30. XX wieku do chwili obecnej antybiotyki sulfonamidowe (leki sulfonamidowe) są stosowane dzięki ich szerokiemu spektrum działania przeciwko bakteriom, pierwotniakom i grzybom, w leczeniu ludzi, zwierząt oraz akwakulturze w celu zwiększonej wydajności hodowli ryb. Sulfonamidy stanowią trzecią klasę środków terapeutycznych do zastosowań weterynaryjnych pod względem komercjalizacji w Europie [44].

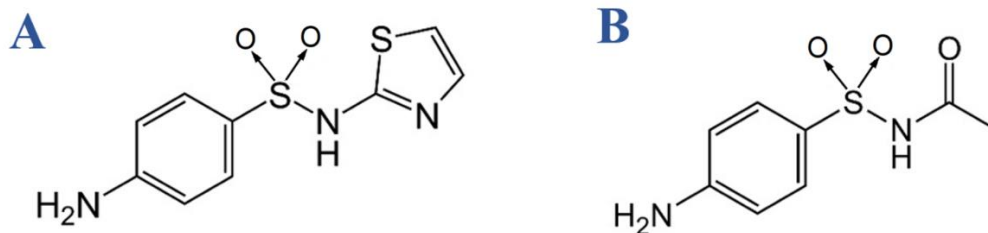
Sulfonamidy i ich strukturalnie pochodne, w których grupa funkcyjna (-SO₂NH-) jest bezpośrednio związana z układem aromatycznym, heterocyklicznym, alifatycznym lub jednostką sacharydową stanowią bardzo liczną klasę związków. Do zalet tych związków należą ich łatwa dostępność komercyjna i możliwość otrzymania za pomocą klasycznych metod syntetycznych, a ponadto wykazują zwykle aktywność biologiczną o zastosowaniu leczniczym. Stanowią też ważną grupę leków, które stosowane są jako środki o działaniu przeciwbakteryjnym (amidy kwasu sulfanilowego) jak sulfaguanidyna czy sulfafurazol, hamujące aktywność anhidrazy węglanowej (stosowane w okulistyce) jak acetazolamid, moczopędne jak tiazydy, oraz przeciwnowotworowe jak N-(5-chlorochinoksalin-2-yl)benzenosulfonamid, których wzory przedstawiono na **Rysunku 10**. Ich różnorodna aktywność spowodowana jest szczególnymi cechami ugrupowań pochodnych sulfonamidowych, które mogą uczestniczyć w wielu oddziaływaniach m.in. z jonami metali, resztami aminokwasowymi czy DNA lub RNA, obecnymi w biomolekułach stanowiącymi cel molekularny tych leków. Grupa

sulfonamidowa często podstawiona jest pierścieniem aromatycznym, co daje najlepsze właściwości terapeutyczne. Ponadto lipofilowość grupy aminowej (połączonej z atomem siarki) odgrywa kluczową rolę podczas wiązania protein, a addukty związków sulfonamidowych z białkami zwiększają lipofilowość i rozpuszczalność np. w tłuszczach. Najważniejsza w kontekście aktywności biologicznej jest grupa anilinowa. Zwykle jej modyfikacja obniża aktywność związku [45]. Dodatkowo sulfonamidy są na ogół stabilne, dość łatwe w syntezie i biodostępne, co dodatkowo wyjaśnia ich szerokie zastosowanie jako leki [46]. W ostatnich dziesięcioleciach znacząco wzrosło zainteresowanie zasadami Schiffa (ScB), przykładowo jako skuteczne ligandy o różnorodnej funkcjonalności, modele ważnych procesów biochemicznych, obiecujące farmaceutyki o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych czy przeciwgrzybiczych lub odczynniki analityczne. Połączenie użytecznych właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych wraz ze względną prostotą preparatyki sprawia, że związki te są jednymi z najpopularniejszych obiektów modyfikacji oraz badań we współczesnej chemii [46–48].



Rysunek 10. Wzory: **A.** sulfaguanidyny, **B.** sulfafurazolu, **C.** acetazolamidu, **D.** hydrochlorotiazydów (sulfonamidu z grupy tiazydów) i **E.** N-(5-chlorochinoksalin-2-yl)benzenosulfonamidu.

Warto tutaj wspomnieć o dwóch związkach należących do rodziny sulfonamidów, których pochodne zmodyfikowane poprzez otrzymanie zasad Schiffa z pirolem badano w pracy. Struktury tych prekursorów przedstawia **Rysunek 11**. Są to sulfatiazol (STZ) i sulfacetamid (SAM). Sulfatiazol wykazuje silne działanie bakteriostatyczne i jest stosowany najczęściej w postaci soli srebrowej w leczeniu bakteryjnych zakażeń przy oparzeniach czy owrzodzeniach skóry. Sulfacetamid to substancja lecznicza o działaniu bakteriostatycznym wykorzystywany w leczeniu stanów zapalnych oka.



Rysunek 11. Struktura: **A.** sulfatiazolu (STZ) i **B.** sulfacetamidu (SAM).

1.4 Parametry fizykochemiczne

Badania związków o potencjalnej aktywności biologicznej należy rozpocząć od opisu kilku istotnych elementów, takich jak struktura z uwzględnieniem tautomerii, właściwości kwasowo-zasadowe oraz lipofilowość. Znajomość tych parametrów umożliwia przewidywanie czy związek ma potencjalne znaczenie biologiczne lub lecznicze oraz jego zachowania w organizmie lub środowisku naturalnym [49, 50].

Właściwości kwasowo-zasadowe

Właściwości kwasowo-zasadowe opisuje liczbowo wartość pKa (podawana jako ujemny logarytm stałej dysocjacji kwasowej). Właściwości kwasowo-zasadowe można opisać w różnych środowiskach. Do najważniejszych należy środowisko wodne, które symuluje warunki wewnątrz komórek organizmu czy też środowiska przyrodniczego. Jedną z najbardziej fundamentalnych i kluczowych reakcji w naturze jest przeniesienie protonu, dlatego zrozumienie i przewidywanie przebiegu tego procesu jest bardzo istotne. Pomaga przewidzieć ewentualną aktywność biologiczną cechowaną zachowaniem się substancji czynnej na poziomie molekularnym, poprzez znajomość form zjonizowanych w zależności od pH oraz przewidywanie tworzonych oddziaływań czy procesów komórkowych lub biochemicznych, którym ulega substancja (takich jak wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie a także przepuszczalność przez błonę komórkową, biodostępność i struktura) [51]. Ponadto równowaga kwasowo-zasadowa ma wpływ na oddziaływania molekularne oraz zmiany ładunku związku związanego bezpośrednio ze zmianami pH, a w efekcie formę jonową związku.

Wartości pKa można wyznaczyć za pomocą wielu metod, zarówno eksperymentalnych, jak i teoretycznych. Najczęściej stosowanymi metodami eksperymentalnymi są miareczkowanie potencjometryczne i spektrofotometryczne UV-Vis. Metody teoretyczne opierają się zwykle na cyklu termodynamicznym lub metodzie izodesmicznej [52–58].

Lipofilowość

Lipofilowość (hydrofobowość) związana jest ze zdolnością związku do przenikania przez błony komórkowe bądź naturalne bariery na poziomie komórkowym. Błony kontrolują zachowanie związków, dlatego biorą udział we wszystkich istotnych procesach biochemicznych, które determinują farmakokinetykę leku w organizmie. Błona komórkowa ma charakter amfipatyczny, a jej ważną cechą jest półprzepuszczalność warunkowana obecnością dwuwarstwy lipidowej, która wykazuje charakter lipofilowy i umożliwia swobodne przenikanie do wnętrza komórek cząsteczek niepolarnych. Przenikanie jonów i cząstek polarnych możliwe jest tylko dzięki obecnym w błonie białkom transportującym. W związku z czym projektowanie substancji aktywnych musi uwzględniać charakter związku umożliwiający przenikanie do wnętrza komórek, a także formę jonową jaką będzie miał związek w wodnym środowisku wnętrza komórki [59]. Lipofilowość odgrywa kluczową rolę w procesie rozpuszczania związku oraz wyjaśnianiu jego oddziaływań z cząstkami obecnymi w jego bezpośrednim otoczeniu. Pozwala określić możliwości działania i trwałość związku w środowisku naturalnym.

Lipofilowość substancji rozpuszczonych jest wyrażana liczbowo jako współczynnik podziału i podawana w postaci logarytmicznej ($\log P$). Można go wyznaczyć w układzie modelowym dwóch niemieszających się rozpuszczalników: np. n-oktanol/woda. Woda jest typowym środowiskiem wewnątrzkomórkowym, natomiast niepolarny n-oktanol jest stosowany ze względu na swoje właściwości zbliżone do dwuwarstwy lipidowej. Należy jednak pamiętać, że $\log P$ wyznaczony w ten sposób opisuje tylko właściwości cząsteczki obojętnej [60–62]. Współczynnik podziału może być wyznaczony doświadczalnie na różne sposoby: za pomocą wytrząsania w kolbie połączonym z identyfikacją zawartości związku w fazach techniką spektrofotometrii UV-Vis, metodą HPLC w odwróconym układzie faz, pH-metrycznie lub oszacowany na podstawie obliczeń teoretycznych [50, 63–65].

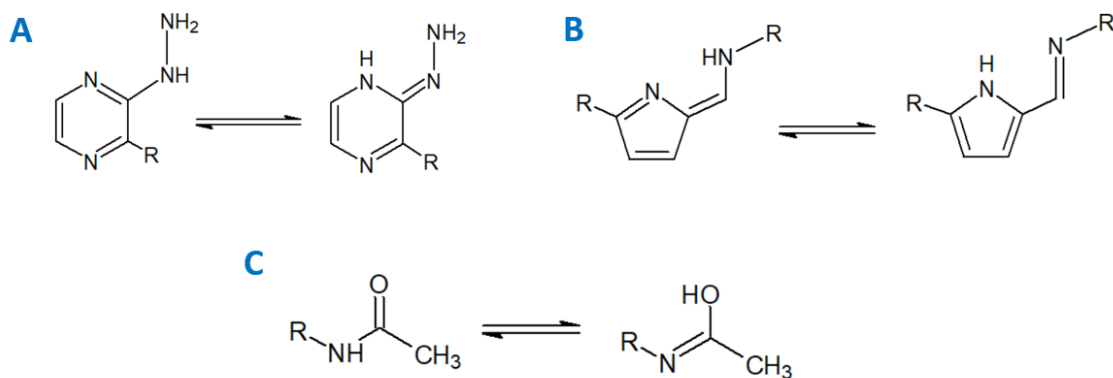
Tautomeria w układach heterocyklicznych

Tautomeria stanowiąca szczególnie przypadek izomerii, odgrywa ważną rolę we współczesnej chemii organicznej, biochemii, chemii medycznej, farmakologii czy biologii molekularnej. Zasadniczo tautomery są izomerami, które posiadają odrębne struktury powstałe w wyniku migracji atomu wodoru. Wyznaczenie form tautomerycznych i preferowanych przez związki heterocykliczne trwałych struktur

są wyzwaniem mającym bezpośredni wpływ na interpretację i przewidywanie reaktywności chemicznej, właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych związku. Szczególnie interesujące są układy sprzężone, w których transferowi protonu towarzyszy powstawanie silnego wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego, często stabilizującego układ. Ważnym aspektem badań nad nowym związkiem jest więc wpływ tautomerii na rzeczywistą budowę związku, a tym samym na jego potencjał oddziaływania z układami biologicznymi. W zależności od formy tautomerycznej substancja może w roztworze wodnym ulegać jonizowaniu w sposób mający znaczący wpływ na jej właściwości [66].

Zdecydowana większość równowag tautomerycznych w związkach heteroaromatycznych ma charakter prototropowy. Prototropia polega na migracji atomów wodoru w obrębie cząsteczki z jednoczesnym przeniesieniem wiązania podwójnego. Wyznaczenie względnych energii swobodnych Gibbsa tautomerów, a także ich konformerów pozwala ocenić stabilność i ich udział w strukturze, a ostatecznie, na tej podstawie, określić najbardziej prawdopodobną formę, w jakiej występuje związek w danym środowisku. Nieodłącznym elementem badań wydają się być także bariery energetyczne przejścia między konformerami. Ich znajomość umożliwia określenie prawdopodobieństwa przechodzenia jednej formy w drugą oraz występowania równowag pomiędzy konformacjami [67, 68].

Najważniejszym rodzajem równowag o charakterze prototropowym spotykanych często w badaniach związków organicznych jest tautomeria imino – enaminowa. W formie iminowej atom wodoru ulega migracji z atomu węgla na atom azotu tworząc enaminę i odwrotnie, co przedstawiono na poniższym schemacie (**Schemat 1**). Zjawisko to zostało zaobserwowane zarówno w przypadku opisywanych w pracy pochodnych pirazyny jak i sulfonamidowych. Ponadto w cząsteczce związku ScB_B w obecnej grupie acetylowej połączonej bezpośrednio z grupą sulfonamidową występuje zjawisko tautomerii keto-enolowej, w wyniku której otrzymujemy formy enolo-iminową (OH) i keto-aminową (NH). Przeniesieniu ulega atom wodoru z atomu azotu na atom tlenu.



Schemat 1. Przykłady tautomerii zachodzących w strukturze badanych układów: imino-enaminowej w pochodnych pirazyny (A) i sulfonamidowych zasad Schiffa (B) oraz keto-enolowej w pochodnej sulfacetamidu (C).

W zależności od rodzaju środowiska, formy jonowej oraz pH, związek może występować w postaci różnych form tautomerycznych. Kluczowe jest ustalenie struktury, w formie której związek w zależności od warunków będzie występował i uczestniczył w oddziaływaniach z biomolekułami. Znajomość równowag tautomerycznych umożliwia przewidywanie sposobu i siły oddziaływania z biomakromolekułami, a pośrednio aktywności substancji wobec organizmów żywych.

Ze względu na szybkość przemian pomiędzy tautomerami, badania równowag tautomerycznych są bardzo trudne do przeprowadzenia metodami eksperymentalnymi. Z tego powodu często wspomaga się eksperyment sięgając po obliczenia kwantowo-chemiczne, które na podstawie analizy energetycznej umożliwiają określenie stabilności danej formy tautomerycznej. Dają także możliwość optymalizacji struktur wszystkich tautomerów, także form, których nie udało się scharakteryzować w sposób eksperymentalny z uwagi na brak możliwości ich wyodrębnienia.

Oddziaływania z DNA

W ostatniej dekadzie obiektem zainteresowania naukowców zajmujących się projektowaniem nowych związków o potencjalnej aktywności biologicznej bądź działaniu terapeutycznym jest określenie celu molekularnego tego związku po przedostaniu się do wnętrza komórek organizmu żywego. Biomakromolekuły spełniające tę funkcję to najczęściej białka lub DNA. Ważnym jest również poznanie charakteru i siły oddziaływania związku z biomolekułą.

Substancje aktywne mogą wiązać się z DNA i zmieniać jego strukturę bądź zakłócać funkcje życiowe w zależności od rodzaju komórki, a także zaburzać podziały komórkowe. Analiza oddziaływań substancja - DNA umożliwia określenie wpływu

związku na organizmy żywe - ich ewentualne niekorzystne (mutagenne) bądź terapeutyczne działanie. Małe cząsteczki mogą wiązać się z DNA poprzez oddziaływania kowalencyjne lub niekowalencyjne. Badania skupiające się na scharakteryzowaniu oddziaływań zachodzących między związkiem a DNA umożliwiają lepiej zrozumieć mechanizm tego działania na poziomie molekularnym. Pozwalają też przewidzieć, w jaki sposób i poprzez które atomy substancja czynna wiąże się z DNA oraz określić typ tych oddziaływań. Są to także cenne wskazówki podczas badań analogów strukturalnych związku o znanych właściwościach i dobrze scharakteryzowanego pod kątem oddziaływania z DNA. Co więcej, takie badania mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmu oddziaływania niektórych związków na organizmy żywe, co przyczynia się do weryfikacji i rozwoju projektowania oraz sposobu opracowywania nowych i bardziej skutecznych leków ukierunkowanych na DNA [69–71].

Trzy główne rodzaje oddziaływań niekowalencyjnych to wiązanie rowkowe, wiązanie interkalarne i oddziaływania elektrostatyczne. Podczas wiązania w małym rowku cząsteczki znajdują się w bliskiej odległości ze ściankami rowka, co skutkuje tworzeniem się licznych wiązań wodorowych. Nukleotydy połączone są ze sobą wiązaniami 3'5'-fosfodiesterowymi i tworzą ujemnie naładowany rdzeń stanowiący układ sacharyd – fosforan), od którego odchodzą przyłączone zasady azotowe. Oddziaływania elektrostatyczne zachodzą między związkiem, a zasadami azotowymi oraz fosforanowym elementem szkieletu DNA. Podobnie jak w przypadku wiązania w małym rowku, wiązanie w dużym rowku obejmuje również tworzenie się wiązań wodorowych między cząsteczkami a DNA. Z kolei interkalacja zachodzi wówczas, gdy płaskie układy pierścieni aromatycznych ulokują się między parami zasad układając się do nich równolegle. W ten sposób najczęściej oddziałują płaskie cząsteczki organiczne zawierające kilka aromatycznych pierścieni [72, 73]. Oddziaływania DNA z cząsteczkami organicznymi można badać za pomocą wielu metod eksperymentalnych (potencjometria, magnetyczny rezonans jądrowy, spektrofotometria, spektrofluorymetria, elektrochemia), a także teoretycznie (dokowanie molekularne, dynamika molekularna) [72, 74, 75].

2. Metody obliczeniowe

Obecnie, właściwości fizykochemiczne związku, takie jak struktura, właściwości kwasowo-zasadowe, lipofilowość czy oddziaływania z biomakromolekułami mogą być z powodzeniem badane za pomocą metod chemii obliczeniowej. Dostępna szeroka gama metod umożliwia zarówno wstępne szacowanie jak też dokładny opis właściwości w zależności od potrzeb i możliwości badaczy.

Początki stosowania metod obliczeniowych w chemii sięgają okresu międzywojennego a ich rozwój odbywał się równolegle w różnych częściach świata. Wtedy wykonano pierwsze obliczenia w oparciu o aktualne teorie i prawa, a od lat 40-tych XX wieku rozwój komputerów umożliwił prowadzenie pracochłonnych i żmudnych obliczeń z ich pomocą. Przez kolejne lata stosowano głównie podejście półempiryczne, które wykorzystuje dane eksperymentalne, a na początku drugiej połowy stulecia przeprowadzono pierwsze obliczenia *ab initio* (na cząsteczkach dwuatomowych) opierające się już tylko i wyłącznie na podstawowych prawach fizyki. Aż do późnych lat 60-tych wykorzystywano programy pisane na własny użytek w języku programowania FORTRAN kodując w nim kartę perforowaną będącą nośnikiem danych dla ówczesnych maszyn. Od roku 1970 możliwe stało się stosowanie powszechnie dostępnego wśród naukowców programu GAUSSIAN70, pierwszej wersji programu służącego nam do dzisiaj. Program w postaci zestawu kodów umożliwiających prowadzenie obliczeń *ab initio* dla kilkuset układów został napisany przez Johna Pople'a. Za swoją pracę John Pople otrzymał w roku 1998, wraz z Walterem Kohnem, nagrodę Nobla za rozwój metod obliczeniowych w chemii kwantowej. Początek lat 70-tych można uznać za małą rewolucję w obliczeniowym podejściu do badań związków chemicznych [76]. W roku 1964 i 1965 zostały opublikowane artykuły opisujące równania Hartree-Focka, a także zastosowania teorii orbitali molekularnych (MO). Jako ważniejsze warto wymienić prace Hohenberga i Kohna [77] oraz Kohna i Shama [78] przedstawiające fundamenty metod DFT (ang. *Density Functional Theory*). Jednak podejście DFT nie było uważane za wystarczająco dokładne do obliczeń w chemii kwantowej aż do lat 90-tych, kiedy to stosowane w nim przybliżenia zostały znacznie udoskonalone, tak aby lepiej opisywać elektronowy potencjał wymiany i korelacji [79].

Rozwój różnego rodzaju metod teoretycznych opartych na podstawowych prawach fizyki oraz technicznie możliwa ciągle większa moc obliczeniowa komputerów pozwalają rozważać coraz większe i bardziej złożone układy, które coraz bardziej

odpowiadają rzeczywistym układom występujących w organizmach i środowisku. Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat opracowano bardzo wiele metod obliczeniowych chemii kwantowej, które można podzielić na kilka grup: metody *ab initio* oparte na przybliżonym rozwiązywaniu równania Schrödingera (metoda Hartree-Focka, rachunku zaburzeń Møllera-Plesseta, sprzężonych klasterów, itp.); metody półempiryczne wykorzystujące dane eksperymentalne (np. Pariser-Parr-Pople, CNDO, AM1, PM3, MNDO), metody mechaniki molekularnej korzystające z mechaniki klasycznej i pól siłowych (ang. *Molecular Mechanics*, MM) oraz metody DFT oparte o teorię funkcjonału gęstości. Te ostatnie stały się w ciągu ostatnich 20-30 lat najbardziej popularne, a ich fenomen wynika przede wszystkim z oferowanej przez nie akceptowalnej dokładności wyników, przy jednoczesnym umiarkowanym koszcie obliczeniowym.

Metody obliczeniowe zyskały także popularność dzięki szerokiemu spektrum możliwych zastosowań, między innymi do przewidywania struktury elektronowej, właściwości fizycznych i chemicznych, modelowania reakcji oraz ustalania stanów przejściowych, symulowania widm spektroskopowych, czy też projektowania leków oraz nowych materiałów.

2.1 Teoria funkcjonału gęstości (DFT)

Teoria funkcjonału gęstości (DFT) należy do grupy metod kwantowo-mechanicznych. Stosowana jest często w chemii i fizyce do obliczania struktury elektronowej układów. Jest bardzo popularna w obliczeniach fizycznych dotyczących ciała stałego, stosowana od lat 70. XX wieku. Jednakże dopiero niespełna dwadzieścia lat później, w latach 90., udoskonalenia metody sprawiły, że stała się wystarczająco dokładna, aby używać jej w chemii kwantowej. Wynikiem tego był gwałtowny wzrost zastosowań obserwowany w aktualnych publikacjach naukowych. Ogromną zaletą metody DFT jest jej korzystny stosunek kosztów do wydajności w porównaniu z metodami *ab initio* opartymi na funkcji falowej, takimi jak teoria zaburzeń Møllera-Plesseta czy sprzężonych klasterów. Ponadto metoda ta uwzględnia energię korelacji elektronowej i umożliwia obliczenia dla dużych układów. W rezultacie DFT jest obecnie zdecydowanie najczęściej stosowaną metodą struktury elektronowej [80]. O ogromnym znaczeniu metod DFT w fizyce i chemii świadczy przyznanie w 1998 r. Nagrody Nobla „za rozwój teorii funkcjonału gęstości” Walterowi Kohnowi [81].

Podstawą teorii struktury elektronowej materii jest nierelatywistyczne równanie Schrödingera (1) dla wieloelektronowej funkcji falowej:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_j \nabla_j^2 - \sum_{j,l} \frac{Z_l e^2}{|r_j - R_l|} + \frac{1}{2} \sum_{j \neq j'} \frac{e^2}{|r_j - r_{j'}|} - E \right\} \psi = 0 \quad (1)$$

gdzie r_j - położenie elektronów; R_l i Z_l - kolejno położenie i liczby atomowe jąder; \hbar , m , e - podstawowe stałe; E - energia.

Równanie to odzwierciedla przybliżenie Borna-Oppenheimera, w którym – dla celów badania dynamiki elektronów – znacznie cięższe jądra atomowe uważa się za unieruchomione w przestrzeni, a poruszają się tylko elektrony [82]. Funkcja falowa ψ zależy od położenia i spinów elektronów N i zwykle opisuje niezdegenerowane stany podstawowe.

Zastosowanie metody DFT było możliwe na podstawie dwóch twierdzeń Hohenberga-Kohna (HK) postawionych początkowo dla niezdegenerowanych stanów podstawowych przy braku pola magnetycznego przez Waltera Kohna i Pierre'a Hohenberga [77]. Pierwsze twierdzenie HK mówi, że właściwości stanu podstawowego wieloelektronowego układu są jednoznacznie określone przez gęstość elektronową, która jest miarą prawdopodobieństwa znalezienia elektronu w danym położeniu, czyli funkcją zmiennych położenia (x, y, z) . Twierdzenie to zostało później rozszerzone na rachunek zaburzeń zależny od czasu i umożliwiło opracowanie zależnej od czasu teorii funkcjonału gęstości (TDDFT), którą można wykorzystać do opisu stanów wzbudzonych przy dobrym uwzględnieniu korelacji elektronowej. Dzięki temu można ją stosować nawet do stosunkowo dużych układów. Drugie twierdzenie HK definiuje funkcjonał energii dla układu i dowodzi, że gęstość elektronowa stanu podstawowego powoduje minimalizację tego funkcjonału. Problem stanowi jednak nieznaną postać tego funkcjonału.

Twierdzenia HK zostały dalej rozwinięte przez Waltera Kohna i Lu Jeu Shama co skutkowało praktycznym wykorzystaniem teorii DFT w metodzie Kohn–Sham DFT (KS DFT). Równanie Kohna-Shama jest nieoddziaływującym równaniem Schrödingera, które opisuje fikcyjny układ („układ Kohna-Shama”) cząstek nieoddziałujących (zazwyczaj elektronów), które generują taką samą gęstość, jak każdy układ oddziałujących cząstek i jest ono zdefiniowane przez lokalny efektywny (fikcyjny) potencjał zewnętrzny, w którym poruszają się nieoddziałujące cząstki. Podstawowym założeniem tej metody jest więc brak wzajemnego oddziaływania elektronów, które

oddziałują jednakże z jądrami atomowymi i z polem zewnętrznym elektronów. Potencjał efektywny zawiera korelację kulombowską i wymienną. Należy go dobrać tak, aby gęstość rzeczywistego układu w stanie podstawowym była dokładnie odwzorowana przez gęstość nieoddziałujących elektronów [78].

Energię, w metodach DFT, oblicza się ze wzoru (2):

$$E_{DFT} = T_e + E_{ne} + J + E_{xc} \quad (2)$$

gdzie: T_e - energia kinetyczna elektronów; E_{ne} - energia elektrostatycznego przyciągania elektronu i jądra; J - energia elektrostatycznego odpychanie elektronów; E_{xc} - energia korelacyjno-wymienna.

Pierwsze trzy składniki sumy (T_e , E_{ne} , J) są możliwe do określenia. Natomiast człon przedstawiający energię korelacyjno-wymienną (E_{xc}) opisujący energię wymienną, korelację elektronową, poprawkę do energii kinetycznej oraz poprawkę do oddziaływania elektronów ze sobą nie posiada jawnej postaci i wyprowadzany jest w sposób empiryczny. Istnieje wiele metod pozwalających na znalezienie jego przybliżenia. Do najczęściej stosowanych należą: LDA - metoda lokalnej gęstości (ang. *Local Density Approximation*), LSDA - metoda lokalnej gęstości spinowej (ang. *Local Spin Density Approximation*) oraz GGA – metody gradientowe (ang. *Generalized Gradient Approximation*). Pierwsza przybliża funkcjonału E_{xc} energią jednorodnego gazu elektronowego o gęstości identycznej z układem wyjściowym (można założyć jednorodność lokalną, czyli w małej objętości, gdyż gęstość w molekuale jest niejednorodna). Drugą odróżnia od pierwszej tylko uwzględnianie polaryzacji spinowej. Ostatnia zakłada nielokalność zależności energii korelacyjno-wymiennej od gęstości oraz uwzględnia gradient gęstości elektronowej [83, 84]. Najczęściej jednak stosuje się metody hybrydowe z metodą Hartree-Focka, jak na przykład B3LYP [85] czy opracowana przez zespół Prof. Truhlara metoda M06-2X [86]. Rozwijanie nowych i coraz dokładniejszych funkcjonałów gęstości stanowi ciągle bardzo interesującą i eksploatowaną dziedzinę badań.

W ostatnich dekadach metody DFT są powszechnie stosowane. Ich zaletą jest stosunkowo krótki koszt obliczeniowy, przy wynikach o dosyć dobrej zgodności z uzyskiwanymi eksperymentalnie. Ponadto metody te można z powodzeniem stosować dla dużych układów takich jak związki organiczne czy nawet biomolekuły.

2.1.1 Metody hybrydowe (B3LYP, M06-2X)

Literatura podaje, że wartości energii wiązań otrzymane z użyciem członu korelacyjno-wymiennego wyznaczonego na podstawie wymienionych wcześniej procedur są zawyżone. Przy użyciu samej metody Hartree-Focka te same wartości otrzymuje się zbyt niskie względem rzeczywistych. Dlatego właśnie, aby jak najlepiej odtworzyć wyniki rzeczywiste, obecnie najczęściej stosuje funkcjonały hybrydowe. W podejściu tym człon wymienny E_x stanowi energia wymienna obliczona na podstawie formalizmu Hartree-Focka, a człon korelacyjny E_c wyznaczany jest w oparciu o teorię DFT. Pożądaną cechą otrzymanego funkcjonału jest uniwersalność, powinien on dawać dobre wyniki dla różnych układów (atomów, cząsteczek, ciał stałych) z różnym charakterem wiązania (kowalencyjne, jonowe, metaliczne, wodorowe, van der Waalsa). Przykładami funkcjonałów hybrydowych są: BLYP, B3PW91, PBE0, czy zastosowane w pracy B3LYP, M06 i M06-2X.

Najbardziej popularnym potencjałem hybrydowym jest B3LYP. Nazwa funkcjonału powstała od pierwszych liter nazwisk jego twórców: B od Becke (zaproponował część wymienną potencjału E_{xc}) i LYP od Lee, Yang'a i Parr'a (zaproponowali część korelacyjną potencjału E_{xc}). Zaproponowany wzór (3) na człon energii korelacyjno-wymiennej ma postać:

$$E_{xc} = E_{xc}^{LSDA} + a_0(E_x^{HF} - E_x^{LSDA}) + a_x E_x^{B88} + a_c E_c^{LYP} \quad (3)$$

gdzie E_{xc} – energia korelacyjno-wymienna; E_{xc}^{LSDA} - energia korelacyjno-wymienna LSDA; $a_0(E_x^{HF} - E_x^{LSDA})$ - a_0 -procentowa różnica między energią Hartree-Focka i energią wymienną LSDA; $a_x E_x^{B88}$ - a_x -procentowa energia wymienną Beckego z poprawkami gradientowymi, $a_c E_c^{LYP}$ - a_c -procentowy człon korelacyjny Lee-Younga-Parr'a; parametry a_0 , a_x oraz a_c zostały dostosowane eksperymentalnie [85].

Liczbowo udział poszczególnych wkładów w potencjale korelacyjno-wymiennym ma się następująco: energia korelacyjno-wymienna LSDA, 20% różnicy między energią wymienną HF i energią wymienną LSDA, 72% energii Becke'a z poprawkami gradientowymi z 1988 r., 81% członu korelacyjnego Lee-Yang-Parr'a. Potencjał ten jest dobrym wyborem do obliczeń dla większości układów, szczególnie w przypadku cząsteczek organicznych. Dodatkowo jest bardzo często stosowany, czego skutkiem jest dostatnia liczba publikacji z wynikami otrzymanymi z jego wykorzystaniem, a co za tym idzie dostępność danych do porównań [83, 84].

Kolejnymi, równie często stosowanymi, funkcjonalami hybrydowymi są opracowany przez zespół Prof. Truhlara na Uniwersytecie Minnesota należące do rodziny „M”, np. M06 czy M06-2X. Są to tzw. funkcjonały meta-hybrydowe, ponieważ opierają się na przybliżeniu meta-GGA uwzględniającego drugą pochodną gęstości elektronowej. Potencjał korelacyjno-wymienny M06 zawiera 27% energii wymiennej Hartree-Focka, a M06-2X 54%. Autorzy rekomendują stosowanie tych metody dla niemetali, głównie do obliczeń termodynamicznych pierwiastków grup głównych, kinetyki oraz oddziaływań niekowalencyjnych [86–88].

2.2 Bazy funkcyjne

Rozpoczynając obliczenia metodami chemii teoretycznej należy, poza funkcjonalem, wybrać także odpowiednią bazę funkcyjną. Baza funkcyjna to zestaw pojedynczych funkcji (zwanymi funkcjami bazowymi), które są łączone w kombinacje liniowe w celu opisania orbitali molekularnych. Opisują one gęstość elektronową wokół atomów i tworzy się z nich funkcję falową, której minimalizacja jest podstawą obliczeń. Dla wygody funkcje te są zwykle orbitalami atomowymi skupionymi na atomach, a baza funkcyjna stanowi orbital molekularny. Przedstawienie orbitalu molekularny w ten sposób stanowi przybliżenie algebraiczne i umożliwia zastąpienie układu wielu sprzężonych równań różniczkowo-całkowych układem równań algebraicznych, którego rozwiązanie jest możliwe i zdecydowanie mniej kosztowne obliczeniowo. Korzystamy tutaj z przybliżenia metody kombinacji liniowej orbitali atomowych (ang. *Linear Combination of Atomic Orbitals* MO, LCAO-MO), które zakłada, że nieznane orbitale molekularne φ_i (MO) są kombinacją liniową pewnych znanych funkcji scentrowanych na atomach (AO) zgodnie z zależnością (4):

$$\varphi_i = \sum_{p=1}^M c_{pi} \chi_p \quad (4)$$

gdzie c_{pi} - poszukiwane współczynniki rozwinięcia (liczby), χ_p - znane funkcje bazy (np. funkcje Gaussa).

Im większy będzie rozmiar bazy (we wzorze „M”) tym lepsza jakość przybliżenia (możliwość znalezienia bardziej dokładnego rozwiązania), ale także wzroście koszt obliczeniowy. Obecnie obliczenia chemii kwantowej są zwykle wykonywane przy użyciu skończonego zestawu funkcji bazowych.

Wyróżnia się dwa rodzaje baz funkcyjnych: tzw. orbitale slaterowskie (ang. *Slater Type Orbitals*, STO) oraz tzw. orbitale gaussowskie (ang. *Gaussian Type Orbitals*,

GTO) [83]. Te pierwsze są podobne do orbitali atomu wodoru i wiarygodnie opisują elektrony w cząsteczce H_2 , a ich główną zaletą jest ich zanikanie w sposób wykładniczy ze zwiększaniem się odległości od jądra atomowego. Problem stanowi natomiast konieczność czasochłonnego i zawilego obliczania całek wielordzeniowych, co spowodowało rezygnację ze stosowania STO w większości programach obliczeniowych. Powszechnie stosowane są drugie wymienione, orbitale typu gaussowskiego, ze względu na znacznie krótszy czas obliczeń [82, 83]. W tym przypadku obliczenia prowadzą do całek dwuelektronowych, które są łatwiejsze do obliczenia niż całki wielordzeniowe STO. Wadą jest ich niższa dokładność, ponieważ nie odtwarzają w pełni poprawnie funkcji falowej opisującej jądro atomowe a także duże odległości od jądra, czemu jednak da się zaradzić stosując tzw. orbitale skonstruktowane, czyli kombinację liniową funkcji typu Gaussa [82, 83]. Dlatego właśnie one są najczęściej używaną grupą funkcji.

W tworzeniu większości wiązań cząsteczkowych uczestniczą głównie elektrony walencyjne, zatem właściwości pierwiastków i związków chemicznych określane są przez ich elektrony walencyjne. Warto więc rozdzielić sposób prowadzenia obliczeń dla elektronów walencyjnych i rdzenia. W tym celu wykorzystuje się tzw. rozszerzone bazy funkcyjne typu *split-valence*, które przedstawiają orbitale walencyjne przez więcej niż jedną funkcję bazową (z których każda może składać się z ustalonej kombinacji liniowej prymitywnych funkcji Gaussa). Ich konstrukcja polega na dobraniu bazy minimalnej dla rdzenia, a większej dla elektronów walencyjnych (która zawierającą kilka funkcji opisujących jeden orbital). Pozwala to na uzyskanie lepszych wyników przy stosunkowo niskich kosztach obliczeń.

Najczęściej stosowanymi bazami typu *split-valence* są bazy Pople'a, które można ogólnie opisać wzorem $k-nlmG$, gdzie k oznacza liczbę funkcji prymitywnych użytych do opisu orbitali rdzenia, n oznacza liczbę funkcji (kontrakcji), które składają się na każdy orbital walencyjny (n -dwie funkcje, n -trzy funkcje), a G oznacza, że użyto funkcji Gaussa. Pojedynczo n , l , m określają liczbę funkcji prymitywnych użytych do opisu kolejnych kontrakcji. Przykładem bazy Pople'a jest baza funkcyjna 6-311G, w której użyto jednej kontrakcji, składającej się z sześciu funkcji Gaussa („6”-311G) do opisu orbitali rdzenia, a każdy z orbitali walencyjnych został opisany trzema kontrakcjami (n lm) składającymi się kolejno z trzech, jednego i jednego prymitywu (6-„311”G) [89, 90].

Na kolejnym poziomie wybierania bazy funkcyjnej mogą być dodawane dodatkowe funkcje opisujące polaryzację gęstości elektronowej atomu w cząsteczkach. Są to tak zwane funkcje polaryzacyjne. Zwiększa to elastyczność zestawu bazowego, skutecznie pozwalając orbitalom molekularnym z udziałem atomu wodoru na opis bardziej asymetrycznego położenia względem jądra. Jest to bardzo ważne przy badaniach związków chemicznych, ze względu na obecność w układzie wiązań spolaryzowanych. Zastosowanie tej funkcji oznacza się znakiem „*”, np. baza 6-311+G**. Jedna „*” oznacza dodanie funkcji polaryzacji dla atomów ciężkich, natomiast dwie „**” na atomach ciężkich i wodoru [89, 90]. Inną dodatkową funkcją dodanie opisu dyfuzji (rozproszenia). Jest to rozszerzenie funkcji bazowych Gaussa, które zapewnia elastyczność „ogonowej” części orbitali atomowych, położonych daleko od jądra. Funkcje te są ważne jeśli w badanym układzie są obecne wolne pary elektronowe, zwłaszcza aniony bądź układ będący dipolem elektrycznym czy posiadający układ sprzężonych wiązań wielokrotnych, a także są one istotne dla dokładniejszego modelowania wiązań wewnątrz- i międzycząsteczkowych w układzie. W zapisie stosowanej bazy funkcyjnej oznacza się znakiem „+”, np. baza 6-311+G. Jeden „+” oznacza dodanie funkcji dyfuzji na ciężkich atomach, natomiast dwa „++” na atomach ciężkich i na atomach wodoru [89, 90].

2.3 Modele rozpuszczalników stosowanych w badaniach *in silico*

Badania właściwości związków w roztworze, takie jak właściwości kwasowo-zasadowe czy lipofilowość, wymagają uwzględnienia wpływu obecności rozpuszczalnika. Modele rozpuszczalnikowe umożliwiają symulacje i obliczenia termodynamiczne charakteryzujące reakcje i procesy zachodzące w roztworach zarówno biologiczne, chemiczne jak i środowiskowe. W metodach obliczeniowych możemy zastosować dwa podejścia: modele jawne (*explicite*) i niejawne (*implicite*). Pierwsze z nich polega na umieszczeniu w badanym układzie cząsteczek rozpuszczalnika, które otaczają substancję rozpuszczoną. Jest to intuicyjnie najbardziej realistyczny obraz, w którym występują bezpośrednie, specyficzne oddziaływania rozpuszczalnika z substancją. Modele te na ogół stosuje się w symulacjach mechaniki (MM) i dynamiki (MD) molekularnej lub Monte Carlo (MC). Ich wadą jest brak szczegółowej wiedzy na temat liczby cząsteczek rozpuszczalnika, które powinny zostać uwzględnione w obliczeniach. Rozwiązaniem mogłoby być prowadzenie symulacji z ich coraz większą liczbą, aż wybrana właściwość układu pozostanie stała, jednak jest to czasochłonne i kosztowne obliczeniowo. Dlatego też znacznie częściej stosuje się modele ciągłe, które

zakładają, że cząstka substancji rozpuszczonej umieszczona jest w odpowiednio ukształtowanej wnęce w medium charakteryzowanym głównie przez względną przenikalność elektryczną. Taki układ stabilizują oddziaływania dyspersyjne pomiędzy rozpuszczalnikiem a substancją. Modele niejawne mogą różnić się kształtem i rozmiarem wnęki, sposobem uwzględniania wkładów dyspersyjnych i rozkładu ładunków cząstkowych w substancji rozpuszczonej, metodą opisu właściwości substancji rozpuszczonej czy też medium. Modele te są na ogół wydajne obliczeniowo i dostarczają rozsądnego opisu zachowania rozpuszczalnika. Ich wadą jest brak uwzględniania lokalnych fluktuacji gęstości rozpuszczalnika wokół cząsteczki substancji rozpuszczonej, co wynika z uporządkowania rozpuszczalnika wokół substancji rozpuszczonej i jest szczególnie istotne, gdy rozważa się wodę jako rozpuszczalnik. Innym podejściem jest użycie modelu dyskretnego tylko do opisu pierwszej powłoki solwatacyjnej, a do opisu pozostałych modelu ciągłego [91].

Efekty rozpuszczalnikowe (efekty bliskiego zasięgu dotyczące pierwszej powłoki solwatacyjnej: wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa oraz efekty dalekiego zasięgu związane z polarnością rozpuszczalnika), w sposób ilościowy, opisuje wartość entalpii swobodnej solwatacji, czyli podczas przeniesienia cząstki z fazy gazowej do roztworu w danej temperaturze o stałym stężeniu 1 mol/dm³. Entalpię swobodną solwatacji przedstawia zależność (5):

$$G = G_{cav} + G_{el} + G_{disp} \quad (5)$$

gdzie G_{cav} wynika z tworzenia wnęki (energia zużyta na zbudowanie wnęki w rozpuszczalniku o odpowiedniej wielkości i kształcie, aby pomieścić substancję rozpuszczoną); G_{el} - energia elektrostatyczna (wynika z polaryzacji substancji rozpuszczonej i rozpuszczalnika, związana z oddziaływaniem elektrostatycznym pomiędzy nimi); G_{disp} - przybliżenie oddziaływania dyspersyjnego [92, 93].

2.3.1 Model PCM

Jednym z częściej stosowanych modeli rozpuszczalnikowych jest model PCM (ang. *Polarizable Continuum Model*), zaimplementowany w wielu pakietach obliczeniowych. Należy do modeli ciągłych, opisali go S. Miertuš, E. Scrocco i J. Tomasi [94] po raz pierwszy w 1981 roku. Zakłada on, że rozpuszczalnik tworzy wnękę, a cząsteczka substancji rozpuszczonej umieszczana jest wewnątrz niej. Wnęka zbudowana jest przez zachodzące na siebie scentrowane na poszczególnych atomach lub

grupach atomów sfery, której promień jest proporcjonalny do promieni van der Waalsa atomów, a współczynnik proporcjonalności dobierany jest na podstawie danych eksperymentalnych [93, 94]. Rozpuszczalnik w metodzie PCM jest izotropowym medium o pewnej wartości stałej przenikalności dielektrycznej ϵ . We wnętrzu wnęki wartość $\epsilon = 1$ i jest identyczna jak w próżni, natomiast na zewnątrz przyjmuje wartość charakterystyczną dla danego rozpuszczalnika, np. dla wody wynosi 78,3553. W podejściu PCM proces solwatacji dzielony jest na trzy etapy: (i) utworzenie wnęki; (ii) umieszczenie we wnęcie cząsteczki substancji rozpuszczonej oraz (iii) wygenerowanie rozkładu ładunków. Energii swobodnej Gibbsa cząsteczki w badanym rozpuszczalniku definiowana jest jako praca potrzebna do wykonania trzech etapów procesu solwatacji a jej wartość wyliczana jest na podstawie równania (5).

2.3.2 Model SMD

Innym równie popularnym ciągłym modelem rozpuszczalnikowym jest metoda SMD (ang. *Solvation Model based on Density*). „D” w nazwie modelu oznacza „gęstość”, co odnosi się do wykorzystywanej w tej metodzie gęstości elektronowej substancji rozpuszczonej bez definiowania cząstkowych ładunków atomowych. Jest to uniwersalny model solwatacyjny, co oznacza, że można stosować go do dowolnie naładowanej lub nienaładowanej substancji rozpuszczonej w wybranym rozpuszczalniku lub ośrodku ciekłym, dla których znanych jest kilka kluczowych deskryptorów (w szczególności stała dielektryczna, współczynnik załamania światła, napięcie powierzchniowe i właściwości kwasowo-zasadowe). W modelu SMD dzieli się wyznaczoną energię swobodną solwatacji na dwa składniki. Pierwszy wkład związany jest z oddziaływaniami elektrostatycznymi i wynika z samouzgodnionego pola reakcji, które obejmuje rozwiązanie równania Poissona dla elektrostatyki z równaniem całkowym i formalizmem IEF-PCM. Obejmuje on potencjał elektryczny, relaksację jądrową i polaryzację rozpuszczalnika. Drugi składnik odnosi się do oddziaływań nieelektrostatycznych i wynika z krótko zasięgowych oddziaływań między cząsteczkami substancji rozpuszczonej i rozpuszczalnika w pierwszej powłoce solwatacyjnej. Obejmuje tworzenie się wnęki, oddziaływania dyspersyjne i zmiany w strukturze rozpuszczalnika [95].

2.4 Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne stanowi ważną metodę wykorzystywaną w procesie tworzenia leków. Dostępność dużej mocy sprzętu komputerowego oraz stale rosnąca liczba i łatwość dostępu do struktur drobnocząsteczkowych i białkowych przyczyniły się do rozwoju ulepszonych metod, dzięki czemu dokowanie stało się bardziej popularne zarówno w środowisku przemysłowym, jak i naukowym. Z biegiem lat zmienił się jednak sposób, w jaki dokowanie jest wykorzystywane, początkowo było podstawową metodą, dzisiaj wspomaga metody eksperymentalne jako wstępna analiza potencjału do oddziaływania struktur organizmów żywych z badanym lekiem [96].

Dokowanie molekularne zostało po raz pierwszy opisano w 1982 roku [97] i od tego czasu stało się główną ideą w badaniach wstępnych opartych na strukturze. Procedura polega na poszukiwaniu minimum globalnego pola siłowego wyznaczonego dla kompleksu ligand-receptor i składa się z dwóch głównych zadań, do których wykorzystywane są oddzielne algorytmy. Najpierw algorytm przeszukiwania przewiduje wszelkie możliwe konfiguracje przestrzenne, zwane założeniami, które ligand może przyjąć w obrębie kieszeni wiążącej lub aktywnej. Następnie funkcja oceniająca wyznacza energie wiązania między ligandem a receptorem dla każdej przewidywanej konfiguracji. Wygenerowane układy ligand-receptor zostają następnie uszeregowane w oparciu o ich energie wiązania, przy czym konfiguracja znajdująca się najwyżej w rankingu powinna odpowiadać rzeczywistemu oddziaływaniu liganda [98].

Stosowanie wyłącznie metody dokowania molekularnego jest jednak obarczone błędami [99]. Statyczna natura receptora jest główną wadą, w której nie uwzględnia się rzeczywistej dynamicznej natury struktur biologicznych, które najczęściej badane są w charakterze receptorów. Ograniczenia algorytmów przeszukiwania i niedoskonałości funkcji oceniających prowadzą również do generowania zarówno wyników fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych [100–103] oraz często wymagają użycia różnych algorytmów prowadząc do tego, że dokładność wyników jest silnie zależna od celu molekularnego [104].

Ważnym etapem jest znalezienie struktury receptora, a następnie jego poprawne opracowanie, tak aby nie było w niej żadnych atomów wodoru, wiązań czy łańcuchów bocznych. Inne, bardziej skomplikowane procedury przygotowania receptora obejmują dokładne przewidywanie miejsc protonowania i identyfikowanie, które cząsteczki wody i czy w ogóle powinny pozostać w strukturze receptora. Wszystkie te procedury

umożliwiają zachowanie maksymalnie realnej struktury modelowanego układu biologicznego, co prowadzi do uzyskania bardziej poprawnych wyników.

Algorytmy przeszukiwania wielowymiarowej przestrzeni konformacyjnej to najczęściej algorytmy heurystyczne i stochastyczne. Obie grupy próbują przestrzeń konformacyjną w sposób losowy (inaczej niż deterministyczne i systematyczne). Proponują one przybliżone rozwiązanie zadanego problemu, które niekoniecznie będzie rozwiązaniem globalnym i tym samym optymalnym. Przykładowym algorytmem przeszukiwania jest hybrydowy algorytm genetyczny Lamarckiana (LGA) zastosowany w komercyjnie dostępnym programie AutoDock 4.2 [105].

Wielkość przestrzeni konformacyjnej, a więc ilość wszystkich możliwych stanów, jakie może przyjąć układ ligand-receptor wzrasta wykładniczo z liczbą wymiarów i liczbą stopni swobody układu: liganda i receptora (D). Jeśli przyjąć identyczny stopień skomplikowania obydwu (N dla każdego ze zmiennych stanu), to wielkość przestrzeni konformacyjnej będzie równa N^D . Zmiennymi stanu mogą być: translacja, orientacja i konformacja liganda, swobodne wiązanie z możliwością rotacji obecne w strukturze liganda. Pełna swoboda konformacyjna receptora powoduje znaczący wzrost wielkości przestrzeni konformacyjnej ze względu na wielkość jego cząsteczki. Aby zmniejszyć koszt obliczeniowy ogranicza się pełną swobodę do cząsteczki liganda w dokowaniu lub liganda i kilku wybranych reszt aminokwasowych w receptorze (w przypadku białek).

Algorytmy genetyczne (GA) wykorzystują idee oparte na języku genetyki naturalnej i ewolucji biologicznej. W przypadku dokowania molekularnego szczególnie układ ligand-receptor jest zdefiniowany przez zmienne stanu N , a w GA każda z nich odpowiada genowi. Stan liganda odpowiada genotypowi, natomiast jego współrzędne atomowe odpowiadają fenotypowi. W dokowaniu molekularnym dopasowanie jest całkowitą energią oddziaływania liganda z receptorem i jest oceniane za pomocą funkcji energii. Przypadkowe pary osobników łączy się w pary przy użyciu procesu krzyżowania, w którym nowe osobniki dziedziczą geny od któregośkolwiek z rodziców. Ponadto niektóre potomstwo przechodzi losową mutację, w której jeden gen losowo jest zmieniany. Selekcja potomstwa z obecnego pokolenia odbywa się na podstawie przystosowania osobnika: rozmnażają się więc rozwiązania, które są lepiej dopasowane do środowiska (minimum energii), a słabiej dopasowane umierają [105].

Funkcje oceniające opierają się na wyrażeniach fizycznych mechaniki molekularnej lub wyrażeniach empirycznych. Funkcje empiryczne najczęściej wykorzystują algorytmy geometrycznego dopasowania liganda do receptora. Atomistyczna funkcja oceniająca

konfiguracje układu ligand-receptor powinna możliwie jak najdokładniej przewidywać energię swobodną tworzenia układu ligand-receptor. Funkcja energii swobodnej uwzględnia stany układu termodynamicznego i opisuje ją zależność (6):

$$\Delta G = V_w^L - V_{nw}^L + V_w^B - V_{nw}^B + V_w^{BL} - V_{nw}^{BL} + \Delta S \quad (6)$$

gdzie ΔG – energia swobodna Gibbsa, L - ligand, B - białko, V - energia potencjalna (w – związane, nw – niezwiązane), ΔS - zmiana entropii.

Natomiast dla układu z ograniczoną liczbą stopni swobody (tylko do liganda) semiempiryczne wyrażenie na energię swobodną wiązania uzyskaną z pola siłowego zaimplementowanego w programie AutoDock ma postać (7):

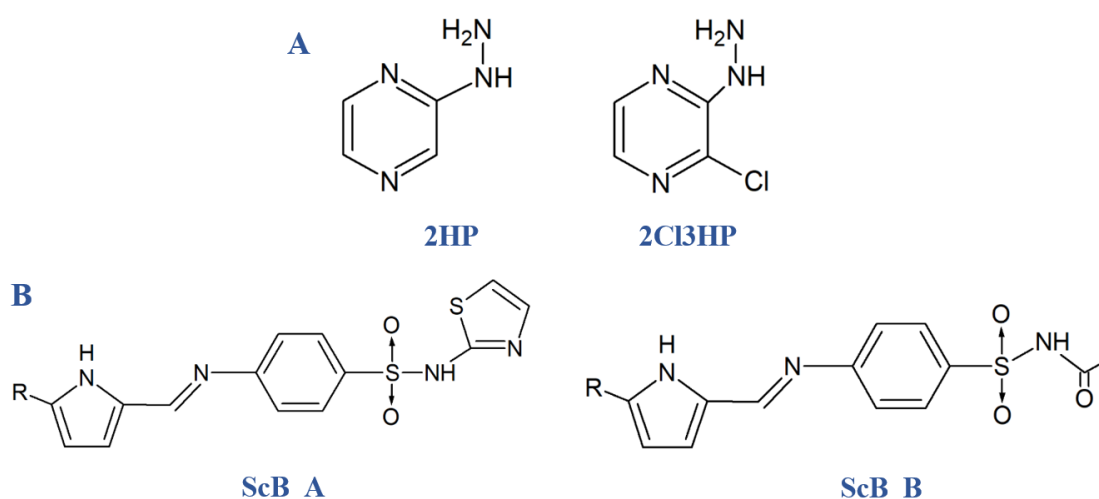
$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{hbond} \right) + \\ & + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} \sum_{i,c,j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (7) \end{aligned}$$

gdzie: ΔG_{vdw} - fizyczne wyrażenie na potencjał Lenarda-Jonesa; ΔG_{hbond} - fizyczne wyrażenie na potencjał tworzenia ukierunkowanych wiązań wodorowych; ΔG_{elec} - fizyczne wyrażenie na potencjał Coulomba; ΔG_{tor} - empiryczne wyrażenie na zmianę entropii tworzenia kompleksu ligand-receptor (N_{tor} to liczba stopni swobody liganda); ΔG_{solv} - empiryczne wyrażenie na potencjał desolvatacji. Sumowanie odbywa się na wszystkich parach składających się tylko z atomów węgla w ligandzie (i) oraz atomów wszystkich typów w białku (j) [105, 106].

3. Cel badań

Heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA) są łatwo metabolizowane enzymatycznie w organizmie prowadząc do powstawania reaktywnych form zdolnych do wiązania DNA. Takie addukty mogą być odpowiedzialne za mutagenność tych związków. Zwiększone ilości HCA dostają się do organizmu w skutek spożycia żywności poddanej obróbce termicznej, co z kolei zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworu. Zasadnym jest poszukiwanie takich pochodnych HCA, które zmodyfikowane podstawnikiem lub grupą funkcyjną będą trwalsze i w istotny sposób przyczynią się do zmniejszenia ich powinowactwa względem DNA by zminimalizować potencjalne ryzyko związanego z ewentualną ich genotoksycznością.

Głównym celem moich badań było wyznaczenie *in silico* parametrów fizykochemicznych czterech, wybranych HCA należących do pochodnych o szkielecie: a) pirazyny (**Rysunek 12A** poniżej) oraz b) anilinosulfonamidowym (**Rysunek 12B**) charakteryzujących ich potencjalną aktywność biologiczną.



Rysunek 12. A. 2HP oraz 2Cl3HP; B. ScB_A (ScB_STZ) oraz ScB_B (ScB_SAM).

Do określenia powyższych parametrów obiektów badawczych (zarówno komercyjnych jak i tych zsyntezowanych), które po raz pierwszy zostały opisane w niniejszej pracy, wykorzystane zostały metody teoretyczne, a do zadań obliczeniowych należało między innymi:

- I. ustalenie najniżej energetycznych izomerycznych form konformacyjnych i tautomerycznych (z uwzględnieniem prototropii) za pomocą metod DFT oraz porównanie środowiska izomeryzacji (*in vacuo* i w modelu rozpuszczalnikowym);

- II. określenie przerwy energetycznej orbitali HOMO-LUMO obiektów badawczych w celu ustalenia wpływu podstawnika na ich trwałość;
- III. wyznaczenie form jonowych dla wszystkich badanych związków w fazie gazowej w celu ustalenia pełnej ścieżki deprotonowania obiektów badawczych;
- IV. ustalenie wartości stałych deprotonowania (pK_a) w oparciu o zaproponowaną ścieżkę;
- V. weryfikacja możliwości przenikania badanych związków do wnętrza komórek organizmu poprzez określenie ich lipofilowości ($\log P$);
- VI. zbadanie możliwości oddziaływania z DNA stanowiącego potencjalny cel molekularny badanych układów.

4. Metodyka badań własnych

Analiza strukturalna

Wszystkie obliczenia chemii kwantowej zostały wykonane przy użyciu pakietu obliczeniowego Gaussian09 [107]. Obliczenia umożliwiające analizę izomerii konformacyjnej i tautomerii pochodnych pirazyny przeprowadzono w fazie gazowej metodą DFT z funkcjonałem B3LYP (trzech parametrów Beckego Lee–Yang–Parr) [94] oraz bazą funkcyjną typu split-valence 6-311+G**. Dla pochodnych sulfonamidowych wykonano obliczenia na poziomie M06/6-311++G(2d,2p) [86] ze względu na kontynuację badań trwających w Katedrze Chemii Bionieorganicznej i późniejszą możliwość porównania wyników uzyskanych w zespole dla innych modyfikowanych związków na bazie sulfonamidów. Geometrie zostały w pełni zoptymalizowane i dla nich wyznaczono całkowite swobodne energie Gibbsa układów. Analizę procesu przeniesienia protonu przeprowadzono za pomocą procedury IRC i metody B3LYP/6-311+G** *in vacuo*. Częstości drgań zostały również obliczone z wykorzystaniem tej samej metody i na ich podstawie wygenerowano widma oscylacyjne (IR) związków. Widmo absorpcji elektronowej (UV-Vis) zoptymalizowanych struktur obliczono stosując zależną od czasu teorię funkcji gęstości (TD-DFT) na poziomie B3LYP/6-311+G**. Dodatkowo na podstawie obliczonych wartości energii orbitali HOMO i LUMO (E_{HOMO} , E_{LUMO}) wyznaczone zostały dodatkowe parametry, takie jak energia jonizacji (EI), powinowactwo elektronowe (EA), twardość (η), miękkość (σ) oraz potencjał chemiczny (μ). Wartości wymienionych parametrów wyliczono na podstawie zależności (8-12) [108,109]:

$$EI = -E_{HOMO} \quad (8)$$

$$EA = -E_{LUMO} \quad (9)$$

$$\eta = \frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2} = \frac{EI - EA}{2} \quad (10)$$

$$\sigma = \frac{1}{\eta} = \frac{2}{EI - EA} \quad (11)$$

$$\mu = \frac{E_{HOMO} - E_{LUMO}}{2} = -\frac{EI + EA}{2} \quad (12)$$

Właściwości kwasowo-zasadowe

Właściwości kwasowo-zasadowe zostały opisane na podstawie obliczeń wykonanych w modelu wody. Geometrie wszystkich proponowanych form jonowych 2HP oraz CIHP zostały zoptymalizowane w fazie gazowej za pomocą metod B3LYP i M-062X oraz bazy funkcyjnej 6-311+G**. Geometrie struktur zoptymalizowanych w fazie gazowej zostały dodatkowo zoptymalizowane przy użyciu modeli rozpuszczalnika PCM [93, 94] na poziomie B3LYP/6-311+G** oraz SMD [95] na poziomie M06-2X/6-311+G**. Obie metody traktują rozpuszczalnik jako polaryzowalne medium opisywane stałą dielektryczną. Dla pochodnych sulfonamidowych wykonano analogiczne obliczenia na poziomie M06/6-311++G(2d,2p) i w modelu rozpuszczalnikowym SMD.

Wartości pK_a wyznaczono na podstawie cyklu termodynamicznego zaproponowanego przez J.A. Keith'a i E.A. Carter [110], korzystając z zależności (13) energii swobodnej Gibbsa od stałej kwasowości:

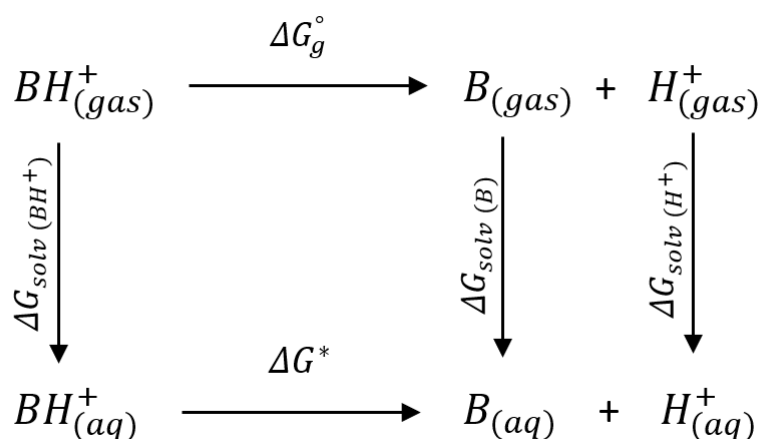
$$\Delta G^* = -RT \ln K_a \quad (13)$$

gdzie: ΔG^* - zmiana energii swobodnej Gibbsa, R – stała gazowa, T – temperatura, K_a – stała kwasowości.

Po przekształceniu równanie (14) przyjmuje postać:

$$pK_a = \frac{\Delta G^*}{2,303RT} \quad (14)$$

Wartość zmiany energii swobodnej Gibbsa (ΔG^*), w powyższym równaniu (14), oblicza się z zależności opisanych cyklem termodynamicznym przedstawionym na **Schemacie 2**:



Schemat 2. Cykl termodynamiczny zaproponowany przez J.A. Keith'a i E.A. Carter [56,110] wykorzystywany do wyznaczania wartości pK_a .

Niezbędna do wyznaczenia wartości pKa, zgodnie z Równaniem 14, zmiana energii swobodnej Gibbsa w roztworze (ΔG^*) jest sumą zmian energii swobodnych Gibbsa: w fazie gazowej i solwatacji, zgodnie z poniższą zależnością:

$$\Delta G^* = \Delta G_g^\circ + \Delta \Delta G_{solv} \quad (15)$$

gdzie: ΔG^* - zmiana energii swobodnej Gibbsa reakcji deprotonowania w roztworze wodnym, ΔG_g° - zmiana energii swobodnej Gibbsa reakcji deprotonowania w fazie gazowej, $\Delta \Delta G_{solv}$ - zmiana energii solwatacji.

Przy czym ΔG_g° i $\Delta \Delta G_{solv}$ oblicza się na podstawie równań:

$$\Delta G_g^\circ = G_{gas(H^+)} + G_{gas(B)} - G_{gas(BH^+)} \quad (16)$$

gdzie: $G_{gas(H^+)}$, $G_{gas(B)}$, $G_{gas(BH^+)}$ to energie swobodne Gibbsa w fazie gazowej kolejno protonu, cząsteczki obojętnej i cząstki sprotonowanej,

oraz

$$\Delta \Delta G_{solv} = \Delta G_{solv(H^+)} + G \Delta_{solv(B)} - \Delta G_{solv(BH^+)} \quad (17)$$

gdzie: $\Delta \Delta G_{solv}$ - zmiana energii solwatacji, $\Delta G_{solv(H^+)}$, $G \Delta_{solv(B)}$, $\Delta G_{solv(BH^+)}$ - zmiany energii swobodnych Gibbsa solwatacji kolejno protonu, cząsteczki obojętnej i cząstki sprotonowanej.

Ponieważ proton (H^+) nie zawiera elektronów, jego energia swobodna Gibbsa nie może zostać wyznaczona za pomocą obliczeń i z tego względu jest ona wyznaczana eksperymentalnie. Na podstawie danych literaturowych przyjęto energię swobodną Gibbsa protonu równą 6,28 kcal/mol w próżni i 265,9 kcal/mol w wodzie oraz zastosowano poprawkę zmiany energii swobodnej Gibbsa wynikającą z konwersji stanów standardowych (1 M na 1 atm), która wynosi 1,89 kcal/mol [56].

Wszystkie obliczenia wykonano w temperaturze 298,15 K i ciśnieniu 1 atm lub w stanie standardowym 1 M odpowiednio w fazie gazowej i w modelu rozpuszczalnika.

Współczynnik podziału (logP)

Współczynnik podziału został wyznaczony w standardowym układzie woda/n-oktanol. Zoptymalizowane geometrie w fazie gazowej neutralnych form związków zostały dodatkowo zoptymalizowane metodami PCM/B3LYP/6-311+G** oraz SMD/M06-2X/6-311+G** w modelu wody i w n-oktanolu.

Otrzymane w wyniku optymalizacji energie swobodne Gibbsa układów, w obydwu rozpuszczalnikach, posłużyły do wyznaczenia wartości $\log P$ na podstawie poniższej zależności (18) [64,111,112]:

$$\log P = \frac{(G_{H_2O} - G_{n-okt}) \cdot 627,5095}{RT \ln 10} \quad (18)$$

gdzie: $\log P$ – współczynnik podziału; G_{H_2O} – energia swobodna Gibbsa obojętnej cząsteczki w wodzie i G_{n-okt} - energia swobodna Gibbsa obojętnej cząsteczki w n-oktanolu.

Wszystkie obliczenia wykonano w temperaturze 298,15 K i ciśnieniu 1 atm lub w stanie standardowym 1 M odpowiednio w fazie gazowej i w modelu rozpuszczalnika.

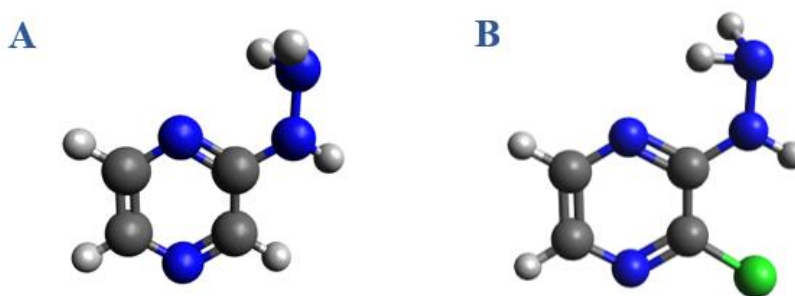
Dokowanie molekularne

Struktury ligandów zbudowano za pomocą programu MOLDEN, a następnie zoptymalizowano w oprogramowaniu Gaussian09 [107]. Wykorzystana w dokowaniu molekularnym struktura fragmentu B-DNA (dodekamer) pobrano z Protein Data Bank. Symulacje dokowania molekularnego przeprowadzono w programie AutoDock 4.2 [113]. Objęły trzy związki: pirazynamid (PZA) jako wzorzec znany w literaturze (oddający poprawność formułowanych twierdzeń), 2-hydrazynopirazynę (2HP) i jej chlorkową pochodną (2Cl3HP). Symulowano ich oddziaływanie z fragmentem B-DNA. Do przeszukania przestrzeni konformacyjnej wokół DNA wykorzystano algorytm zaimplementowany w programie (Lamarckian Genetic Algorithm [105]. W warunkach obliczeń zadeklarowano, że przestrzeń dokowania o wymiarach 26 x 32 x 45 Å³ obejmie cały model B-DNA. W symulacjach dokowania zastosowano następujące parametry: 300 przebiegów algorytmu genetycznego i 27 000 pokoleń w każdym przebiegu, 3 500 000 jako maksymalna liczba ocen energii na przebieg dokowania, 2 stopnie swobody skrętniej i wartość energii sieci zewnętrznej równą 1000. Mapy siatki miały odstępny 0,375 Å, co jest wartością domyślną w programie. Wszystkie pozostałe parametry były ustawieniami domyślnymi. Ligand został początkowo umieszczony w losowym punkcie w zadeklarowanej przestrzeni dokowania, a po symulacji, do dalszej analizy wybrano najbardziej powtarzalne klastry.

5. Wyniki i ich dyskusja

5.1 2-hydrazynopirazyna i jej chlorkowa pochodna

Strukturę badanego związku, 2-hydrazynopirazyny (2HP) oraz jej chlorkowej pochodnej, 2-chloro-3-hydrazynopirazyny (2Cl3HP) przedstawiono na **Rysunku 12**. 2HP stanowi analog strukturalny wspomnianego wcześniej przeciwgruźliczego leku – pirazynamidu (PZA) otrzymany poprzez wymianę podstawnika amidowego na ugrupowanie hydrazynowe w pozycji drugiej pierścienia pirazyny. W przypadku chlorkowej pochodnej pierścień pirazyny dodatkowo posiada podstawnik, w postaci atomu chloru położony w pozycji *orto* względem grupy hydrazynowej.



Rysunek 13. Z optymalizowaną strukturą (A) 2-hydrazynopirazyny i (B) 2-chloro-3-hydrazynopirazyny. Na rysunku kolorem szary zaznaczono atomy węgla, białym wodoru, niebieskim azotu i zielonym chloru.

5.1.1 Analiza strukturalna

2-hydrazynopirazyna (2HP)

Struktura

Cząsteczkę 2-hydrazynopirazyny (2HP) charakteryzuje minimum na hiperpowierzchni energii potencjalnej obrazowane strukturą przedstawioną na **Rysunku 13A** - pierścień pirazyny jest płaski, tak jak i szkielet azotowy podstawnika hydrazynowego, który ponadto leży w tej samej płaszczyźnie co pierścień diazynowy. Minimalna energia swobodna Gibbsa otrzymana z optymalizacji struktury 2HP wynosi - 375,028923 a.u. dla konformera 2HP(A). Długości wiązań, miary kątów oraz wybranych kątów dwuściennych z optymalizowanej struktury (2HP(A)) zostały zestawione w **Tabeli 2**. Wiązania C-C i C-N w aromatycznym pierścieniu pirazyny mają długości w zakresie od 1,319 do 1,418 Å, a wszystkie wiązania z atomami wodoru w zakresie od 1,008 do 1,088 Å. Wiązanie pomiędzy pierścieniem a grupą hydrazynową C2-N7 ma długość 1,379 Å, a odległość pomiędzy atomami azotu podstawnika hydrazynowego N7-N8 wynosi 1,408 Å. Miary kątów pomiędzy wiązaniami w pierścieniu wynoszą od 116,45 do 122,57 stopni. Kąt N1-C2-N7 (pomiędzy pierścieniem pirazyny

a podstawnikiem hydrazynowym) wynosi 118,55 stopni. Zauważalne są nieznaczne odkształcenia w pierścieniu (zwłaszcza kąta N1-C2-C3) względem pirazyny spowodowane obecnością grupy hydrazynowej przyłączonej w drugiej pozycji pierścienia [114].

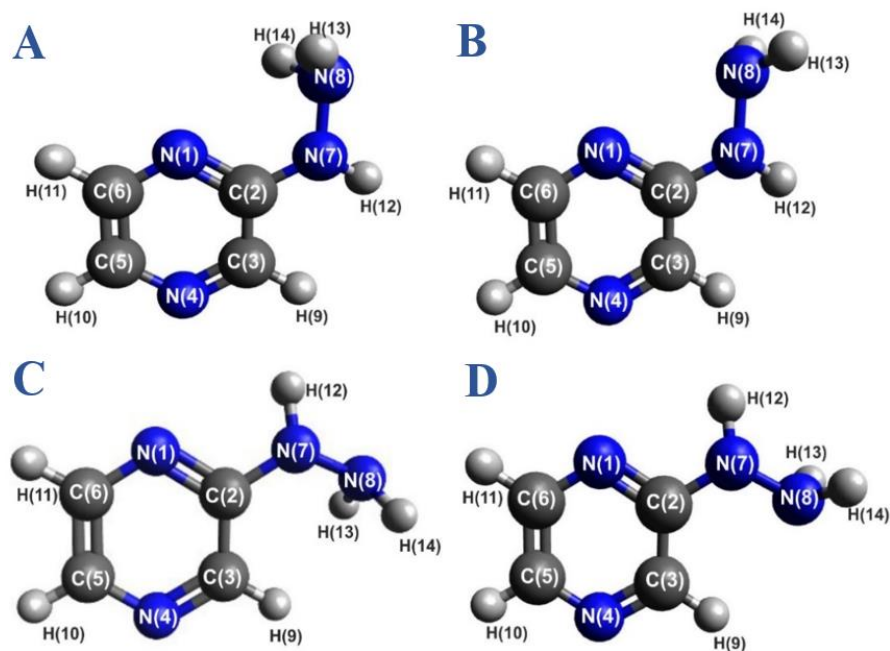
Tabela 2. Długości wiązań, miary kątów oraz wybranych kątów dwuściennych zoptymalizowanej struktury 2-hydrazynopirazyny zgodnie z numeracją przedstawioną na **Rysunku 14**. (G_{2HP} : -375,028923 hartree)

Długość		Kąt			
Atomy	wiązania [Å]	Atomy	Kąt [°]	Atomy	dwuścienny [°]
N1-C2	1,333	N1-C2-C3	121,05	N1-C2-N7-N8	-12,10
C2-C3	1,418	C2-C3-N4	121,75	N1-C2-N7-H12	-160,05
C3-N4	1,319	C3-N4-C5	117,18	C2-N7-N8-N13	79,69
N4-C5	1,346	N4-C5-C6	120,99	C2-N7-N8-H14	-35,50
C5-C6	1,385	C5-C6-N1	122,57		
C6-N1	1,341	C6-N1-C2	116,45		
C2-N7	1,379	N1-C2-N7	118,55		
N7-N8	1,408	C2-N7-N8	122,05		
C3-H9	1,088	C2-N7-H12	117,38		
C5-H10	1,084	N7-N8-H13	108,15		
C6-H11	1,086	N7-N8-H14	109,02		
N7-H12	1,008				
N8-H13	1,016				
N8-H14	1,019				

W wyniku przeszukania hiperpowierzchni energii konformacyjnej znaleziono cztery stabilne energetycznie konformery (oznaczone odpowiednio literami od A do D). Ich zoptymalizowane geometrie z numeracją atomów zostały przedstawione na **Rysunku 14**, a wartości względnych swobodnych energii Gibbsa w kcal/mol zestawiono w **Tabeli 3**. Wyniki obliczeń DFT wskazują, że najniższa energia charakteryzuje konformer 2HP(A), a tym samym można opisać go jako najbardziej stabilny energetycznie i mający największy udział w rzeczywistej strukturze związku.

Tabela 3. Wartości względnych energii swobodnych Gibbsa (ΔG) konformerów 2-hydrazynopirazyny w porównaniu do konformeru 2HP(A) o najniższej energii swobodnej.

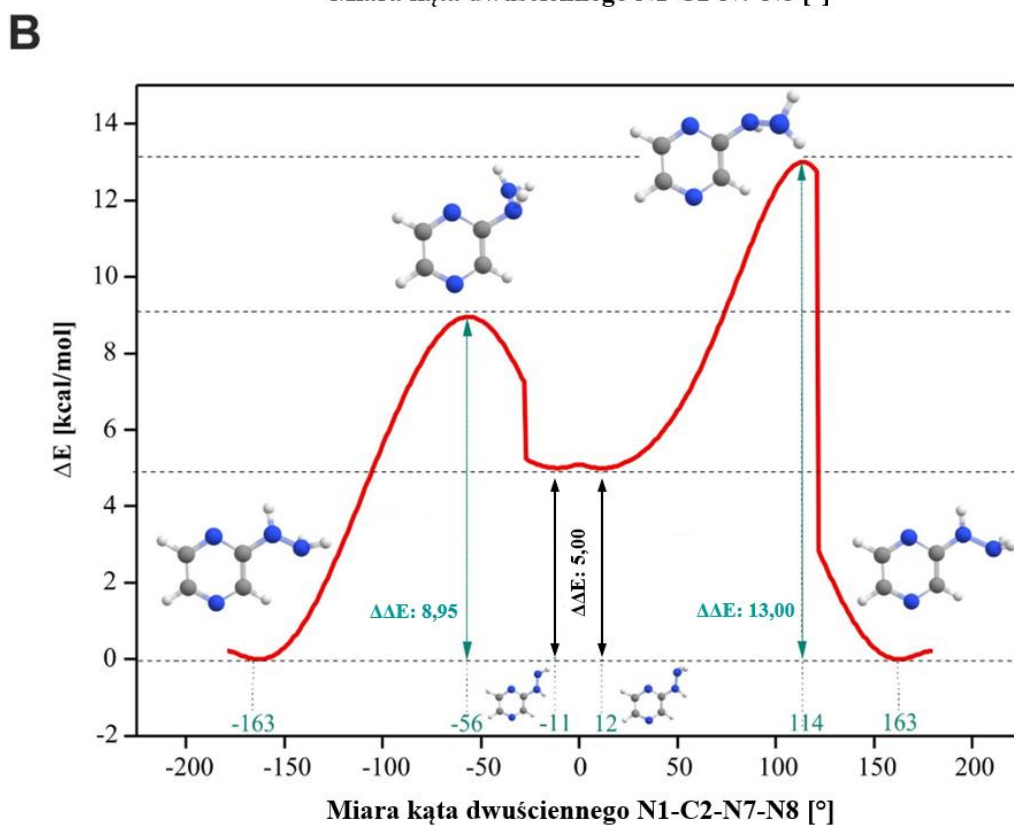
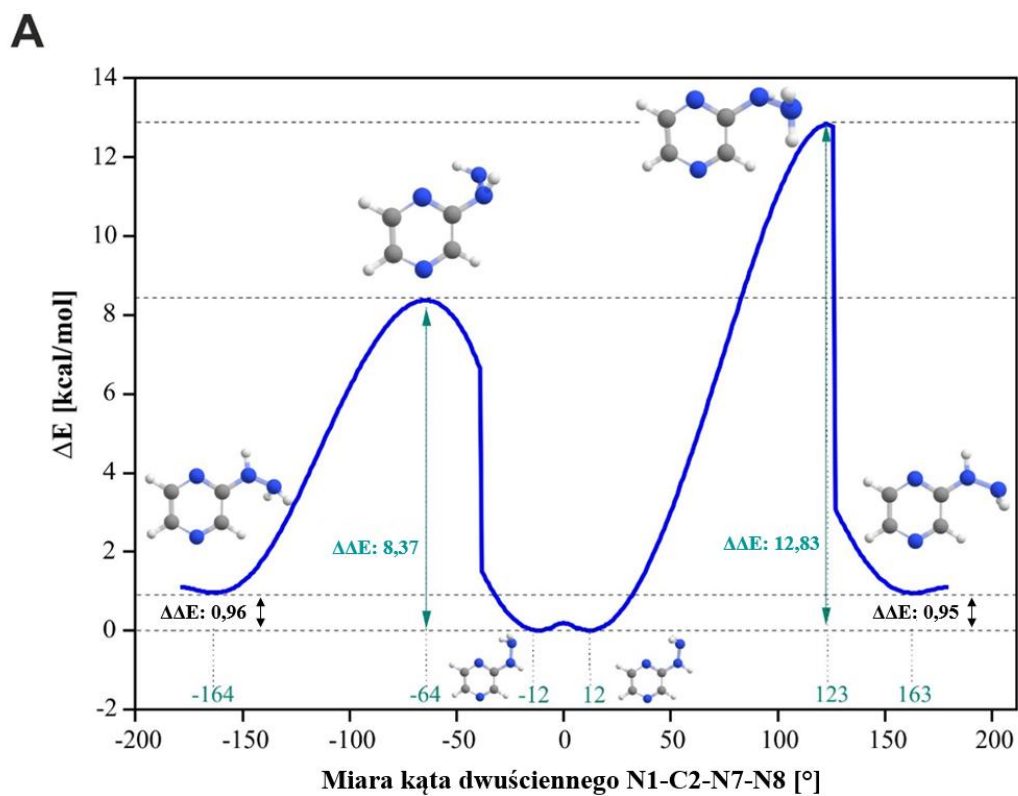
Konformer	ΔG [kcal/mol]
2HP(A)	0,00
2HP(B)	4,98
2HP(C)	1,16
2HP(D)	0,82



Rysunek 14. Zoptymalizowana struktura czterech konformerów 2-hydrazynopirazyny 2HP(A)-2HP(D).

Pierścień pirazyny jest układem płaskim, jest połączony z grupą hydrazynową pojedynczym wiązaniem C2-N7, które jest miejscem możliwej rotacji podstawnika. Konformery 2HP(A) i 2HP(C) otrzymano przez obrót wokół pojedynczego wiązania C2-N7. Przejścia te można zobrazować zmianą miary kąta dwuściennego N1-C2-N7-N8, która wynosi odpowiednio 4 i 171°, w przypadku konformerów 2HP(A) i 2HP(B) oraz 2HP(C) i 2HP(D). Natomiast konformery 2HP(B) i 2HP(D) otrzymano kolejno z 2HP(A) i 2HP(C) poprzez rotację wokół pojedynczego wiązania N7-N8. Struktury konformacyjne zwykle pozostają w stanie równowagi dynamicznej, co oznacza, że ciągle przechodzą w siebie nawzajem, czego dowodzą także niewielkie różnice energii pomiędzy konformerami. W takich układach kilka konformacji (o najniższej energii) jest uprzywilejowana energetycznie i ich udział w rzeczywistej strukturze molekuly jest większy niż w przypadku pozostałych. Różnice energii swobodnej Gibbsa konformerów 2HP (B-D) mieszczą się w granicach 0,82 – 4,98 kcal/mol [w porównaniu z energią swobodną konformeru o najniższej energii 2HP(A)], co wskazuje na ich istotny udział w strukturze 2HP.

Przeprowadzono analizę zmian energii swobodnej podczas rotacji wiązania C2-N7, czyli przejścia konformeru 2HP(A) w 2HP(C) oraz 2HP(B) w 2HP(D). Krzywe obrazujące zależność zmiany wartości energii swobodnej od miary kąta dwuściennego N1-C2-N7-N8 przedstawia **Rysunek 15**.



Rysunek 15. Zależność względnej energii układu od miary kąta dwuściennego N1-C2-N7-N8 w cząsteczce 2-hydrazynopirazyiny podczas przejścia konformeru **A**. 2HP(A) w 2HP(C) i **B**. 2HP(B) w 2HP(D).

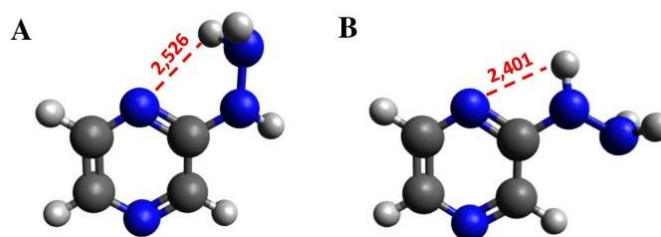
Krzywa została sporządzona w oparciu o serię minimalizacji energii z krokiem całkowania równym 1° , (przy każdej wartości kąta dwuściennego N1-C2-N7-N8 zostały nałożone więzy), a pozostałe stopnie swobody podlegały optymalizacji. Wykres uzyskany podczas przejścia z 2HP(A) w 2HP(C) (**Rysunek 15A**) obrazuje cztery minima odpowiadające kątom dwuściennemu -12° i 12° przy energii jako minimum globalnym, a także -164° i 163° przy energii względnej odpowiednio 0,96 i 0,95 kcal/mol. Różnica energii pomiędzy odpowiednimi parami minimów wynosi 0,95-0,96 kcal/mol, co odpowiada różnicy między energią swobodną konformerów 2HP(A) i 2HP(C). Konformerowi 2HP(A) odpowiada drugie minimum (-12°), natomiast pierwsze (-164°) konformerowi 2HP(C). Maksimum odpowiada miarom kąta dwuściennego -64° i 123° . Bariery energetyczne pomiędzy minimami wynoszą 8,37 i 12,83 kcal/mol.

Przejście konformeru 2HP(B) w 2HP(D) (**Rysunek 15B**) jest jakościowo zbliżone do poprzednio opisanego przejścia 2HP(A) w 2HP(C). Wykres obrazuje cztery minima dla miary kąta dwuściennego -163° i 163° przy wartości energii stanowiącej minimum globalne oraz miar -11° i 12° ze względną energią 5,00 kcal/mol dla obydwu minimów. Różnica energii między minimami jest zbliżona do różnicy energii swobodnej między konformerami 2HP(B) i 2HP(D) (**Tabela 3**). Drugie minimum (-11°) odpowiada konformerowi 2HP(B), a pierwsze (-164°) konformerowi 2HP(D). Maksima odpowiadają kątom dwuściennym -64° i 123° . Bariery energetyczne między minimami wynoszą 8,95 i 13,00 kcal/mol.

Biorąc pod uwagę ogólnie przyjęte kryteria, otrzymane we wszystkich przypadkach bariery są relatywnie nieduże i możliwe do pokonania. Oznacza to, że wszystkie konformery, których udział w strukturze jest znaczny (co potwierdza porównanie ich energii), będą także brały udział w dynamicznych równowagach obejmujących rotację wokół wiązania N7-N8 i ponowną zmianę konformacji.

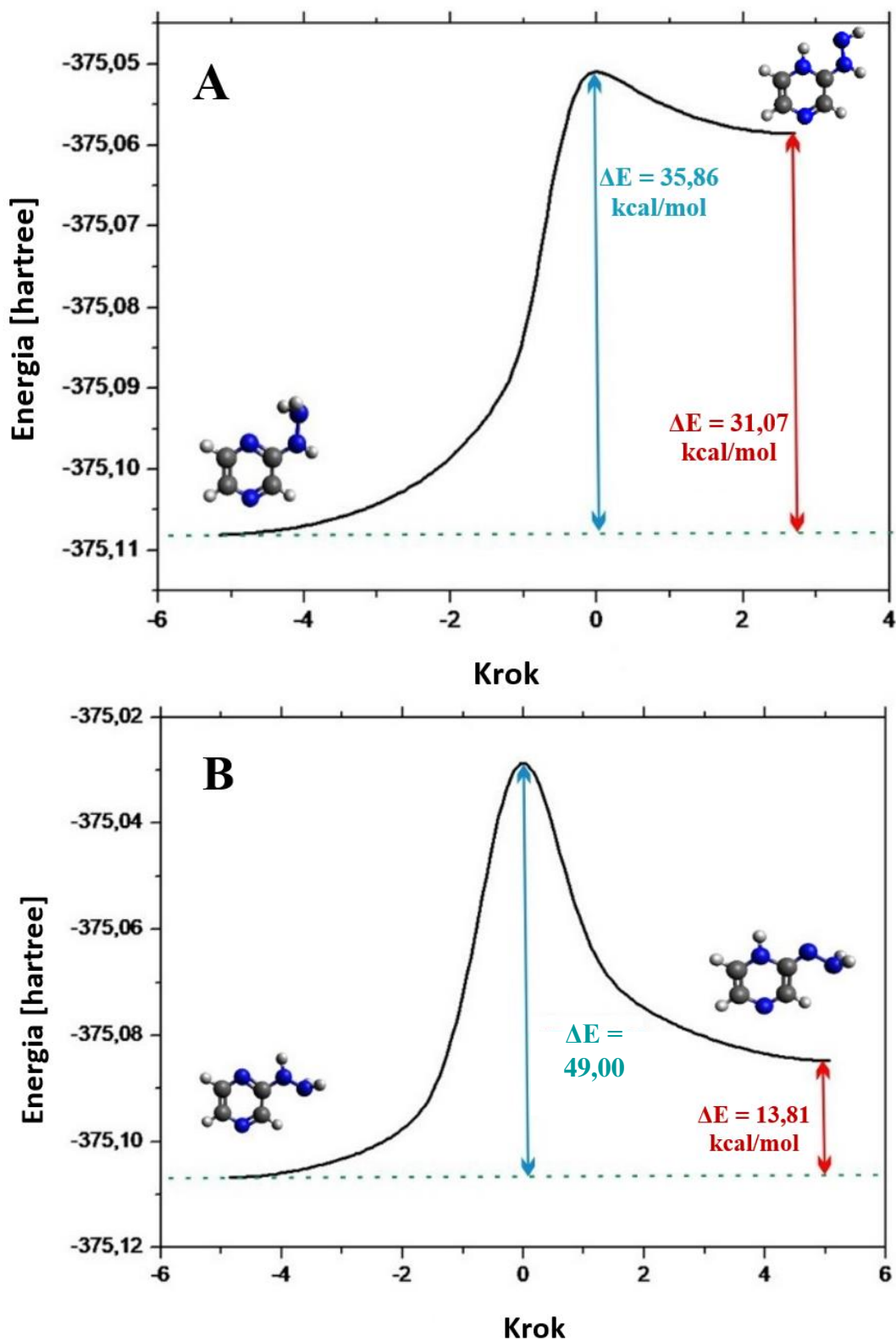
Proces przeniesienia protonu

Ważnym aspektem badań struktury i stabilności energetycznej związku jest możliwość tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Ich obecność zwykle powoduje zwiększenie stabilności układu oraz obniżenie jego energii wewnętrznej. Grupa hydrazynowa 2HP posiada atomy wodoru przy atomach azotu N7 i N8, które mogą być donorami wiązania wodorowego, podczas gdy w pierścieniu pirazyny silnie elektroujemny atom azotu N1 znajdujący się najbliżej podstawnika może pełnić rolę akceptora wiązania wodorowego. Biorąc pod uwagę położenie przestrzenne grupy hydrazynowej i pierścienia pirazyny względem siebie, wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe może tworzyć się w konformerze 2HP(A) pomiędzy atomami N8 - H14...N1 oraz w konformerach 2HP(C) i 2HP(D) pomiędzy atomami N7 - H12...N1. Proponowane wiązania wraz z ich długościami przedstawia **Rysunek 16**.



Rysunek 16. Wiązania wodorowe możliwe do utworzenia w cząsteczce 2-hydrazynopirazyny: **A**. w konformercie 2HP(A) i **B**. w konformercie 2HP(D).

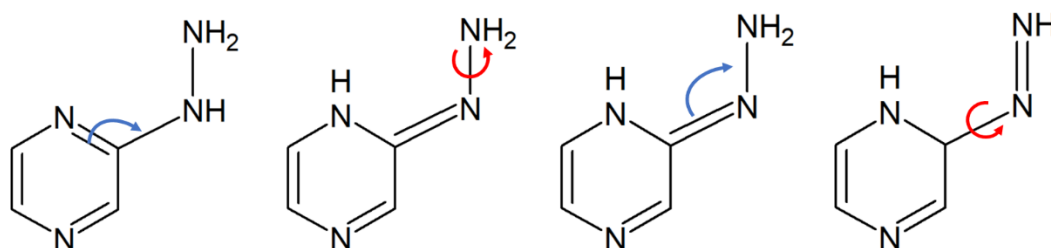
W związku z powyższym, w przypadku konformerów 2HP(A) i 2HP(D) (konformerów o najniższych względnych energiach swobodnych Gibbsa) przeprowadzono analizę przeniesienia protonu zaangażowanego w tworzenie wiązania wodorowego wzdłuż proponowanych wiązań wodorowych (**Rysunek 16**). Krzywe przedstawiające zależność zmiany całkowitej energii układu (w hartree) podczas procedury IRC – przeniesienie protonu poprzez zmiany odległości atomu wodoru i atomu azotu przedstawia **Rysunek 17**. Krok ustawiono jako zmianę tej odległości co 0,05 Å. Różnice między energią substratu a produktu w procesie przeniesienia protonów dla 2HP(A) i 2HP(D) wynoszą odpowiednio 31,07 i 13,81 kcal/mol. Bariery energetyczne procesu przeniesienia protonu dla 2HP(A) i 2HP(D) wynoszą odpowiednio 35,86 i 49,00 kcal/mol. Otrzymane wartości barier a także względnych energii produktu i substratu procesu przeniesienia protonu są wysokie. Bariera energetyczna rzędu kilkudziesięciu kcal/mol nie jest możliwa do pokonania w samorzutnym procesie zachodzącym w układzie.



Rysunek 17. Zależność całkowitej energii układu w kolejnych krokach (co 0,05 Å) ścieżki analizy procesu przeniesienia protonu wzdłuż wiązania wewnątrzcząsteczkowego wodorowego w konformerze **A**. 2HP(D) i **B**. 2HP(A). Wartości zmiany energii zostały przeliczone na kcal/mol za pomocą współczynnika skalującego 627,5095 kcal · mol⁻¹ · hartree⁻¹.

Tautomeria prototropowa

Wśród związków heterocyklicznych powszechnie występującym typem tautomerii jest prototropia. Zjawisko to polega na relokacji atomu wodoru w obrębie cząsteczki wraz z jednoczesnym przeniesieniem wiązania podwójnego. 2-hydrazynopirazyna posiada kilka protonów, które mogą ulegać zmianom położenia w obrębie cząsteczki. **Schemat 3** przedstawia schemat rozważanych zmian położenia wiązania podwójnego (**Schemat 3A** i **3B**) oraz dodatkowo rotację wokół wiązania N7-N8 (**Schemat 3C**) we wszystkich otrzymanych w wyniku obliczeń formach prototropowych. Łącznie znaleziono 42 formy tautomeryczne, spośród których 12 to formy prototropowe układu 2HP(A), a pozostałe 30 to ich konformery otrzymane przez rotację wokół pojedynczego wiązania N7-N8. Zoptymalizowane struktury i względne swobodne energie Gibbsa wszystkich znalezionych form tautomerycznych zestawiono w **Tabeli S1** umieszczonej w załączniku. Literą „PX” (gdzie X to litery od A do I) oznaczono formy prototropowe, a następnie ich konformery oznaczono dodając kolejne cyfry do symbolu PX. Niebieską ramką zaznaczono konformer o najniższej energii względnej - 2HP(A). Względne energie swobodne Gibbsa 39-ciu z 42-óch otrzymanych form mieszczą się w zakresie 20,83 - 47,06 kcal/mol w odniesieniu do najniższej energetycznego układu 2HP(A). Te znaczne różnice energii wskazują na ich niewielki udział w strukturze związku i w związku z tym nie jest możliwe znalezienie ich metodami eksperymentalnymi. Tylko trzy z form mają względne energie Gibbsa mniejsze niż 15 kcal/mol i mogą istnieć oraz uczestniczyć w strukturze. Są to tautomery PA, PA1 i PB przedstawione w **Tabeli S1** w załączniku.

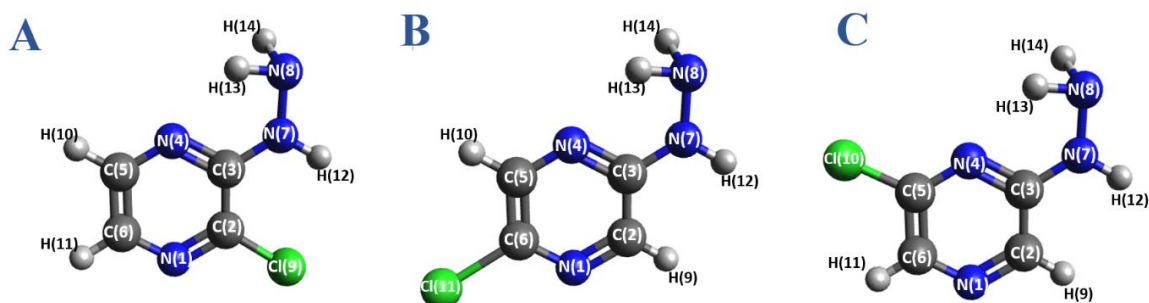


Schemat 3. Schemat zmian położenia wiązania podwójnego (zaznaczono na niebiesko) w równowagach prototropowych oraz rotacja wokół wiązań C2-N7 i N7-N8 (zaznaczono na czerwono) przy zmianach konformacji, zgodnie z numeracją przedstawioną na **Rysunku 14** [115].

2-chloro-3-hydrazynopirazyna (2Cl3HP)

Struktura

Przeszukanie hiperpowierzchni energii potencjalnej skutkowało zidentyfikowaniem trzech izomerów badanej chlorkowej pochodnej 2HP. Atom chloru może znajdować się przy atomie węgla C2, C5 lub C6 (zgodnie z numeracją przedstawioną na **Rysunku 18**). Minimum na powierzchni energii potencjalnej odpowiada strukturze posiadającej pierścień pirazyny podstawiony atomem chloru w pozycji *orto* względem grupy hydrazynowej. Porównując obliczone wartości energii swobodnych Gibbsa izomerów określono ich względną stabilność *in vacuo*. Zoptymalizowane struktury izomerów przedstawia **Rysunek 18**, a wartości względnych energii swobodnej Gibbsa zebrano w **Tabeli 4**.



Rysunek 18. Zoptymalizowane struktury izomerów chlorkowej pochodnej 2-hydrazynopirazyny z umiejscowieniem podstawnika chlorkowego w pozycji: (A) drugiej (2-chloro-3-hydrazynopirazyna), (B) czwartej (2-chloro-5-hydrazynopirazyna) i (C) piątej (2-chloro-6-hydrazynopirazyna) względem grupy hydrazynowej wraz z numeracją atomów.

Tabela 4. Względne energie swobodne Gibbsa (ΔG) izomerów chlorkowej pochodnej 2HP. Wartości przeliczone na kcal/mol z przelicznikiem $627,5095 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{hartree}^{-1}$.

Izomer	ΔG [kcal/mol]
2Cl3HP	0,00
2Cl5HP	2,22
2Cl6HP	0,84

Całkowita minimalna energia wyznaczona przez optymalizację na poziomie obliczeniowym B3LYP/6-311+G** wynosi $-834,667217$ hartree. Różnice względnej energii swobodnej Gibbsa izomerów 2Cl5HP i 2Cl6HP wynoszą odpowiednio 0,84 i 2,22 kcal/mol w porównaniu z izomerem o najniższej energii (2Cl3HP), co wskazuje na ich istotny udział w strukturze chlorkowej pochodnej 2-hydrazynopirazyny.

Jednakże do dalszych badań przyjęto strukturę izomeru 2Cl3HP jako najbardziej prawdopodobną. Parametry geometryczne zoptymalizowanej struktury izomeru 2Cl3HP

takie jak długości wiązań, miary kątów oraz wybranych kątów dwuściennych zostały zestawione w **Tabeli 5**.

Tabela 5. Długości wiązań, miary kątów oraz wybranych kątów dwuściennych zoptymalizowanej struktury 2-chloro-3-hydrazynopirazyny zgodnie z numeracją przedstawioną na **Rysunku 18**. (G_{2Cl3HP} : -834,667217 hartree)

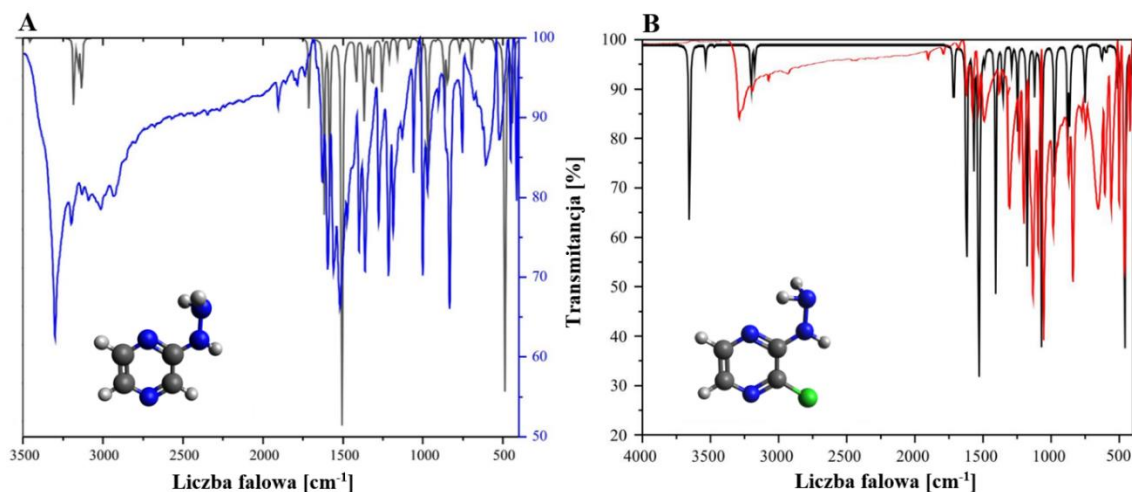
Atomy	Długość wiązania [Å]	Atomy	Kąt [°]	Atomy	Kąt dwuścienny [°]
N1-C2	1,298	N1-C2-C3	122,93	N4-C3-N7-N8	-7,01
C2-C3	1,426	C2-C3-N4	119,04	N4-C3-N7-H12	-169,52
C3-N4	1,332	C3-N4-C5	117,72	C3-N7-N8-N13	70,45
N4-C5	1,340	N4-C5-C6	122,33	C3-N7-N8-H14	-45,27
C5-C6	1,383	C5-C6-N1	120,27	N7-C3-C2-Cl9	-1,33
C6-N1	1,348	C6-N1-C2	117,71		
C2-Cl9	1,767	N1-C2-Cl9	118,01		
C3-N7	1,365	N4-C3-N7	118,92		
N7-N8	1,403	C3-N7-N8	123,06		
C5-H10	1,085	C3-N7-H12	119,37		
C6-H11	1,083	N7-N8-H13	108,59		
N7-H12	1,007	N7-N8-H14	109,04		
N8-H13	1,017				
N8-H14	1,018				

Wiązania węgiel-węgiel i węgiel-azot w aromatycznym pierścieniu pirazyny mają długości w zakresie od 1,298 do 1,426 Å, a wszystkie wiązania z atomami wodoru w zakresie od 1,007 do 1,085 Å. Wiązanie pomiędzy pierścieniem a grupą hydrazynową C3-N7 ma długość 1,365 Å, a odległość pomiędzy atomami azotu grupy hydrazynowej N7-N8 wynosi 1,403 Å. Długość wiązania pomiędzy pierścieniem a atomem chloru C2-Cl9 wynosi 1,767 Å. Miary kątów pomiędzy wiązaniami w pierścieniu wynoszą od 117,72 do 122,93 stopni. Kąt N1-C2-Cl9 (pomiędzy pierścieniem pirazyny a podstawnikiem chlorkowym) wynosi 118,01°. Nie zauważono znacznych zmian w parametrach geometrycznych cząsteczki po wprowadzeniu dodatkowego podstawnika (chlorkowego) względem molekuly 2HP.

W badaniach strukturalnych 2Cl3HP zaniechano wyznaczania optymalnych struktur konformacyjnych oraz tautomerycznych. Początkowe wyniki były niemal identyczne z otrzymywanymi dla 2HP, przy czym nie zauważono również wpływu podstawnika na równowagi prototropowe ani konformacyjne. Z tego względu, w celu zmniejszenia kosztu obliczeniowego, nie podjęto w tym kierunku dalszych rozważań.

5.1.2 Widma IR oraz UV-Vis, orbitale graniczne

Na **Rysunku 19** przedstawiono wyznaczone metodami teoretycznymi widma oscylacyjne 2HP (**Rysunek 19A**) i 3HP (**Rysunek 19B**) oraz dla porównania nałożone widma uzyskane eksperymentalnie. Przewidywane teoretycznie widma drgań nie posiadają urojonej liczby falowej, co oznacza, że zoptymalizowana geometria znajduje się w lokalnym minimum na powierzchni energii potencjalnej. Widma wyznaczono dla pojedynczej cząsteczki w próżni.



Rysunek 19. Widma IR **A.** 2-hydrazynopirazyiny i **B.** 2-chloro-3-hydrazynopirazyiny obliczone metodą B3LYP/6-311+G** (czarny). Dla porównania nałożono widma eksperymentalne (niebieski dla 2HP i czerwony dla 2Cl3HP) [116].

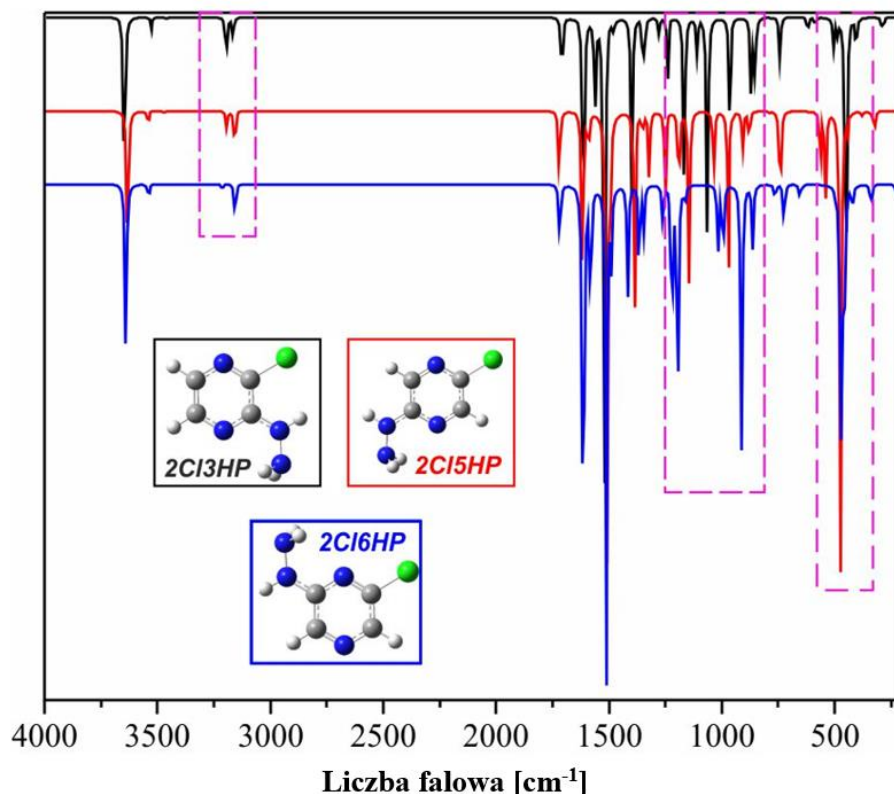
Związki heteroaromatyczne posiadające grupę aminową wykazują zwykle drgania rozciągające N-H w zakresie 3500-3220 cm⁻¹. W widmie 2HP pasma przy liczbach falowych 3456 i 3528 cm⁻¹ odpowiadają drganiom symetrycznym i asymetrycznym grupy -NH₂. W widmie pochodnej 2Cl3HP pasma te odnaleziono kolejno przy 3645 i 3527 cm⁻¹. Obecność drgań C-H w zakresie 3000–3100 cm⁻¹, który jest obszarem charakterystycznym dla identyfikacji drgań C-H, może wskazywać na obecność w układzie struktury heteroaromatycznej. Pasma pojawiające się przy 3232, 3155 i 3182 cm⁻¹ w widmie oscylacyjnym 2HP oraz przy 3195 i 3166 cm⁻¹ w widmie 2Cl3HP można przypisać właśnie drganiom rozciągającym grup C-H obecnych w pierścieniu aromatycznym.

Dla sześcioczłonowych pierścieni aromatycznych m.in. benzenu i pirazyiny, pojawiają się dwa lub trzy pasma na skutek drgań szkieletowych, przy czym najsilniejsze występują zwykle w okolicach 1500 cm⁻¹. Pasma obserwowane przy 1503 i 1508 cm⁻¹ w widmie 2HP oraz przy 1522 i 1478 cm⁻¹ w widmie 2Cl3HP przypisano do drgań pierścienia (C-C).

Pasma występujące przy 1159, 1084, 1015 i 627 cm^{-1} (2HP) oraz przy 1166, 1111, 1063 i 620 cm^{-1} (2Cl3HP) w widmach IR zostały przypisane jako drgania C-H zginające w płaszczyźnie pierścienia. Drgania zginające grupy C–N w pierścieniu zostały zidentyfikowane przy 1582, 1418 cm^{-1} (2HP) oraz przy 1562 i 1612 cm^{-1} (2Cl3HP). Pasma występujące przy 968, 865 i 844 cm^{-1} na widmie 2HP i przy 965, 870 i 854 cm^{-1} na widmie 2Cl3HP przypisano drganiom grup C-H poza płaszczyznę pierścienia. Drgania C–N i N-H identyfikowane są zazwyczaj między 1253 a 1365 cm^{-1} jako drgania rozciągające. Drgania nożycowe N-H obserwuje się zwykle w obszarze 1650-1620 cm^{-1} . Na widmie zauważalne w zakresie 1617 cm^{-1} (2HP) oraz 1240, 1279, 1341 i 1350 cm^{-1} (2Cl3HP) [117–121].

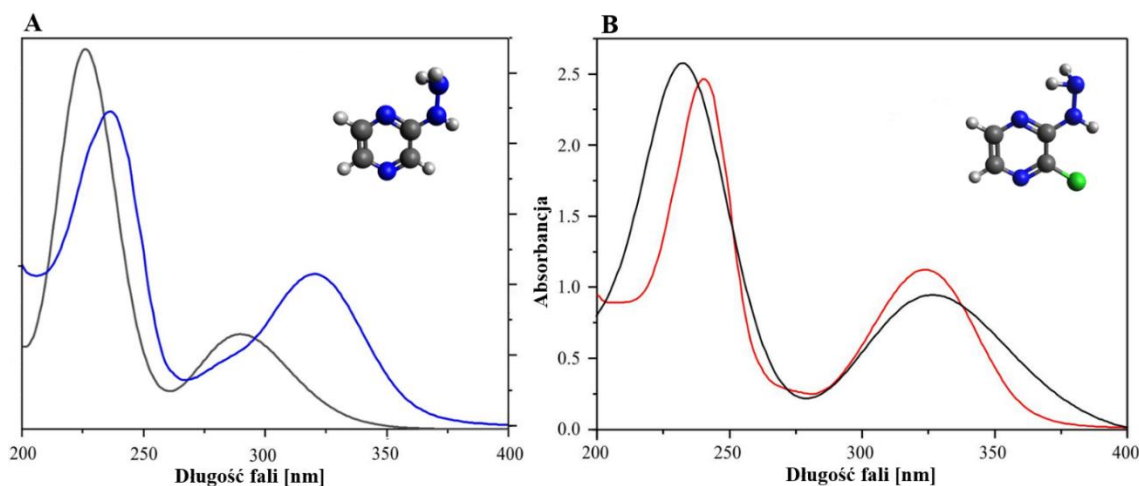
Ponadto dla jednopodstawionych pochodnych pirazyny obserwuje się bardzo silne, silne i słabe pasma odpowiednio w rejonie 1025–1000, 840–785 i 660–615 cm^{-1} , zauważalne w widmie 2HP. Natomiast drgania w rejonie odpowiednio 750–700 i 450–400 cm^{-1} często przypisywane są ugrupowaniu C–Cl, pasma te zidentyfikowano na widmie oscylacyjnym 2Cl3HP przy liczbie falowej równej 743 i 451 cm^{-1} .

Rysunek 20 przedstawia widma IR chlorkowej pochodnej 2HP z podstawnikiem chlorkowym (-Cl) w trzech różnych pozycjach [2-chloro-3-hydrazynopirazyna (czarny), 2-chloro-5-hydrazynopirazyna (czerwony) i 2-chloro-6-hydrazynopirazyna (niebieski)]. Dodatkowo w ramach umieszczono struktury związków, których kolor odpowiada kolorowi wykreślonego widma. Obszary o największych obserwowanych różnicach w porównywanych widmach, tj. 3200–3000, 1300–800 i 600–300 cm^{-1} , zaznaczono linią przerywaną. Największą intensywność sygnałów dla 2-chloro-5-hydrazynopirazyny można zaobserwować przy 500 cm^{-1} , a także widoczne jest pojawienie się podwójnych sygnałów, co wskazuje na symetrię związku (podstawniki w pozycji *para*). Przy 1000 cm^{-1} widoczna jest zmiana intensywności pasm, rosnąca w kolejności od czarnego (2Cl3HP), przez czerwony (2Cl5HP) do niebieskiego (2Cl6HP). Ponadto zauważalne jest także przesunięcie pików w kierunku niższych częstotliwości, w tej samej kolejności.



Rysunek 20. Widma IR obliczone metodą B3LYP/6-311+G** dla 2-chloro-3-hydrazinopyridazyny (czarny), 2-chloro-5-hydrazinopyridazyny (czerwony) i 2-chloro-6-hydrazinopyridazyny (niebieski) z odpowiadającymi strukturami w ramkach w tych samych kolorach.

Na **Rysunku 21** przedstawiono teoretyczne widma UV-Vis w fazie gazowej (czarny) 2-hydrazinopyridazyny (**A**) oraz 2-chloro-3-hydrazinopyridazyny (**B**). Widma te wyznaczono w zakresie 200-400 nm. Na podstawie w pełni zoptymalizowanej struktury stanu podstawowego obliczenia TD-DFT/B3LYP/6-311+G** umożliwiły określenie stanów wzbudzonych związków. Obliczone maksima absorpcji znajdują się, dla 2HP, przy 226 i 291 nm. Dla 2Cl3HP obliczenia przewidują intensywne przejście elektronowe przy 231 nm i 304 nm. Przypisano je odpowiednio przejściom $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi$.



Rysunek 21. Teoretyczne widma UV-Vis uzyskane metodą TD-DFT/B3LYP/6-311+G** (czarny) **A.** 2-hydrazynopirazyny i **B.** 2-chloro-3-hydrazynopirazyny. Dodatkowo, dla porównania nałożono widma uzyskane eksperymentalnie (krzywa koloru niebieskiego [115] i czerwonego [116]).

HOMO-LUMO

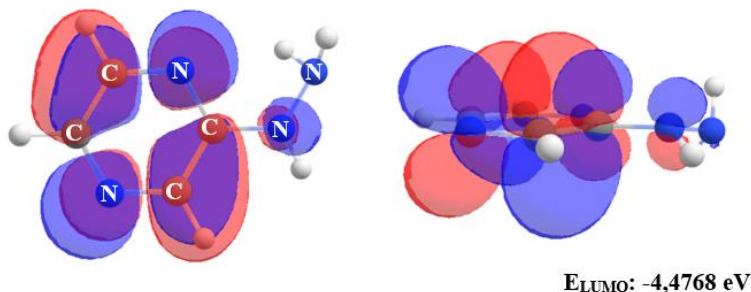
Właściwości chemiczne cząsteczek oraz możliwość tworzenia przez nie wiązań czy oddziaływań wynikają przede wszystkim ze struktury elektronicznej. Właściwości kwasowo-zasadowe substancji aktywnych związane są ściśle z procesem przeniesienia protonu, w którym udział biorą wolne pary elektronowe. Budowę elektroniczną można opisać za pomocą orbitali molekularnych, a ich kształt i energia umożliwiają analizę możliwych procesów, w których będą brały udział związki i poszczególne atomy. Ilościowy opis właściwości kwasowo-zasadowych zgodnie z teorią Pearsona obejmuje parametry takie jak twardość i miękkość, a ich wartości można wyliczyć na podstawie znanej energii orbitali granicznych.

Najwyżej energetyczny zajęty orbital molekularny (z ang. *Highest Occupied Molecular Orbital* HOMO) i najniższy energetyczny niezajęty orbital molekularny (z ang. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* LUMO) są również nazywane granicznymi orbitalami molekularnymi (z ang. *Frontier Molecular Orbitals* FMOs). Orbital HOMO jest związany ze zdolnością oddawania elektronów, LUMO jako akceptor elektronów jest związany ze zdolnością do ich przyjmowania. Luka energetyczna między HOMO i LUMO (różnica między energią HOMO i LUMO) pozwala określić stabilność i reaktywność chemiczną, a także inne właściwości molekuly jak stabilność kinetyczną, polaryzowalność optyczną czy twardość chemiczną - miękkość cząsteczki [122, 123].

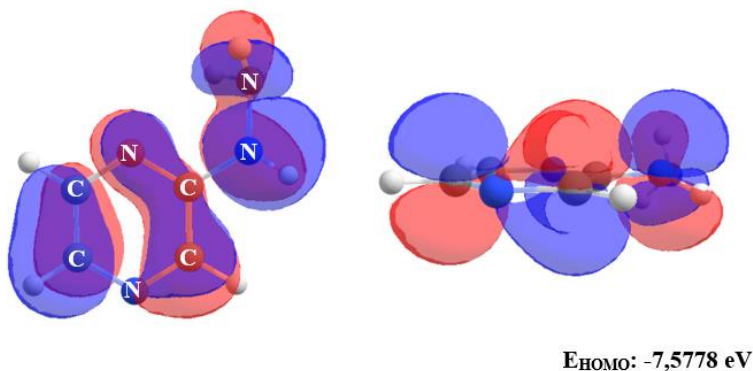
Na **Rysunkach 22 i 23** przedstawiono wyznaczone na podstawie obliczeń orbitale HOMO i LUMO dla 2HP i 2Cl3HP. W przypadku 2HP, orbital HOMO jest rozproszony

nad całą cząsteczką i nie wykazuje ciągłości. Można wskazać kilka fragmentów, które obejmują atomy węgla C5 i C6 pierścienia pirazyny, atomy 1-4 pierścienia pirazyny oraz dwa oddzielne nad każdym z atomów azotu grupy hydrazynowej. Biorąc pod uwagę największy obszar rozmieszczenia orbitalu HOMO (tj. atomy 1-3 pierścienia) można stwierdzić, że orbital ten ma charakter wiążący. Skupiając uwagę na fragmencie pierścienia pirazyny z pozycją drugą oraz przyłączonego w tej pozycji podstawnika hydrazynowego orbital HOMO ma charakter wiążący (nad całym ugrupowaniem hydrazynowym). Gęstość elektronowa orbitalu LUMO jest umiejscowiona w rejonie pierścienia pirazyny. W tym przypadku można wyróżnić cztery fragmenty: dwa zawierające po jednym atomie azotu oraz dwa zawierające po dwa połączone ze sobą atomy węgla pierścienia. Przejście HOMO→LUMO obejmuje przeniesienie gęstości elektronowej z grupy hydrazynowej do pierścienia pirazyny oraz zmianę charakteru orbitalu zlokalizowanego nad atomami 1-3 pierścienia pirazyny z wiążącego na antywiązący. Obliczona w fazie gazowej wartość energii HOMO wynosi $-7,5778$ eV, a LUMO $-4,4768$ eV. Energia luki HOMO-LUMO wynosi zatem $3,1010$ eV. Ta względnie duża luka energetyczna wskazuje na dużą stabilność związku.

2HP LUMO

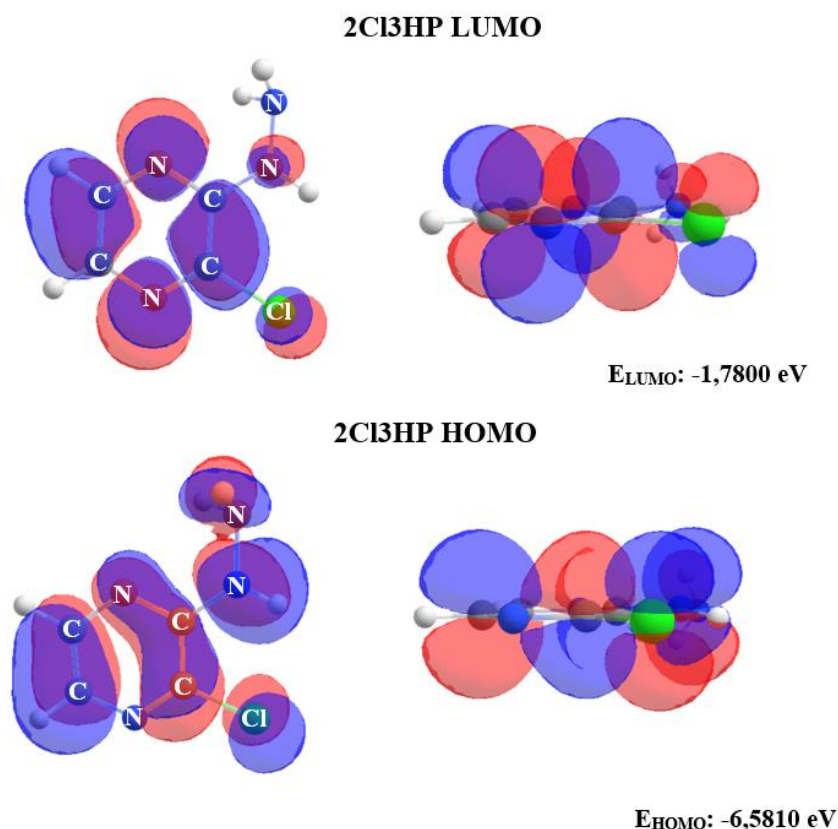


2HP HOMO



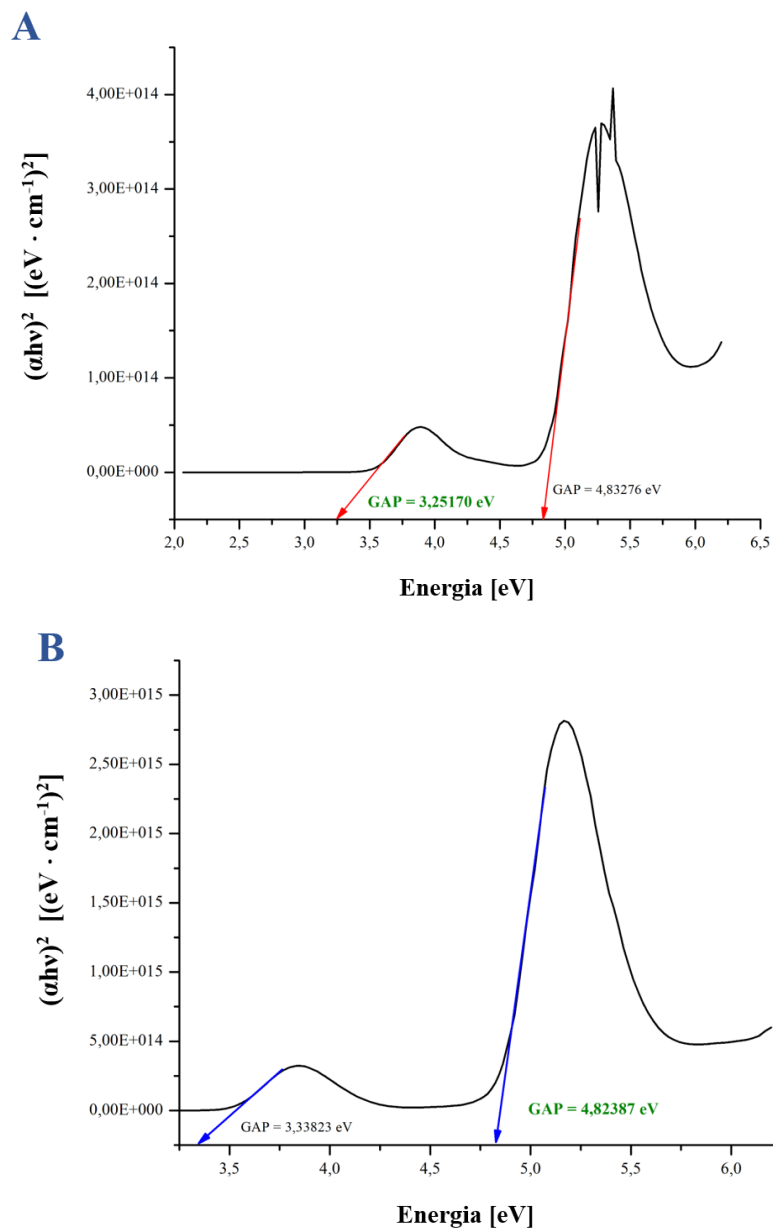
Rysunek 22. Orbitale HOMO i LUMO 2-hydrazynopirazyny obliczone metodą B3LYP/6-311+G** *in vacuo*. Wartość luki H-L wynosi $3,1010$ eV. Ładunek ujemny i dodatni zaznaczono odpowiednio kolorem niebieskim i czerwonym. (Rzut lewy – widok z góry; prawy – widok z boku.)

Dla cząsteczki 2Cl3HP można zauważyć, że orbital HOMO jest rozmieszczony analogicznie jak w przypadku 2HP – nad całą cząsteczką, z tym, że zauważalny jest dodatkowy fragment nad podstawnikiem chlorkowym. W rejonie wiązania C3-Cl orbital HOMO ma charakter wiążący. Podobnie orbital LUMO jest zlokalizowany tylko w rejonie pierścienia pirazyny i można wyróżnić jego podział na cztery fragmenty. Przejście HOMO→LUMO polega na przeniesieniu gęstości elektronowej z grupy hydrazynowej na pierścień pirazyny, co może wynikać bezpośrednio z obecności elektroujemnego, silnie wyciągającego elektrony podstawnika chlorkowego. Obliczone wartości energii HOMO i LUMO w fazie gazowej wynoszą odpowiednio -6,5810 i -1,7800 eV. Energia luki HOMO–LUMO jest równa 4,8010 eV. Luka energetyczna jest zdecydowanie większa niż dla 2HP, a dodatkowo obliczony potencjał chemiczny przyjmuje ujemną wartość, co wskazuje na wysoką stabilność 2Cl3HP. Ponadto 2Cl3HP wykazuje nieco większą stabilność, co najprawdopodobniej wynika z obecności podstawnika chlorkowego w cząsteczce.



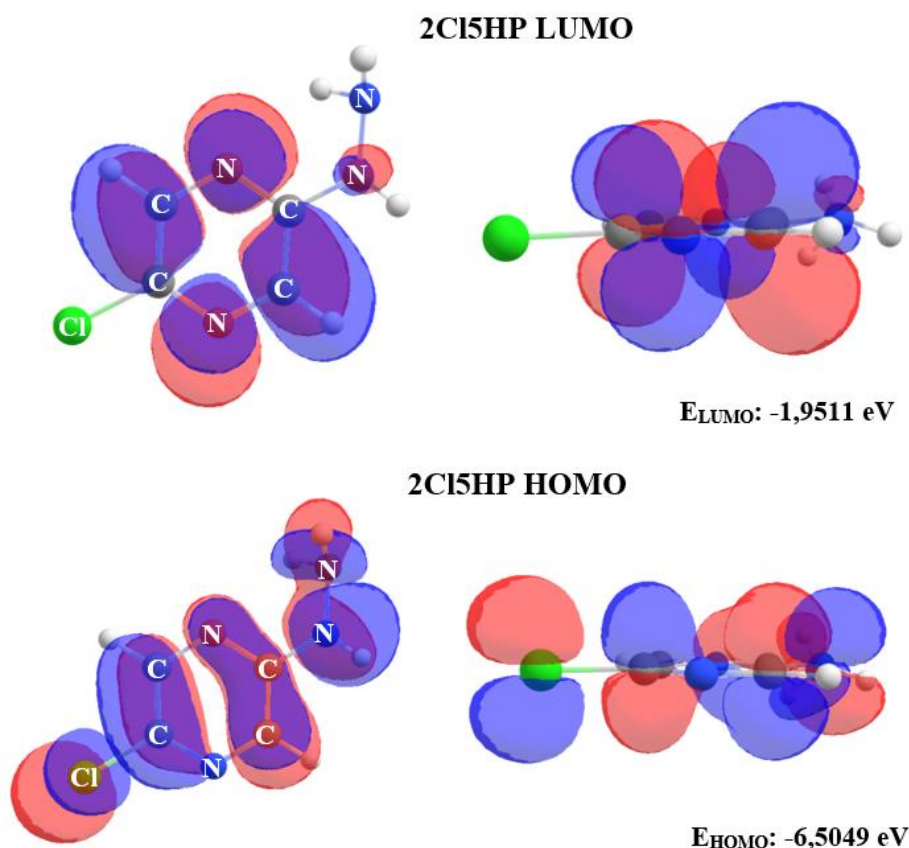
Rysunek 23. Orbitale HOMO i LUMO 2-chloro-3-hydrazynopirazyny obliczone metodą B3LYP/6-311+G** *in vacuo*. Wartość luki H-L wynosi 4,8010 eV. Ładunek ujemny i dodatni zaznaczono odpowiednio kolorem niebieskim i czerwonym. (Rzut lewy – widok z góry; prawy – widok z boku.)

Dodatkowo, wyznaczono wartości luk H-L na podstawie eksperymentalnych widm UV-Vis zaprezentowanych w pracy [115,116]. Do wyznaczenia wartości przerwy H-L wykorzystuje się progową długość fali [nm], uzyskaną po przeliczeniu z zarejestrowanego widma absorpcji. Wyznacza się energię z długości fali $(\alpha h\nu)^2$ wykorzystując energetycznie zależny molowy współczynnik absorpcji α , a następnie wykreśla krzywą zwaną zależnością Tauc'a [124, 125]. Krzywe Tauc'a wykreślone na podstawie eksperymentalnych widm UV-Vis 2HP oraz 2Cl3HP przedstawia **Rysunek 24** poniżej. Obliczone wartości wynoszą odpowiednio 3,25170 dla 2HP oraz 4,82387 eV dla 2Cl3HP. Otrzymane w ten sposób wyniki są zgodne z wartościami wyznaczonymi teoretycznie.

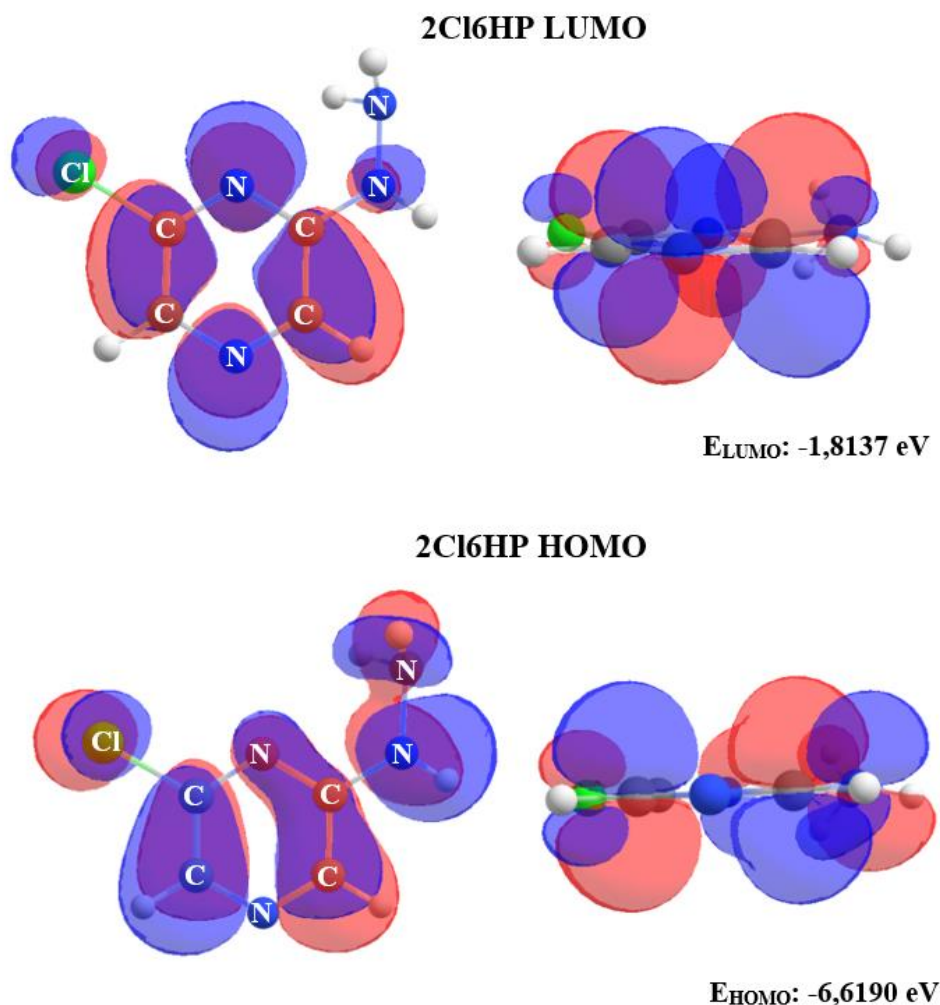


Rysunek 24. Zależności Tauc'a widm UV-Vis dla: **A.** 2HP i **B.** 2Cl3HP.

Na **Rysunkach 25 i 26** przedstawiono wyznaczone na podstawie obliczeń orbitale HOMO i LUMO dla 2Cl5HP i 2Cl6HP. Obliczona w fazie gazowej wartość energii HOMO dla 2Cl5HP wynosi -6,5049 eV, a LUMO -1,95107 eV. Energia luki HOMO-LUMO wynosi zatem 4,5539 eV. Dla 2Cl6HP wartość energii HOMO wynosi -6,6190 eV, a LUMO -1,8137 eV. Energia luki HOMO-LUMO wynosi zatem 4,8053 eV. Wartości energii luki H-L wskazującej na stabilność związku dla cząsteczki posiadającej podstawnik chlorkowy w trzeciej bądź szóstej pozycji pierścienia pirazyny są niemal identyczne, co świadczy o ich porównywalnej stabilności. W przypadku 2Cl5HP wartość luki jest niższa o około 0,25 eV. Biorąc pod uwagę wcześniejsze porównania stabilności energetycznej izomerów na podstawie względnych energii swobodnych Gibbsa, a także wartości luk H-L można stwierdzić, że najbardziej stabilne są izomery 2Cl3HP oraz 2Cl6HP. Te dwa izomery są także dostępne komercyjnie, w przeciwieństwie do 2Cl5HP.



Rysunek 25. Orbitale HOMO i LUMO 2-chloro-5-hydrazynopirazyny obliczone metodą B3LYP/6-311+G** *in vacuo*. Wartość luki H-L wynosi 4,5539 eV. Ładunek ujemny i dodatni zaznaczono odpowiednio kolorem niebieskim i czerwonym. (Rzut lewy – widok z góry; prawy – widok z boku.)



Rysunek 26. Orbitale HOMO i LUMO 2-chloro-6-hydrazynopirazyny obliczone metodą B3LYP/6-311+G** *in vacuo*. Wartość luki H-L wynosi 4,8053 eV. Ładunek ujemny i dodatni zaznaczono odpowiednio kolorem niebieskim i czerwonym. (Rzut lewy – widok z góry; prawy – widok z boku.)

Lokalizacja orbitali HOMO i LUMO dla wszystkich izomerów chlorkowej pochodnej 2-hydrazynopirazyny jest niemal identyczna, czego dowodzą **Rysunki 23, 25 i 26**. Wyjątek stanowi brak zlokalizowania orbitalu LUMO nad podstawnikiem chlorkowym w przypadku 2Cl5HP. Położenie *para* podstawników w pierścieniu pirazyny jest więc miejscem najmniej preferowanym.

Wykorzystując wartości energii orbitali granicznych można wyznaczyć inne właściwości takie jak energia jonizacji, powinowactwo elektronowe, potencjał chemiczny czy twardość i miękkość, zgodnie z zależnościami (8) – (12) opisanymi wcześniej w części 4. *Badania własne*. Wyznaczone wartości parametrów opisujące właściwości elektronowe cząsteczki zestawiono w **Tabeli 6**.

Tabela 6. Zestawienie parametrów opisujących liczbowo właściwości związku chemicznego wyznaczone na podstawie energii orbitali HOMO i LUMO wyznaczone w fazie gazowej metodą B3LYP/6-311+G**.

Parametr	Energia [eV]	
	2HP	2Cl3HP
HOMO (stan podstawowy)	-7,5778	-6,5810
LUMO (stan podstawowy)	-4,4768	-1,7800
Luka H-L = E _{HOMO} - E _{LUMO}	3,1010	4,8010
Energia jonizacji	7,58	6,58
Powinowactwo elektronowe	4,48	1,78
Twardość	3,10	2,40
Miękkość	0,32	0,42
Potencjał chemiczny	-6,03	-4,18

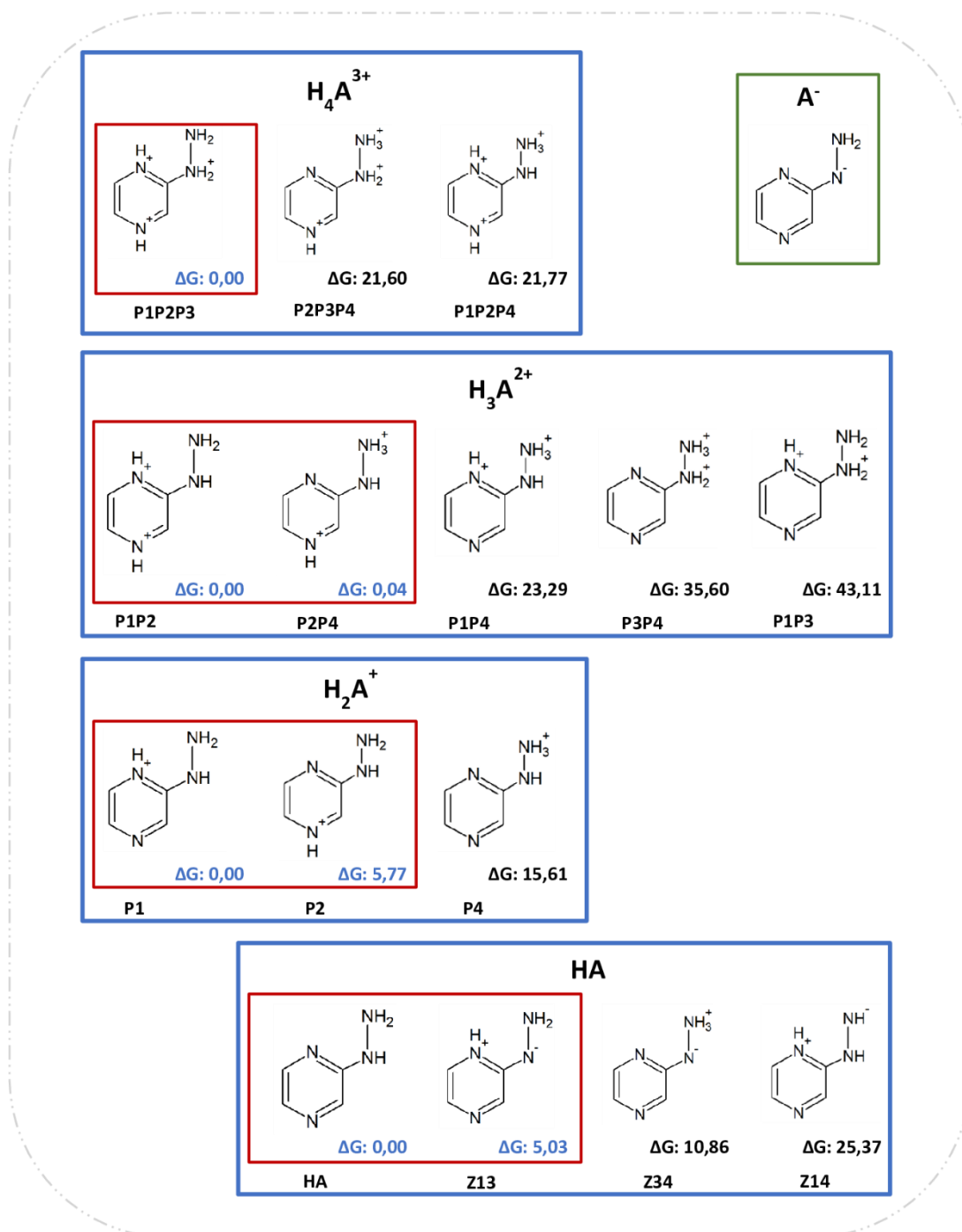
W porównaniu do 2HP, chlorkowa pochodna 2Cl3HP wykazuje niższą energię jonizacji, powinowactwo do elektronów i twardość, a wyższą miękkość i potencjał chemiczny. Na podstawie wyznaczonych wartości można stwierdzić, że zarówno 2Cl3HP, jak i 2HP wykazują wyraźną tendencję do wychwytu elektronów zamiast ich oddawania. Wyższy potencjał jonizacji 2Cl3HP wskazuje na konieczność wysokiej energii, aby stał się kationem, oraz łatwiejszą jonizację chlorkowej pochodnej w porównaniu z 2HP. Akceptor jest opisywany powinowactwem elektronowym, którego wartość odpowiada uwalnianej energii, podczas przyjmowania jednego elektronu przez orbital LUMO. Akceptor powinien charakteryzować się wysokim powinowactwem elektronowym. Zauważono, że obecność elektroujemnego podstawnika chlorkowego w pierścieniu prowadzi do zmniejszenia powinowactwa elektronowego cząsteczki. Mniejsza twardość i większa miękkość 2Cl3HP w porównaniu do 2HP wskazują na jego słabszą odporność na deformację chmury elektronowej podczas procesów i reakcji chemicznych.

5.1.3 Ustalenie form jonowych

Badania właściwości kwasowo-zasadowych rozpoczęto od ustalenia możliwych oraz preferowanych form jonowych 2HP w fazie gazowej. W celu ich znalezienia zbudowano i zoptymalizowano możliwe struktury wejściowe. 2-hydrazynopirazyna posiada więcej niż jeden atom, który może ulegać protonowaniu i w środowisku wodnym są to heteroatomy azotu. Znaleziono cztery możliwe miejsca protonowania (oznaczane jako P1, P2, P3 i P4 kolejno na atomach azotu N1, N4, N7 i N8) oraz jedno miejsce deprotonowania (N7). Struktury wszystkich zaproponowanych form jonowych wraz z ich względnymi swobodnymi energiami Gibbsa wyrażonymi w kcal/mol przedstawia **Rysunek 27**. Bezwzględne wartości energii swobodnych Gibbsa zestawiono w **Tabeli S2** w załączniku.

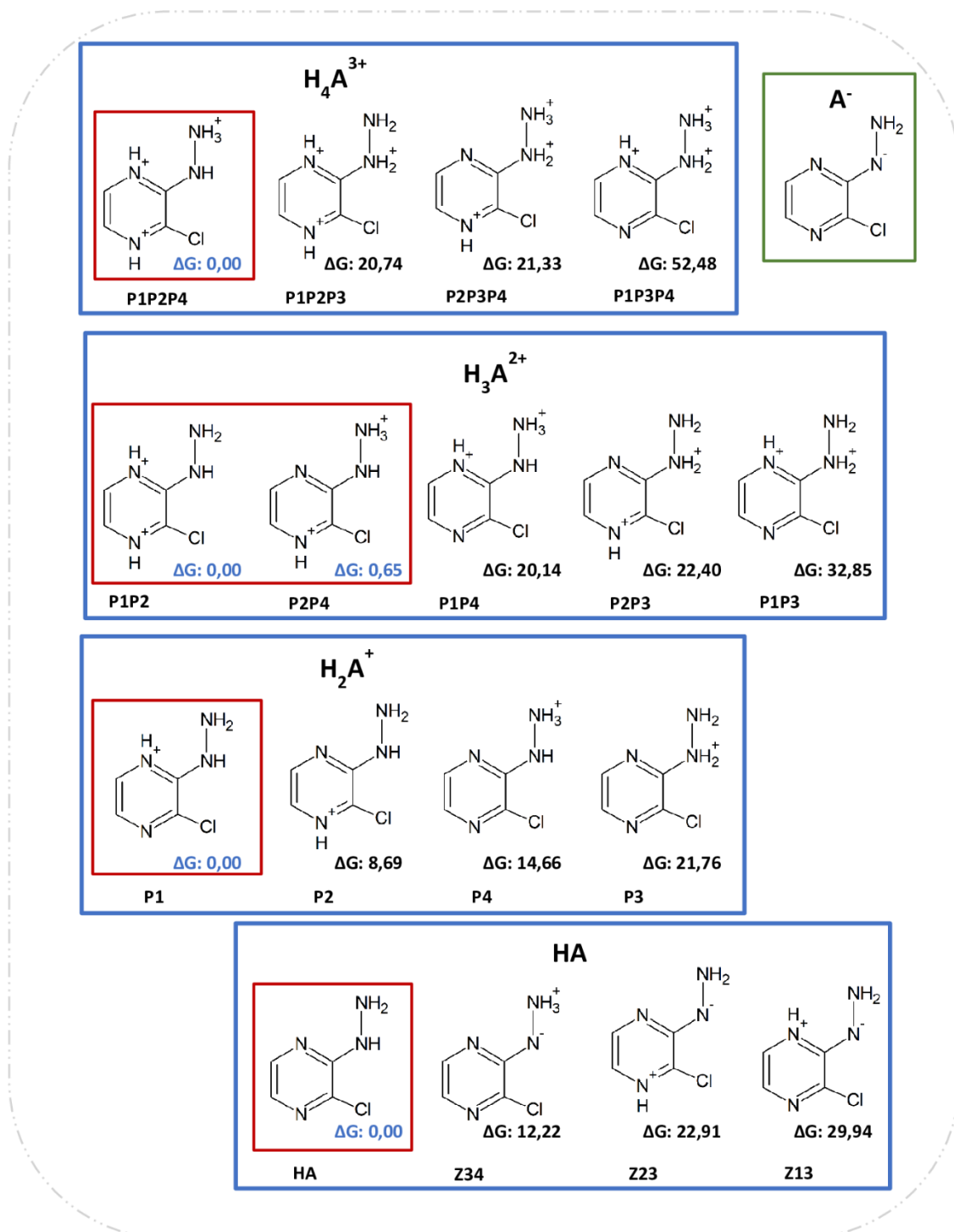
Preferowane pozycje ulegające protonowaniu, czyli te o najniższych względnych energiach swobodnych zostały zaznaczone poprzez umieszczenie w czerwonych ramkach. Energie zostały porównane z wartością otrzymaną dla układu najniżej energetycznego w każdym stopniu jonizacji. Nie udało się znaleźć stabilnej formy posiadającej cztery sprotonowane atomy azotu. Struktury sprotonowane oznaczone jako $[H_4A^{3+}]$ posiadają trzy protony. Istnieją cztery możliwości rozmieszczenia trzech protonów w obrębie cząsteczki 2HP, przy czym biorąc pod uwagę ich stabilność energetyczną tylko jedna struktura (w czerwonej ramce) będzie występowała w roztworze (dodatkowo układ P1P3P4 nie jest stabilny energetycznie). Układy $[H_3A^{2+}]$ są dwukrotnie sprotonowane i w tym przypadku możliwości rozmieszczenia protonów jest pięć. Dwie struktury, najniżej energetyczne zaznaczono ramką. Protony znajdują się na atomie azotu pierścienia pirazyny N4 w obydwu formach oraz na atomie N1 pierścienia (P1P2) lub skrajnym atomie azotu N8 grupy hydrazynowej (P2P4). Obydwa układy mają w przybliżeniu tę samą wartość energii swobodnej Gibbsa, co oznacza, że są tak samo prawdopodobne i może dochodzić do migracji protonu pomiędzy atomami N1 oraz N8. Jednosprotonowane cząstki oznaczone jako $[H_2A^+]$ posiadają trzy możliwości co do umiejscowienia protonu, na atomie azotu N1 (P1), N4 (P2) bądź N8 (P4). Podczas optymalizacji układu cząstki ze sprotonowanym atomem azotu N7 dochodzi do rozerwania wiązania i otrzymania dwóch oddzielnych cząsteczek – pirazyny oraz hydrazyny. Jak wynika z porównania stabilności energetycznej najbardziej prawdopodobne jest sprotonowanie atomu azotu w pierścieniu pirazyny (N1 bądź N4), przy czym preferowana jest forma ze sprotonowanym atomem N1 – układ charakteryzuje energia swobodna niższa o 5,77 kcal/mol. Deprotonowaniu może ulegać tylko jeden atom

azotu N7 grupy hydrazynowej. Strukturę zdeprotonowanej cząstki zaznaczono na **Rysunku 27** zieloną ramką. Rozważano także występowanie jonów obojnaczych jako cząstki obojętnej (oznaczone jako ZXY, gdzie XY to numeracja atomów posiadających ładunki). Względna energia swobodna układu Z13 wynosi 5,03 kcal/mol co świadczy o jej możliwym występowaniu w roztworze, jednakże nadal najbardziej prawdopodobny pozostaje układ nie posiadający jednostkowego ładunku na żadnym z atomów [HA].



Rysunek 27. Formy jonowe 2-hydrazynopirazyiny wraz z wartościami względnych energii swobodnych Gibbsa w odniesieniu do najniższej energetycznej struktury na danym poziomie zjonizowania [kcal/mol].

Struktury wszystkich zaproponowanych form jonowych wraz z ich względnymi swobodnymi energiami Gibbsa wyrażonymi w kcal/mol przedstawia **Rysunek 28**, a bezwzględne wartości energii swobodnych Gibbsa uzyskanych w wyniku optymalizacji w fazie gazowej zestawiono w **Tabeli S2** w załączniku.



Rysunek 28. Formy jonowe 2-chloro-3-hydrazynopirazyny wraz z wartościami względnymi energii swobodnych Gibbsa w odniesieniu do najniższej energetycznej struktury na danym poziomie zjonizowania [kcal/mol].

Analogicznie jak dla 2HP, preferowane pozycje ulegające protonowaniu w cząsteczce 2-chloro-3-hydrazynopirazyny (o najniższych względnych energiach swobodnych) zostały zaznaczone czerwonymi ramkami, a energie zostały porównane z wartością otrzymaną dla układu najniżej energetycznego na każdym poziomie jonizacji. Podobnie jak dla 2HP nie udało się znaleźć stabilnej formy czterosprotonowanej. Istnieją cztery możliwości rozmieszczenia trzech protonów w obrębie cząsteczki i ich struktury zostały zoptymalizowane. Preferowana pod względem energetycznym forma P1P2P4 posiada sprotonowane obydwa atomy azotu pierścienia pirazyny oraz atom azotu N8 grupy hydrazynowej. Dla układów dwukrotnie sprotonowanych [H_3A^{2+}] najbardziej korzystne energetycznie są dwie formy jonowe: P1P2 oraz P2P4 (zaznaczone czerwoną ramką). Podobnie jak dla 2HP energia tych układów jest niemal taka sama co świadczy o równym prawdopodobieństwie występowania obydwu form a także możliwości przeniesienia protonu pomiędzy atomami azotu N1 i N8 oraz ustalaniu się równowagi pomiędzy tymi formami w roztworze. Spośród form jednosprotonowanych przeważa, pod kątem energetycznym, struktura P1. Dla formy o wypadkowym zerowym ładunku możliwe byłoby przeniesienie protonu w obrębie grupy hydrazynowej (Z34), jednakże przeważająca jest i w tym przypadku struktura nie posiadająca jednostkowego ładunku na żadnym z atomów [HA].

Struktury przedstawione na **Rysunkach 27 i 28** w ramach, o najniższych względnych energiach swobodnych Gibbsa, stanowią najbardziej prawdopodobne zjonizowane formy badanych związków, które mogą występować w roztworze i być zaangażowane w równowagi kwasowo-zasadowe. Na ich podstawie z modelu teoretycznego wyznaczono wartości stałych pK_a opisujące liczbowo właściwości kwasowo-zasadowe związków, o których będzie mowa w dalszej części pracy.

5.1.4 Wartości stałych kwasowo-zasadowych

Do wyznaczenia właściwości kwasowo-zasadowych zostało wybrane środowisko wodne, jako miejsce zachodzenia większości reakcji biochemicznych, a także reprezentujące warunki panujące wewnątrz komórek organizmów żywych oraz środowiska naturalnego. Na podstawie analizy energetycznej form jonowych zaproponowano model równowag zachodzących w roztworze wodnym, który przedstawiono w **Tabeli 7**.

Tabela 7. Proponowane, w oparciu o obliczenia teoretyczne, równowagi kwasowo-zasadowe występujące w środowisku wodnym. W odniesieniu do form jonowych przedstawionych na **Rysunkach 25 i 26**.

Formy jonowe zaangażowane w równowagę kwasowo-zasadową	Założony model reakcji bezpośredniej	Stała dysocjacji kwasowej
trójkation / bikation	$H_4A^{3+} \rightleftharpoons H_3A^{2+} + H^+$	pKaH ₁
bikation / monokation	$H_3A^{2+} \rightleftharpoons H_2A^+ + H^+$	pKaH ₂
monokation / neutralna	$H_2A^+ \rightleftharpoons HA + H^+$	pKaH ₃
neutralna / monoanion	$HA \rightleftharpoons A^- + H^+$	pKa ₄

Wartości pKa wyznaczono metodą bezpośrednią, która uwzględnia dysocjację protonu według poniższych równań:



Obliczenia oparto na szeroko spotykanym w literaturze cyklu termodynamicznym, który łączy energie swobodne Gibbsa procesu deprotonowania w fazie gazowej i energie solwatacji. Szczegóły dotyczące procedury wyznaczania wartości pKa omówiono wcześniej w pracy w części 4. *Badania własne*.

Symulacje DFT, a także wykonane w Katedrze Chemii Bionieorganicznej analogiczne badania eksperymentalne dowiodły istnienia czterech równowag kwasowo-zasadowych w roztworze wodnym 2-hydrazynopirazyny jak również 2-chloro-3-hydrazynopirazyny. Obliczone wartości pKaH/pKa zebrano w **Tabeli 8**. Wartości stałych dysocjacji kwasowych sprotonowanych układów wyznaczono w odniesieniu do proponowanego modelu równowag w układzie wodnym przedstawionego w **Tabeli 7** na podstawie wartości energii swobodnych Gibbsa dla najniższej energetycznych form jonowych przedstawionych na **Rysunkach 27 i 28**. Obliczone wartości uzyskane metodami PCM/B3LYP/6-311+G** i SMD/M06-2X/6-311+G** są ze sobą zgodne jakościowo. Wyniki różnią się ilościowo ze względu na stosowane w metodach zależności oraz przybliżenia. Otrzymano, zarówno na podstawie obydwu metod jak i dla obydwu

związków, po dwie wartości ujemne, które można powiązać z występowaniem równowagi kwasowo-zasadowej w obrębie pierścienia pirazyny. Dla 2HP otrzymano dwie wartości dodatnie opisujące właściwości kwasowo-zasadowe związku, które można przypisać obecności podstawnika hydrazynowego. Porównując otrzymane wartości pKa (pKaH) dla 2HP oraz 2Cl3HP można zauważyć, że stałe pKaH₂ i pKaH₃ dla chlorkowej pochodnej mają niższe wartości. Jak powszechnie wiadomo, elektroujemny podstawnik chlorkowy należy do grupy elektronodonorowych o ujemnym efekcie indukcyjnym i dodatnim mezomerycznym. Obecność takiego podstawnika w układzie zwiększa jego zasadowość co przejawia się liczbowo obniżeniem wartości stałej pKa. Można więc wnioskować, że wpływ na obniżenie wartości stałych pKaH₂ i pKaH₃ 2Cl3HP względem 2HP ma bezpośrednio obecność podstawnika chlorkowego. Wartość najwyższej liczbowo stałej pKa₄, na podstawie wyników otrzymanych obiema metodami, wzrosła.

W **Tabeli 8** dodatkowo podano wartości eksperymentalne otrzymane w Katedrze Chemii Bionieorganicznej. Obserwowalny jest również stały trend zmian wartości zarówno w wartościach obliczonych na podstawie badań teoretycznych, jak i eksperymentalnych, które można odnaleźć i opisano w publikacjach [115, 116]. Otrzymane wartości teoretyczne i eksperymentalne są spójne jakościowo, ale różnią się znacząco ilościowo. Może to wynikać z zastosowania przybliżeń w obliczeniach teoretycznych, a głównym źródłem błędów w obliczeniach pKa jest wartość zmiany swobodnej energii solwatacji, szacowanej za pomocą niejawnych ciągłych modeli solwatacji, które wykorzystano w tych badaniach. Aktualnie nie istnieje idealny model służący do przewidywania wartości stałych pKa, który pozwalałby na uzyskanie wartości w pełni zgodnych z eksperymentem.

Tabela 8. Wartości stałych dysocjacji kwasowej (pKaH/pKa) **(A)** 2-hydrazynopirazyny i **(B)** 2-chloro-3-hydrazynopirazyny wyznaczone metodami DFT. Dla porównania podano także wartości otrzymane eksperymentalnie [115, 116].

Metoda	wartość pKaH/pKa			
	pKaH ₁	pKaH ₂	pKaH ₃	pKa ₄
A. 2HP				
PCM/B3LYP/6-311+G**	-32,12	-14,76	4,21	16,99
SMD/M06-2X/6-311+G**	-31,36	-10,48	6,32	13,12
Potencjometria [115]	-	-	4,44 ± 0,08	10,56 ± 0,02
Spektroskopia[115]	-3,44 ± 0,02	-1,06 ± 0,04	4,50 ± 0,09	10,96 ± 0,11

B. 2Cl3HP				
PCM/B3LYP/6-311+G**	-33,05	-20,36	-3,15	19,66
SMD/M06-2X/6-311+G**	-18,48	-17,77	-2,04	19,69
Potencjometria [116]	-	2,58 ± 0,08	4,63 ± 0,02	-
Spektroskopia [116]	-	2,98 ± 0,04	4,99 ± 0,23	11,24 ± 0,06

5.1.5 Lipofilowość

Obliczone wartości energii swobodnych Gibbsa obojętnej cząsteczki w wodzie i n-oktanolu oraz wyznaczonych wartości logP 2-hydrazynopirazyny i jej chlorkowej pochodnej zestawiono w **Tabeli 9**. Wszystkie otrzymane wartości logP są ujemne i wyraźnie wskazują na hydrofilowy charakter zarówno 2HP jak i jej chlorkowej pochodnej. Oznacza to, że będzie się dobrze rozpuszczał w wodzie i innych rozpuszczalnikach polarnych. Tym samym, charakteryzując badane związki jako potencjalne substancje biologicznie aktywne, można przypuszczać, że nie będą się one przedostawały do komórek organizmów żywych ze względu na lipidowy charakter błony komórkowej. Wartości logP otrzymane dla 2Cl3HP są wyższe niż w przypadku 2HP. Wyniki te mogą sugerować, że wprowadzenie podstawnika chlorkowego zamiast atomu wodoru w trzecią pozycję pierścienia 2HP powoduje niewielki wzrost wartości logP. Anion chlorkowy jest podstawnikiem elektronodonorowym i sprawia, że układ π 2Cl3HP ma charakter bardziej nukleofilowy niż 2HP. Może to tłumaczyć obserwowane zmiany wartości logP.

Tabela 9. Wartości energii swobodnych Gibbsa (G) obojętnej cząsteczki wyznaczone w wodzie i n-oktanolu w wyniku optymalizacji DFT dwiema metodami oraz wyznaczone na ich podstawie wartości współczynnika podziału (logP).

Metoda	G_{H_2O} [a.u.]	$G_{n-octanol}$ [a.u.]	logP
A. 2HP			
SMD/M06-2X/6-311+G**	-374,886949	-374,884054	-1,330
PCM/B3LYP/6-311+G**	-375,673558	-375,072235	-0,609
B. 2Cl3HP			
SMD/M06-2X/6-311+G**	-834,675525	-834,499315	-0,428
PCM/B3LYP/6-311+G**	-834,674420	-834,500245	-0,508

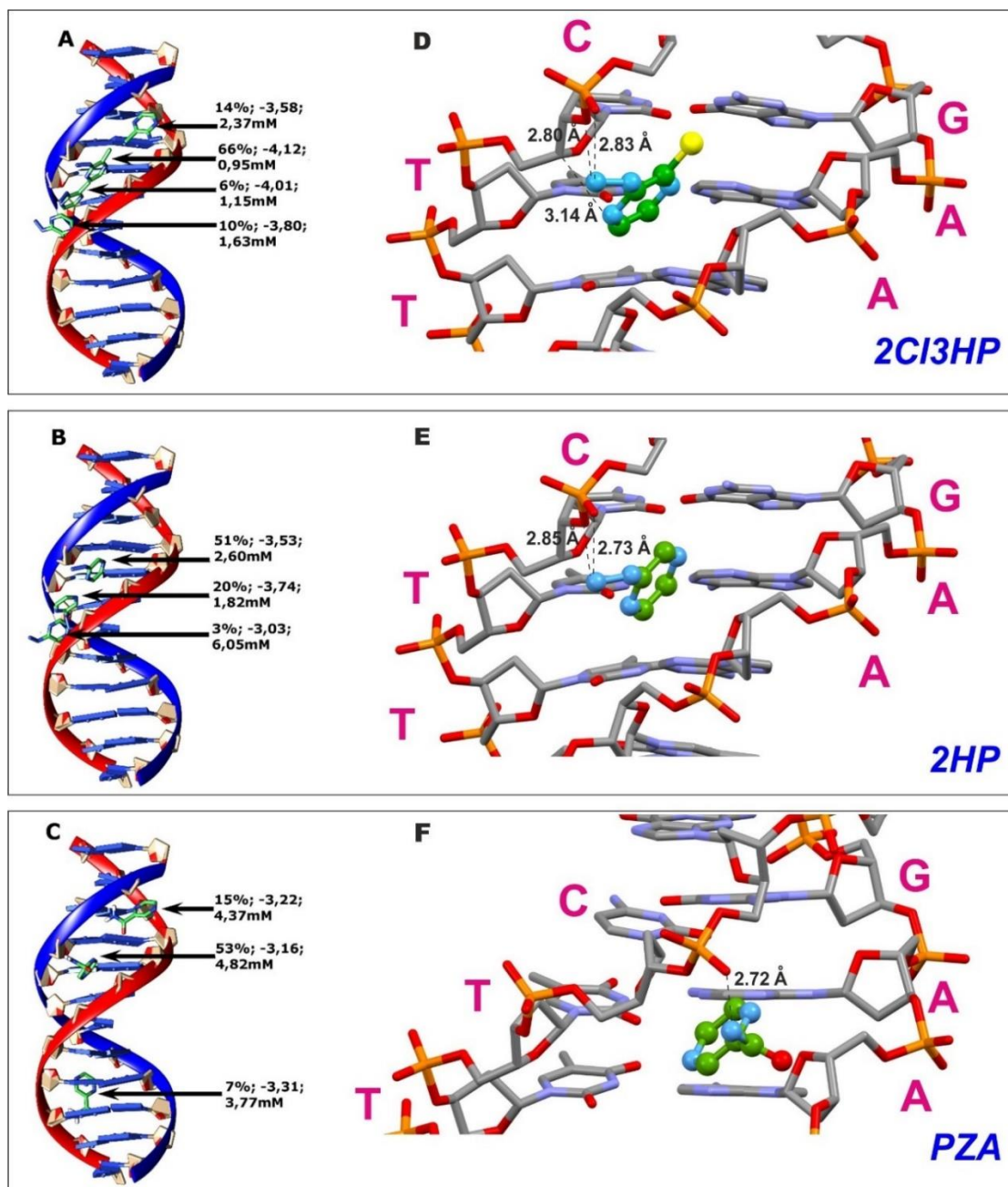
5.1.6 Oddziaływania z DNA

Badania rozpoczęłam od optymalizacji geometrii wybranych ligandów. Zoptymalizowane struktury zostały użyte w symulacjach modelowania molekularnego. Przeprowadzone zostały symulacje oddziaływania 2-chloro-3-hydrazynopirazyny (2Cl3HP), 2-hydrazynopirazyny (2HP) i pirazynamidu (PZA) z B-DNA. Dokowanie PZA posłużyło jako badanie referencyjne ze względu na jego znaną aktywność i dobrze scharakteryzowany mechanizm działania jako leku przeciwgruźliczego. Dominujące kompleksy B-DNA-ligand uzyskane w wyniku dokowania wraz ze szczegółowymi oddziaływaniami i ważnymi długościami wiązań przedstawia **Rysunek 29**. Porównując populacyjne występowanie układu DNA-ligand można jednoznacznie stwierdzić, że największe powinowactwo do DNA wykazuje 2Cl3HP (66% dokowań). Dominująca struktura kompleksów 2HP i PZA z DNA wynosi nieco ponad 50%, a PZA różni się od 2HP tylko o 2%. Istotne jest również uwzględnienie energii adduktu, która wskazuje na stabilność powstałego układu, a którą można brać pod uwagę w analizie ze względu na porównywalność wyników uzyskanych poprzez dokowanie molekularne wykonane w identycznych warunkach obliczeniowych. Addukty 2Cl3HP-DNA i PZA-DNA mają zbliżoną względną energię. Energia pierwszego (3,74 kcal/mol) jest niższa niż drugiego (3,16 kcal/mol) tylko o około 0,37 kcal/mol. Dopiero kolejny wskaźnik, obliczona w programie stała inhibicji, pozwala na stwierdzenie, który z tych dwóch ligandów wykazuje większe powinowactwo do DNA.

W porównaniu do 2Cl3HP, 2HP ma znacznie wyższą stałą inhibicji (4,82 mM). Wyznaczone doświadczalnie wartości stałych oddziaływania zarówno 2Cl3HP, jak i 2HP z DNA były jakościowo zgodne z wynikami teoretycznymi, przy czym wyższą wartość uzyskano dla pochodnej chlorkowej [116]. Świadczy to o większym powinowactwie 2Cl3HP do DNA w oparciu o większą wartość stałej wiązania. Na podstawie uzyskanych wyników można uszeregować badane ligandy w kolejności zmniejszającego się powinowactwa do DNA w następującej kolejności: 2Cl3HP > 2HP > PZA.

Wszystkie badane w tej pracy cząsteczki oddziałują z B-DNA w małym rowku, co potwierdzają addukty przedstawione na **Rysunku 29 (D-F)**. Miejscem oddziaływania badanych związków jest charakterystyczna wnęka utworzona przez trzy pary nukleotydów: GC, AT, AT (**Rysunek 29**). Jak wiadomo kształt wnęki powinien odpowiadać strukturze ligandów. W tym przypadku zaobserwowałam doskonałe dopasowanie wnęki i ligandów. Wszystkie trzy badane związki wiążą się dokładnie w tym samym miejscu. Oddziaływania między cząsteczkami a rowkiem DNA można

scharakteryzować jako niespecyficzne oddziaływania π - π między dwoma pierścieniami deoksyrybozy i ułożonym między nimi pierścieniem pirazyny (pierścienie są ułożone równolegle). Odległość między pierścieniami pirazyny i deoksyrybozy była we wszystkich przypadkach podobna i wahała się od 3,5 do 4 Å. Dodatkowo, w efekcie dopasowania się liganda do wnęki, w łańcuchu DNA można zauważyć obecność niespecyficznych wiązań wodorowych tworzonych przez ligand z anionem fosforanowym. Wiązania wodorowe między atomem tlenu fosforanu i zewnętrznym atomem wodoru podstawnika dla 2HP i PZA, natomiast w przypadku 2Cl3HP jedno z wiązań wodorowych powstało pomiędzy wolną parą elektronową atomu azotu N(7) a atomem wodoru grupy -CH w łańcuchu DNA. Odległości między atomami tlenu i azotu biorącymi udział w tworzeniu wiązania wodorowego wahały się w zakresie od 2,7 do 2,8 Å, a między atomami azotu i węgla były równe ok. 3,1 Å.



Rysunek 29. Modele kompleksów DNA-ligand uzyskane w wyniku symulacji dokowania molekularnego dla: (A) 2Cl3HP, (B) 2HP i (C) PZA z B-DNA. Dla każdego otrzymanego modelu podano populacyjną częstość występowania [%], energię swobodną Gibbsa [kcal/mol] oraz stałą inhibicji [mM] obliczone w programie AutoDock 4.2. Szczegółowe oddziaływania zoptymalizowanych struktur (D) 2Cl3HP, (E) 2HP i (F) PZA z B-DNA wraz ze znacznymi odległościami [Å] gdzie różowe symbole oznaczają: C - cytozyna, G - guanina, T - tymina, a A - adenina. Dla ligandów zastosowano następującą kolorystykę: zielony - węgiel, niebieski - azot, czerwony - tlen [116].

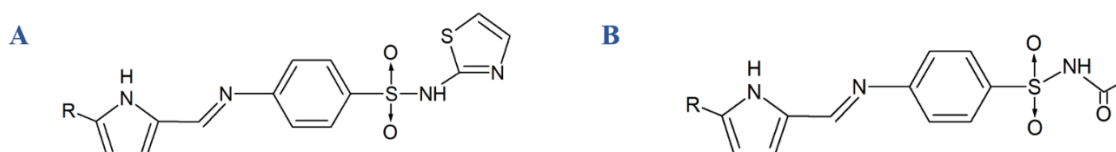
Źródła literaturowe podają, że projektowanie leków oparte na analizie struktury jest stosowane w przemyśle farmaceutycznym od wielu lat jako wiodące podejście do identyfikacji związków i opracowywania nowych środków terapeutycznych [67, 99, 126, 127]. Kwasy nukleinowe stanowią przeważnie cel molekularny chemioterapeutyków czy leków przeciwnowotworowych, czego odkrycie doprowadziło do projektowania i opracowywania leków ukierunkowanych na kwasy nukleinowe zarówno w leczeniu chorób genetycznych jak i nabytych. Obecnie, w bazach danych strukturalnych można znaleźć wiele informacji o specyficznych miejscach wiązania ligand-kwas nukleinowy. Według badań [128], związkami które oddziałują głównie w mniejszym rowku są poliamidy lub związki heterocykliczne, takie jak na przykład DAPI, Hoechst 33258 (barwnik fluorescencyjny), berenil (lek przeciwinfekcyjny stosowany u zwierząt), dystamycyna (lek cytotoksyczny i przeciwnowotworowy) czy pentamidyny (przeciwdrobnoustrojowe). Związki te preferują obszary DNA bogate w adeninę (A) i tyminę (T), w późniejszym czasie zostały zmodyfikowane w celu rozszerzenia ich oddziaływania z innymi parami nukleotydów (TA, GC i CG) [129, 130]. Dla związków o potencjalnej aktywności biologicznej lub terapeutycznej należy określić prawdopodobny obszar wiązania z DNA. Związki mogą być także projektowane z uwzględnieniem możliwych oddziaływań we fragmencie mającym stanowić cel molekularny leku. Badane w pracy związki oddziałują z DNA we wnęce tworzonej przez pary nukleotydów GC i AT i pod tym względem wykazują podobieństwo do wymienionych związków aktywnych.

Nawiązując do wspomnianych wcześniej właściwości HCA, tworzenie się adduktów z DNA przez badane związki może mieć decydujące znaczenie dla ich aktywności. Kierując się tym, dzięki współpracy z Wydziałem Biotechnologii UG i GUMed oraz Wydziałem Chemicznym Politechniki Gdańskiej zbadano cytotoksyczność oraz aktywność przeciwdrobnoustrojową 2HP oraz 2Cl3HP [112, 113]. Badania te wykazały brak wspomnianych aktywności. Zbadanie działania adduktów badanych pochodnych z DNA na komórki ludzkie wydaje się obiecującym kierunkiem dalszych badań.

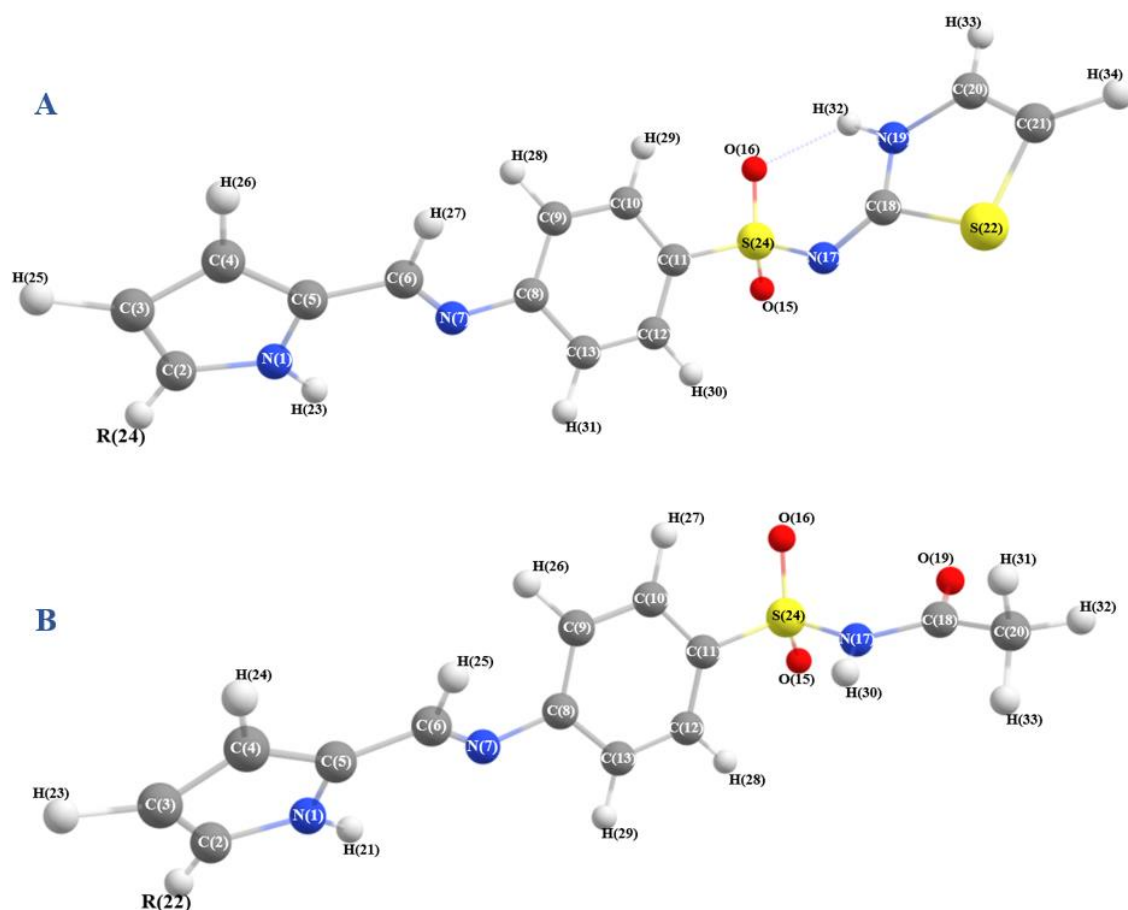
5.2 Pochodne sulfonamidowe

5.1.1 Analiza strukturalna

Drugą grupą związków wybranych do badań w niniejszej pracy są *N*-heterocykliczne pochodne sulfonamidowe – zmodyfikowane związki o znanej aktywności biologicznej poprzez otrzymanie zasad Schiffa z furfurałem przyłączonym przez grupę aminową przy pierścieniu benzenowym sulfatiazolu (ScB_A) i sulfacetamidu (ScB_B). Struktury omawianych związków przedstawia poniższy **Rysunek 30** (R oznacza podstawnik bromkowy bądź atom wodoru).



Rysunek 30. Proponowane struktury badanych pochodnych, zasad Schiffa: **A.** – sulfatiazolu ScB_A i **B.** – sulfacetamidu ScB_B. R=H (związek ScB_AH/BH) lub R=Br (związek ScB_ABr/BBr).

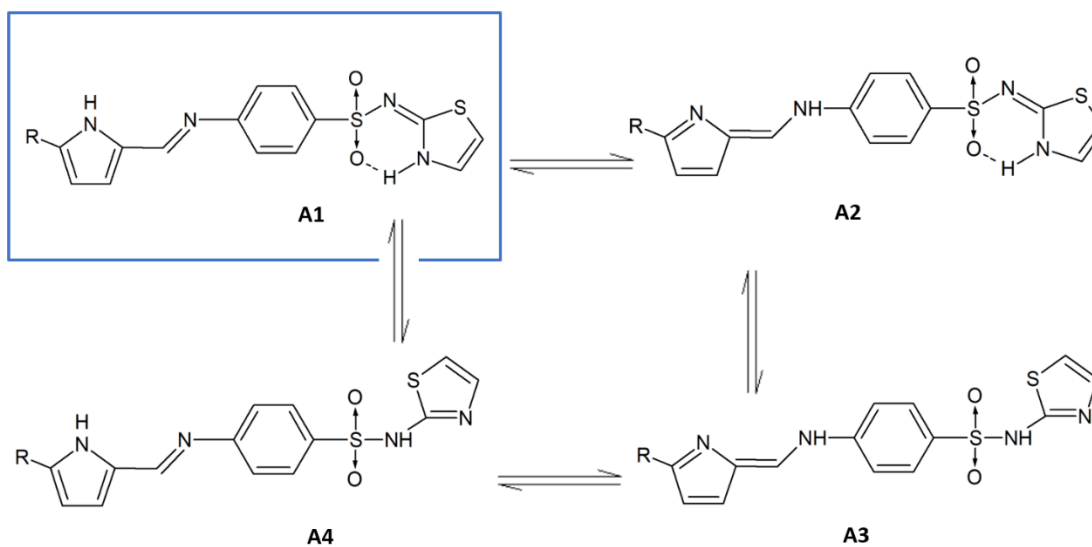


Rysunek 31. Zoptymalizowane struktury badanych pochodnych: **A.** ScB_A i **B.** ScB_B wraz z numeracją atomów (na przykładzie związków AH i BH).

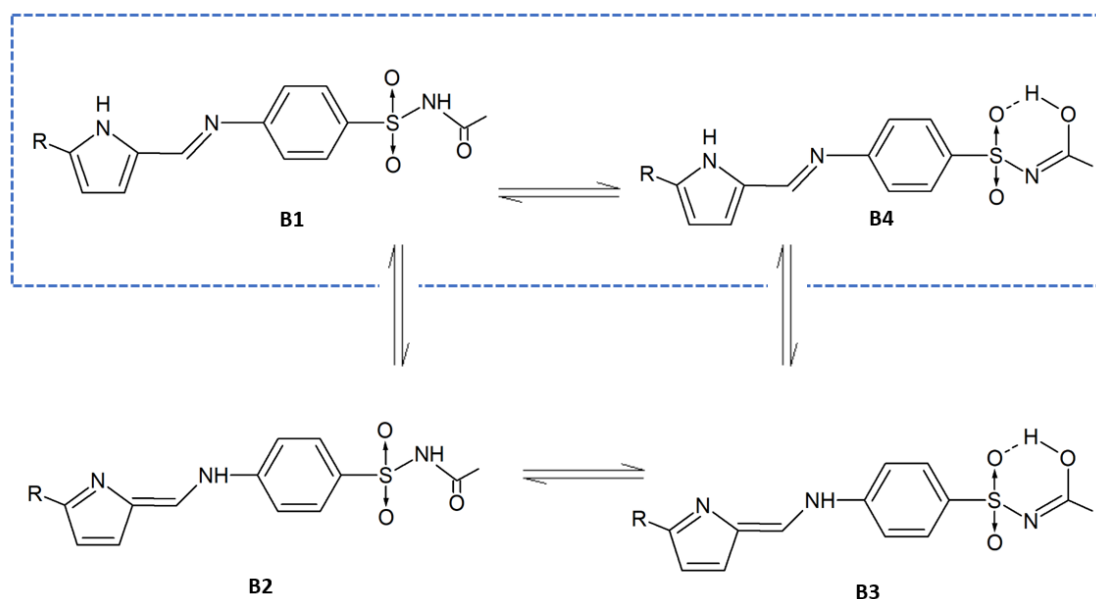
W badaniach struktury powyższych związków uwzględniono możliwość występowania zjawiska tautomerii. Jest to ważny element analizy strukturalnej, szczególnie biorąc pod uwagę związki stanowiące pochodne sulfonamidowe. Podobne zjawisko było już przeze mnie badane dla innej pochodnej sulfonamidowej. Umożliwiło to opracowanie procedury badań do wykorzystania przy kolejnych pochodnych. Wyniki tych badań wskazały ścieżkę rozważań możliwych równowag tautomerycznych dla tej grupy związków oraz wykazały możliwość tworzenia się wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych stabilizujących strukturę tautomeru [131].

W obydwu pochodnych (ScB_A i ScB_B) występuje tautomeria amino-iminowa, której ulegają -NH- pirolu i atom azotu łączący go z pierścieniem benzenu. Ponadto temu samemu rodzajowi tautomerii ulegają sulfonamidowa grupa NH i atom azotu pierścienia tiopirolu związku ScB_A; sulfonamidowa grupa NH. Ponadto sulfonamidowa grupa NH oraz grupa karbonylowa w cząsteczce ScB_B ulegają tautomerii keto-enolowej.

Rozpatrując wszystkie możliwe równowagi tautomeryczne zaproponowano po cztery formy tautomeryczne związków ScB_A i ScB_B. Struktury tautomerów przedstawiono na poniższych **Rysunkach 32 i 33**. Niebieską ramką zaznaczono najniżej energetyczne formy tautomeryczne.



Rysunek 32. Formy tautomeryczne związku ScB_A.



Rysunek 33. Formy tautomeryczne związku ScB_B.

Dla związku ScB_A najniższą energetyczną jest to forma A1. Natomiast w przypadku związku ScB_B tautomery BH1 i BH4 różnią się jedynie o 2,37 kcal/mol co pozostaje wartością mieszczącą się w granicy błędów obliczeń, w związku z czym obie formy można uznać za równie prawdopodobne (na **Rysunku 33** obie objęto niebieską ramką). Z kolei w przypadku pochodnej ScB_BBr wszystkie formy tautomeryczne mają wartości względnych energii poniżej 4 kcal/mol w odniesieniu do BBr1 (0,00 kcal/mol), co świadczy o ich znacznym i porównywalnym udziale w rzeczywistej strukturze związku.

Wejściowe geometrie wszystkich tautomerów zoptymalizowano w fazie gazowej metodą M06/6-311++G(2d,2p). Zoptymalizowane struktury tautomerów ScB_A i ScB_B (łącznie 16) zawiera **Tabela S3** w załączniku. Otrzymane w wyniku przeprowadzonych symulacji DFT wartości energii swobodnych Gibbsa przedstawiono w **Tabeli S4** w załączniku, natomiast wartości względnych energii swobodnych przeliczonych na kcal/mol zawierają **Tabela 10** (dla ScB_AH i ScB_BH) oraz **Tabela 11** (dla ScB_ABr i ScB_BBr). Wyniki optymalizacji uzyskane z badań w modelu rozpuszczalnikowym wody są zbliżone i nie umieszczono ich w pracy. Wyjątek stanowi pochodna ScB_BH, w przypadku której w fazie gazowej najniższym energetycznym tautomerem jest BH4 (energia względna niższa tylko o 2,37 kcal/mol niż dla BH1), natomiast w wodzie jest to BH1 (energia względna niższa o 5,88 kcal/mol niż BH4). Biorąc pod uwagę niewielką różnicę względnej energii swobodnej w fazie gazowej i niższą w wodzie

tautomer BH4 został wybrany do przeprowadzenia rozważań form jonowych oraz właściwości kwasowo-zasadowych w dalszej części pracy.

Tabela 10. Wartości względnych energii swobodnych Gibbsa w kcal/mol tautomerów związku AH oraz BH gdzie R to atom wodoru.

R=H	Tautomer			
	Pochodna ScB_AH			
	AH1	AH4	AH2	AH3
ΔG [kcal/mol]	0,00	7,20	8,37	15,98
	Pochodna ScB_BH			
	BH1	BH4	BH3	BH2
ΔG [kcal/mol]				
f. gazowa/woda	2,37/ 0,00	0,00 /5,88	10,22	11,81

Tabela 11. Wartości względnych energii swobodnych Gibbsa w kcal/mol tautomerów związku ABr i BBr gdzie R to atom bromu.

R=Br	Tautomer			
	Pochodna ScB_ABr			
	ABr1	ABr2	ABr3	ABr4
ΔG [kcal/mol]	0,00	3,66	4,22	7,22
	Pochodna ScB_BBr			
	BBr1	BBr3	BBr2	BBr4
ΔG [kcal/mol]	0,00	1,54	2,13	3,83

Najniżej energetycznym tautomerem zasady Schiffa sulfatiazolu jest A1, zarówno z podstawnikiem bromkowym jak i atomem wodoru (ScB_AH i ScB_ABr). Ta przeważająca energetycznie struktura posiada grupę iminową przy pierścieniu benzenowym a także w grupie sulfonamidowej. Ponadto w zoptymalizowanych strukturach A1 i A2 występują wiązania wodorowe tworzone przez grupę aminową tiazolu i atom tlenu grupy sulfonamidowej (N-H \cdots O), co z pewnością wyjaśnia niskie wartości energii tych układów. Struktura A1, faworyzującą formy iminiowe, jest dodatkowo stabilizowana poprzez obecność sprzężonego układu wiązań podwójnych w całej cząsteczce związku. Najwyżej energetycznie struktura, a więc najmniej stabilna, tautomeru AH3 posiada formę enaminową w obydwu wymienionych wyżej fragmentach związku. Z kolei w obecności podstawnika bromkowego najmniej stabilny energetycznie tautomer (ABr4) przyjmuje formę enaminową w grupie sulfonamidowej. Tautomery AH2 i AH3 oraz ABr2-ABr4 charakteryzuje niewielka względna energia swobodna

w porównaniu do przeważającego energetycznie tautomeru AH1, która wynosi między 3,66 a 8,37 kcal/mol. Forma AH3 niepodstawionego związku ScB_A energetycznie różni się najbardziej i może to świadczyć o najmniej częstym występowaniu związku w tej formie.

Dominującą w rzeczywistej strukturze związku formę tautomeryczną związku ScB_B (B1) charakteryzuje grupa iminowa przy pierścieniu benzenowym oraz keto-aminowa w obrębie grupy acetamidowej. Warto zauważyć, że dla związku niepodstawionego (ScB_BH) forma ta przeważa w roztworze wodnym, z kolei w fazie gazowej najniższą energetycznie jest tautomer BH4 (z grupą enaminową przy pierścieniu benzenowym) różniący się od BH1 tylko o 2,37 kcal/mol, o czym pisałam już wcześniej. W tautomerze BH4 występuje wiązanie wodorowe O-H...O pomiędzy grupą enolową i atomem tlenu grupy sulfonamidowej. Forma enolowa, zaangażowana w wiązanie wodorowe przy obecności formy enaminowej przy pierścieniu benzenowym dla niepodstawionego związku ScB_BH jest najmniej korzystna energetycznie, tautomer BH3 posiada wysoką względną energię (10,22 kcal/mol). Najwyższym energetycznym tautomerem jest BH2, z podwójną formą enaminową (energia względna wynosi 11,81 kcal/mol). Podstawiony związek ScB_BBr wykazuje niewielkie różnice energii między tautomerami (1,54 – 3,83 kcal/mol), co może świadczyć o wpływie podstawnika bromkowego na łatwość występowania zjawiska tautomeryzacji. Tak niewielkie różnice wskazują na znaczący udział w strukturze związku wszystkich tautomerów występujących ze sobą w dynamicznej równowadze, z niewielką przewagą formy B1.

Biorąc pod uwagę obie pochodne otrzymane jako zasady Schiffa pirolu można zauważyć, że w obydwu przypadkach dominującą formą tautomeryczną jest iminowa w sąsiedztwie pierścienia benzenu oraz aminowa/enaminowa w grupie sulfonamidowej. Formy A1 i B1 mają największy udział w rzeczywistej strukturze zarówno dla niepodstawionych związków jak i przy obecności podstawnika bromkowego w pierścieniu pirolu.

W **Tabeli 12** poniżej zestawiono długości wiązań zoptymalizowanych struktur związków ScB_AH, ScB_ABr, ScB_BH i ScB_BBr. Wartości dotyczą najniższych energetycznych układów. Wiązania C-C i C-N w aromatycznym pierścieniu pirolu mają długości w zakresie 1,352 – 1,407 Å, a z atomami wodoru 1,007 – 1,079, gdy R=H. Wiązanie C-Br ma długość 1,867 Å zarówno w ABr jak i BBr. Wiązania C-C w aromatycznym pierścieniu benzenu mają długości w zakresie 1,377 – 1,400 Å, a z atomami wodoru 1,083 – 1,084 Å. Podobnie jest w pierścieniu tiopirolu związku

ScB_A. Wiązanie C-N ugrupowania iminiowego pomiędzy pierścieniem pirolu i benzenu ma długość ok. 1,28 Å, co świadczy o wiązaniu podwójnym pomiędzy tymi atomami. Wiązanie pomiędzy siarką i atomami tlenu w grupie sulfonamidowej ma długość ok. 1,43 Å i wydłuża się do ok. 1,46 Å w przypadku zaangażowania atomu tlenu w wiązanie wodorowe w związku ScB_A. Wiązanie N17-C18 ma długość 1,290 Å w związku ScB_A i 1,394 Å w związku ScB_B. W przypadku ScB_A jest to długość odpowiadająca wiązaniu podwójnemu, natomiast w ScB_B wiązaniu pojedynczemu, co odpowiada strukturom tautomerów ScB_A1 i ScB_B1, jak widać na **Rysunkach 32 i 33**. Z kolei wiązanie S14-N17 jest skrócone i ma długość ok. 1,64 Å w ScB_A w porównaniu z 1,708 Å w ScB_B. Wiązanie C18-O19 w ScB_B ma długość 1,199 Å, tak więc jest to wiązanie podwójne. Zauważalne jest występowanie układu sprzężonych wiązań, naprzemienne o charakterze pojedynczego oraz podwójnego, stabilizujące strukturę wszystkich badanych związków.

Tabela 12. Długości wiązań zoptymalizowanych w fazie gazowej struktur tautomerów A1 i B1 związków ScB_A i ScB_B zgodnie z numeracją przedstawioną na **Rysunku 31**.

Długość wiązania [Å]					
związek			związek		
Atomy	AH1	ABr1	Atomy	BH1	BBr1
N1-C2	1,356	1,353	N1-C2	1,355	1,352
C2-C3	1,377	1,374	C2-C3	1,378	1,376
C3-C4	1,406	1,407	C3-C4	1,405	1,405
C4-C5	1,382	1,381	C4-C5	1,383	1,382
C5-N1	1,370	1,373	C5-N1	1,371	1,373
C5-C6	1,429	1,429	C5-C6	1,426	1,426
C6-N7	1,277	1,276	C6-N7	1,278	1,278
N7-C8	1,393	1,394	N7-C8	1,390	1,390
C8-C9	1,396	1,400	C8-C9	1,398	1,397
C9-C10	1,383	1,383	C9-C10	1,382	1,382
C10-C11	1,383	1,383	C10-C11	1,385	1,385
C11-C12	1,388	1,390	C11-C12	1,389	1,390
C12-C13	1,377	1,377	C12-C13	1,377	1,377
C13-C8	1,397	1,397	C13-C8	1,398	1,398
C11-S14	1,763	1,764	C11-S14	1,763	1,764
S14-O15	1,435	1,435	S14-O15	1,430	1,429
S14-O16	1,458	1,458	S14-O16	1,433	1,433
S14-N17	1,639	1,638	S14-N17	1,708	1,708
N17-C18	1,290	1,290	N17-C18	1,394	1,394
C18-N19	1,359	1,359	C18-O19	1,199	1,199
N19-C20	1,378	1,378	C18-C20	1,504	1,504
C20-C21	1,335	1,335	N1-H21	1,007	1,008
C21-S22	1,749	1,749	C2-R22	1,078	1,867
S22-C18	1,762	1,762	C3-H23	1,077	1,077
N1-H23	1,007	1,008	C4-H24	1,079	1,079
C2-R24	1,078	1,867	C6-H25	1,098	1,078
C3-H25	1,077	1,077	C9-H26	1,084	1,083
C4-H26	1,079	1,079	C10-H27	1,083	1,083
C6-H27	1,098	1,098	C12-H28	1,083	1,083
C9-H28	1,084	1,084	C13-H29	1,083	1,083
C10-H29	1,083	1,083	N17-H30	1,010	1,010
C12-H30	1,083	1,083	C20-H31	1,087	1,087
C13-H31	1,083	1,083	C20-H32	1,092	1,093
N17-H32	1,016	1,016	C20-H33	1,092	1,091
O16-H32	1,930	1,927			
C20-H33	1,079	1,079			
C21-H34	1,076	1,076			

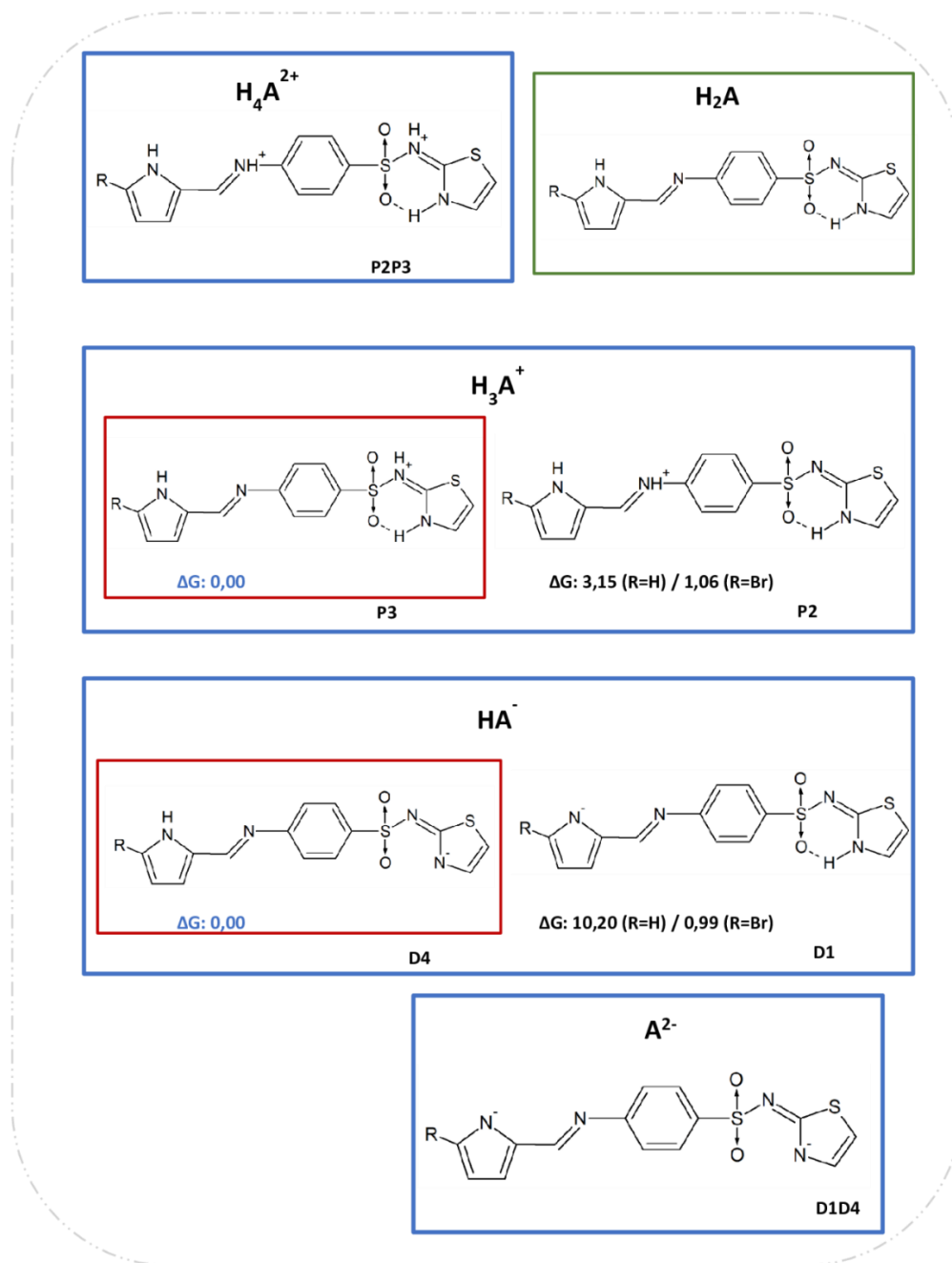
5.1.2 Ustalenie form jonowych

Na podstawie energetycznej analizy form tautomerycznych, wybrano te których udział w rzeczywistej strukturze związku jest największy (tj. A1 i B1). Mimo obecności w nich form iminowych, które zwykle są mniej podatne na protonowanie, ustalenie form jonowych oraz określenie właściwości kwasowo-zasadowych związku oparto na tych właśnie formach tautomerycznych.

W celu ich znalezienia form jonowych obecnych w roztworze wodnym zbudowano i zoptymalizowano możliwe struktury wejściowe. Pochodna ScB_A posiada kilka atomów, które mogą ulegać protonowaniu lub deprotonowaniu i w środowisku wodnym są to heteroatomy azotu, siarki bądź tlenu. Znaleziono jednak tylko cztery możliwe miejsca jonizacji, w tym dwa protonowania (oznaczane jako P2 i P3) na **Rysunku 34** obrazuje je forma $[H_4A^{2+}]$ oraz dwa deprotonowania (oznaczane jako D1 i D4) na **Rysunku 34** obrazuje je forma $[A^{2-}]$. Struktury wszystkich zaproponowanych form jonowych wraz z ich względnymi swobodnymi energiami Gibbsa (jeśli znaleziono więcej niż jedną) wyrażonymi w kcal/mol przedstawia **Rysunek 34**. Bezwzględne wartości energii swobodnych Gibbsa zestawiono w **Tabeli S5** w załączniku.

Tam gdzie znaleziono więcej niż jedną formę jonową tj. jednosprotonowaną oraz jednozdeprotonowaną, energie zostały porównane z wartością otrzymaną dla układu najniższej energetycznego w każdym stopniu jonizacji. Nie udało się znaleźć stabilnej formy posiadającej sprotonowane atomy tlenu lub siarki. Struktury sprotonowane oznaczone jako $[H_4A^{2+}]$ posiadają dwa protony. Istnieje tylko jedna możliwość ich rozmieszczenia w obrębie cząsteczki ScB_A (na atomach azotu w łańcuchach). Układy $[H_3A^+]$ są monosprotonowane i w tym przypadku są dwie możliwości rozmieszczenia protonów. Strukturę przeważającą oznaczono czerwoną ramką. Proton znajduje się na jednym z dwóch atomów azotu w łańcuchu (P2 lub P3). Jak wynika z porównania stabilności energetycznej bardziej prawdopodobne jest sprotonowanie atomu azotu w sąsiedztwie pierścienia pirolu (P2) – układ charakteryzuje energia swobodna niższa o 3,15 kcal/mol gdzie podstawnik R to atom wodoru oraz o 1,06 kcal/mol, gdzie R to podstawnik bromkowy. Jednakże wartości energii tych form różnią bardzo niewiele, co świadczy o ich występowaniu w równowadze z formą dominującą. Deprotonowaniu mogą ulegać dwa atomy azotu: w pierścieniu pirolu (D1) oraz w pierścieniu tiopirołu (D4). Strukturę dominującej cząstki zdeprotonowanej zaznaczono na **Rysunku 34** czerwoną ramką. Bardziej prawdopodobne jest zdeprotonowanie atomu azotu w pierścieniu tiopirołu (D4) – układ charakteryzuje energia swobodna niższa

o 10,20 kcal/mol gdzie podstawnik R to wodór oraz o 0,99 kcal/mol, gdzie R to podstawnik bromkowy. Jednakże wartość względnej energii tych form przy obecności podstawnika bromkowego jest bardzo niewielka, co świadczy o jej występowaniu w równowadze z formą dominującą. Struktury zdeprotonowane oznaczone na **Rysunku 34** jako $[A^{2-}]$ oddysocjowały dwa protony. Istnieją tylko dwa atomy, które mogą ulegać deprotonowaniu w obrębie cząsteczki ScB_A (D1 i D4). Strukturę obojętnej cząstki zaznaczono na **Rysunku 34** zieloną ramką.



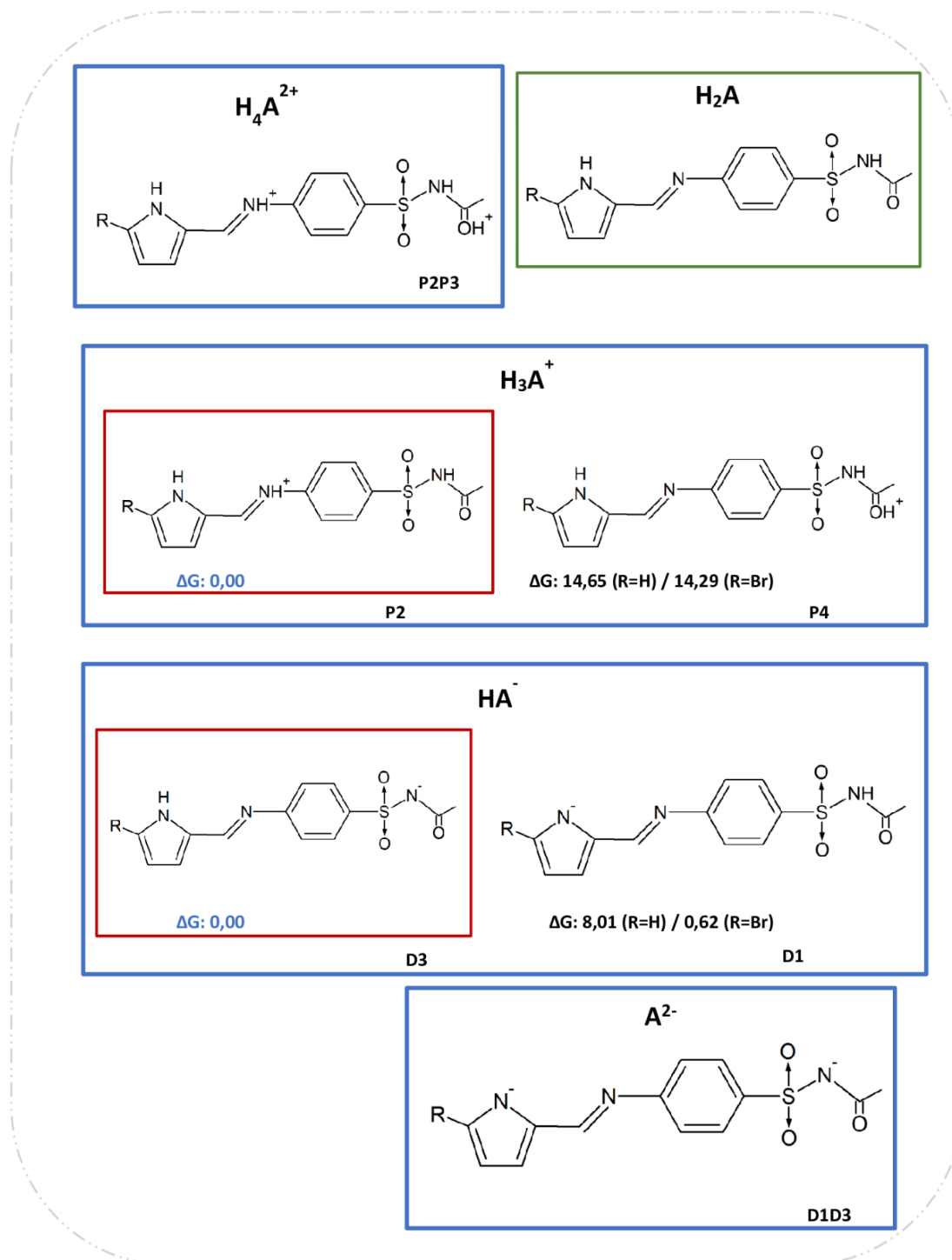
Rysunek 34. Formy jonowe związku ScB_A wraz z wartościami względnych energii swobodnych Gibbsa w odniesieniu do najniższej energetycznej struktury na danym poziomie zjonizowania [kcal/mol].

Pochodna ScB_B także posiada kilka atomów, które mogą ulegać protonowaniu lub deprotonowaniu (heteroatomy azotu, siarki bądź tlenu). Analogicznie do związku ScB_A znaleziono cztery możliwe miejsca jonizacji, w tym dwa protonowania (oznaczone jako P2 i P4) na **Rysunku 35** obrazuje je forma $[H_4A^{2+}]$ oraz dwa deprotonowania (oznaczane jako D1 i D3) na **Rysunku 35** obrazuje je forma $[A^{2-}]$. Struktury wszystkich zaproponowanych form jonowych wraz z ich względnymi swobodnymi energiami Gibbsa (jeśli znaleziono więcej niż jedną) wyrażonymi w kcal/mol przedstawia **Rysunek 35**. Bezwzględne wartości energii swobodnych Gibbsa zestawiono w **Tabeli S6** w załączniku.

Nie udało się znaleźć stabilnej formy posiadającej sprotonowane atomy tlenu lub siarki grupy sulfonamidowej. Struktury sprotonowane oznaczone jako $[H_4A^{2+}]$ posiadają dwa protony. Istnieje tylko jedna możliwość ich rozmieszczenia w obrębie cząsteczki ScB_A (na atomie azotu w łańcuchu oraz atomie tlenu grupy acetamidowej). Układy $[H_3A^+]$ są monosprotonowane i w tym przypadku są dwie możliwości rozmieszczenia protonów w obrębie cząsteczki. Strukturę przeważającą oznaczono czerwoną ramką. Proton znajduje się na atomie azotu w sąsiedztwie pierścienia pirolu (P2) lub na atomie tlenu grupy acetamidowej (P4). Jak wynika z porównania stabilności energetycznej bardziej prawdopodobne jest sprotonowanie atomu azotu (P2) – układ charakteryzuje energia swobodna niższa o około 14 kcal/mol zarówno dla R stanowiącego atom wodoru jak i podstawnik bromkowy. Deprotonowaniu mogą ulegać dwa atomy azotu: w pierścieniu pirolu (D1) oraz NH w grupie sulfonamidowej (D3). Strukturę dominującej cząstki zdeprotonowanej zaznaczono na **Rysunku 35** czerwoną ramką. Bardziej prawdopodobne jest zdeprotonowanie atomu azotu grupy acetamidowej (D3) – układ charakteryzuje energia swobodna niższa o 8,01 kcal/mol gdzie podstawnik R to wodór oraz tylko o 0,62 kcal/mol, gdzie R to podstawnik bromkowy. Jednakże wartość względnej energii tych form przy obecności podstawnika bromkowego jest bardzo niewielka, co świadczy o jej występowaniu w równowadze z formą dominującą. Struktury zdeprotonowane oznaczone na **Rysunku 35** jako $[A^{2-}]$ oddysocjowały dwa protony. Istnieją tylko dwa atomy, które mają możliwość ulegać deprotonowaniu w obrębie cząsteczki ScB_B (D1 i D3). Strukturę obojętnej cząstki zaznaczono na **Rysunku 35** zieloną ramką.

Struktury przedstawione na **Rysunkach 34 i 35** (w przypadku możliwości kilku form te w ramkach), o najniższych względnych energiach swobodnych Gibbsa, stanowią najbardziej prawdopodobne zjonizowane formy badanych związków, których obecności

w roztworze można oczekiwać i mogą być zaangażowane w równowagi kwasowo-zasadowe. Na ich podstawie z modelu teoretycznego wyznaczono wartości stałych pKa opisujące liczbowo właściwości kwasowo-zasadowe związków.



Rysunek 35. Formy jonowe związku ScB_B wraz z wartościami względnych energii swobodnych Gibbsa w odniesieniu do najniższej energetycznej struktury na danym poziomie zjonizowania [kcal/mol].

Jak opisano wcześniej, ze względu na niejednoznaczne wyniki analizy energetycznej tautomerów związku ScB_BH, ustalono także formy jonowe tautomeru BH4. Ich bezwzględne wartości energii swobodnych, a także energii względnych na danym stopniu zjonizowania zestawiono w **Tabeli 6** w załączniku. Na tej podstawie należało by założyć udział form P2P3 (dwusprotonowanej), P2 (jednosprotonowanej), D4 (zdeprotonowanej) oraz D1D4 (podwójnie zdeprotonowanej) w równowagach kwasowo-zasadowych związku w wodzie.

5.1.3 Wartości stałych kwasowo-zasadowych

Podobnie jak dla poprzednio opisanych związków, do wyznaczenia właściwości kwasowo-zasadowych zostało wybrane środowisko wodne. Na podstawie analizy energetycznej form jonowych (rozdział 5.1.2 *Formy jonowe*) zaproponowano model równowag zachodzących w roztworze wodnym, który przedstawiono w **Tabeli 12**. Szczegóły dotyczące procedury wyznaczania wartości pKa omówiono wcześniej w pracy w części 4. *Badania własne*.

Tabela 12. Proponowane, w oparciu o obliczenia teoretyczne, równowagi kwasowo-zasadowe występujące w środowisku wodnym. W odniesieniu do form jonowych przedstawionych na **Rysunkach 34 i 35**.

Formy jonowe zaangażowane w równowagę kwasowo-zasadową	Założony model reakcji bezpośredniej	Stale dysocjacji kwasowej
bikation / monokation	$H_4A^{2+} \rightleftharpoons H_3A^+ + H^+$	pKaH ₁
monokation / neutralna	$H_3A^+ \rightleftharpoons H_2A + H^+$	pKaH ₂
neutralna / monoanion	$H_2A \rightleftharpoons HA^- + H^+$	pKa ₃
monoanion / bianion	$HA^- \rightleftharpoons A^{2-} + H^+$	pKa ₄

Symulacje DFT dowiodły istnienia czterech równowag kwasowo-zasadowych w roztworze wodnym zarówno związku ScB_A jak i związku ScB_B. Obliczone wartości pKaH i pKa przedstawiono w **Tabeli 13** poniżej. Wartości stałych dysocjacji kwasowych wyznaczono w odniesieniu do proponowanego modelu równowag w układzie wodnym przedstawionego w **Tabeli 13** na podstawie wartości energii swobodnych Gibbsa dla najniższej energetycznych form jonowych przedstawionych na **Rysunkach 34 i 35**. Dla obydwu związków otrzymano po jednej wartości ujemnej, które można powiązać z występowaniem równowagi kwasowo-zasadowej w obrębie pierścienia pirolu. Stałą pKa₁ można przypisać to procesowi dysocjacji protonu z atomu azotu w pierścieniu pirolu. Drugorzędowa grupa aminowa NH ugrupowania sulfonamidowego zwykle posiada pKa około 6,5-7,5. W związku z czym stałą pKa₃ można przypisać równowadze, w której udział bierze grupa sulfonamidowa. Najwyższa wartość stałej (pKa₄) odpowiada

wielkościom podawanym w literaturze dla grupy aminowej, w tym przypadku drugorzędowej [132].

Tabela 13. Wartości stałych dysocjacji kwasowej (pKa) (**A**) ScB_A i (**B**) ScB_B gdzie R to atom wodoru (R=H) lub podstawnik bromkowy (R=Br), wyznaczone metodą DFT.

Związek	wartość pKaH/pKa			
	pKaH ₁	pKaH ₂	pKa ₃	pKa ₄
R=H				
ScB_AH	-6,34	3,44	8,45	18,67
ScB_BH	-13,62	4,81	6,17	18,35
R=Br				
ScB_ABr	-9,91	2,69	8,57	17,87
ScB_BBr	-13,78	3,16	5,91	12,24

Porównując wartości pKa związków z podstawnikiem bromkowym w pierścieniu pirolu oraz bez niego można zauważyć, że obecność bromku obniża wartości stałych pKa, za wyjątkiem pKa₃ dla pary ScB_AH i ScB_ABr. Jak wspomniano już wcześniej w pracy, elektroujemny podstawnik fluorowca należy do grupy elektronoakceptorowych o ujemnym efekcie indukcyjnym i dodatnim mezomerycznym. Obecność takiego podstawnika w układzie obniża jego zasadowość co przejawia się liczbowo obniżeniem wartości stałej pKaH/pKa. Można więc wnioskować, że również w przypadku pochodnych sulfonamidowych wpływ na obniżenie wartości stałych pKaH₁, pKaH₂ i pKa₄ pochodnych ScB_ABr i ScB_BBr ma bezpośrednio obecność podstawnika bromkowego.

Dla związku ScB_BH wyznaczono dodatkowo wartości stałych pKa na podstawie modelu dla form jonowych tautomeru BH₄, wartości przedstawia **Tabela S6** umieszczona w załączniku. Otrzymane wartości, dla kolejnych procesów deprotonowania (od formy podwójnie sprotonowanej do formy podwójnie zdeprotonowanej) nie stanowią szeregu przewidywanych zmian. Kolejne procesy przeniesienia protonów zaczynając formą maksymalnie sprotonowaną powinny odbywać się wraz ze wzrostem pH. Jak można zauważyć wartość pKa₃ (równowaga pomiędzy formą neutralną a D1) ma wartość niższą niż pKaH₂ (równowaga pomiędzy formą P3 a neutralną). Wyniki te stanowią dodatkowe potwierdzenie słuszności wyboru tautomeru BH1 do badań właściwości kwasowo-zasadowych.

Aktualnie nie istnieje idealny model służący do przewidywania wartości stałych pKa, który pozwalałby na uzyskanie wartości w pełni zgodnych z eksperymentem. Ponadto stosowanie niezbędnego w metodach obliczeniowych modelu mimikującego środowisko

np. wodne a także wszelkie przybliżenia stosowane w chemii teoretycznej powodują, że otrzymywane wyniki i wartości są obarczone błędami [56,133].

6. Podsumowanie

Dla badanych pochodnych pirazyny: 2-hydrazynopirazyny oraz jej chlorkowej pochodnej wykonano pełen zakres planowanych badań. Natomiast dla pochodnych sulfonamidowych wykonano badania strukturalne oraz określono właściwości kwasowo-zasadowe poprzez wyznaczenie wartości stałych dysocjacji kwasowej (pKa).

Właściwości fizykochemiczne 2-hydrazynopirazyny oraz jej chlorkowej pochodnej zostały zbadane poprzez: analizę struktury w tym tautomerii i występowania konformacji, właściwości kwasowo-zasadowych i lipofilowości. Zbadano także możliwe oddziaływania tych pochodnych z DNA. Dodatkowo, dzięki współpracy z Wydziałem Biotechnologii UG i GUMed oraz Wydziałem Chemicznym Politechniki Gdańskiej możliwe było zbadanie cytotoksyczności oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co opisano w pracach [115,116]. Na podstawie otrzymanych i omówionych w pracy wyników można sformułować następujące wnioski:

- I. Dowiedziono istnienia czterech stabilnych energetycznie konformerów 2HP oraz znaleziono 42 formy tautomeryczne, w tym 12 form prototropowych, z czego tylko trzy uczestniczą w strukturze na co wskazuje analiza energetyczna;
- II. Określono preferowanie miejsce podstawienia pierścienia pirazyny podstawnikiem chlorkowym i jest to pozycja druga względem grupy hydrazynowej;
- III. Zarówno 2HP jak i jej chlorkowa pochodna posiadają trzy możliwe atomy ulegające protonowaniu i jedno miejsce deprotonowania. Określono preferowane formy jonowe występujące w roztworze wodnym.
- IV. Zaproponowano model równowag kwasowo-zasadowych zachodzących w roztworze wodnym, który obejmuje cztery procesy deprotonowania (na podstawie analizy energetycznej form jonowych przy wsparciu badań eksperymentalnych);
- V. Wyznaczono wartości stałych pKa sprotonowanych form 2-hydrazynopirazyny oraz 2-chloro-3-hydrazynopirazyny;
- VI. Wyznaczono wartości współczynników podziału dla 2HP i 2Cl3HP, które jednoznacznie wykazały ich hydrofilowy charakter.
- VII. Badania oddziaływań z DNA wykazały, że miejscem oddziaływania jest mały rowek, a dokładnie charakterystyczna wnęka, którą tworzy układ trzech par

nukleotydów (GC, AT, AT). Te oddziaływania można opisać poprzez wiązanie specyficzne ze względu na miejsce, a także obecność niespecyficznych oddziaływania hydrofobowych i wiązań wodorowych. Ponadto 2Cl3HP wykazuje się najwyższą wartością powinowactwa do DNA wśród badanych pochodnych, co zostało jednoznacznie potwierdzone także za pomocą badań eksperymentalnych;

- VIII. Wykonane we współpracy badania biologiczne dowiodły braku cytotoksyczności obydwu pochodnych a także braku aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec wybranych bakterii i grzybów [115, 116]. Przyczyną może być problem z penetrowaniem barier biologicznych tj. błon (komórki) i ścian (mikroby), na co wskazuje wyznaczona hydrofilowość związku.

Dla pochodnych sulfonamidowych przeprowadzono analizę strukturalną z uwzględnieniem tautomeryzacji oraz badania właściwości kwasowo-zasadowych w roztworze wodnym. Na podstawie otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski:

- I. Znaleziono najbardziej stabilne energetycznie struktury badanych pochodnych;
- II. Zaproponowano po cztery formy tautomeryczne dla wszystkich czterech związków (ScB_AH, ScB_ABr, ScB_BH, ScB_BBr), wśród których przeważającą formą tautomeryczną jest iminowa w sąsiedztwie pierścienia benzenu oraz aminowa/enaminowa w grupie sulfonamidowej, zarówno dla niepodstawionych związków jak i przy obecności podstawnika bromkowego w pierścieniu pirolu.
- III. Ustalono po dwa miejsca protonowania oraz deprotonowania w cząsteczkach obydwu związków. Określono preferowane formy jonowe występujące w roztworze wodnym oraz na tej podstawie zaproponowano model równowag kwasowo-zasadowych zachodzących w roztworze wodnym obejmujący cztery procesy deprotonowania;
- IV. Wyznaczono wartości stałych dysocjacji pKa zasad Schiffa z sulfatiazolem i sulfacetamidem oraz ich bromkowych pochodnych.

Niniejsza praca stanowi pierwszy pełen opis struktury i właściwości badanych związków określonych na podstawie badań teoretycznych. Analiza uzyskanych wyników, a także porównanie ich z dostępnymi danymi eksperymentalnymi wskazują, że wykorzystanie badań *in silico* w omówionych obszarach jest jak najbardziej odpowiednie i daje zadowalające jakościowo wyniki. W przypadku badań strukturalnych, kluczowych dla aktywności biologicznej, jest to podejście lepsze od eksperymentu ze względu na możliwość rozważania struktur/form niemożliwych do otrzymania i poddania badaniom w roztworze czy ciele stałym.

7. Literatura

- [1] P.L. Skipper, M.Y. Kim, H.L. Patty Sun, G.N. Wogan, S.R. Tannenbaum, Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: Old is new again, *Carcinogenesis*. 31 (2009) 50–58. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp267>
- [2] G. Yu, D.Y. Baeder, R.R. Regoes, J. Rolff, Predicting drug resistance evolution: Insights from antimicrobial peptides and antibiotics, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285 (2018). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2687>
- [3] D.M. Lin, B. Koskella, H.C. Lin, Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance, *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 8 (2017) 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- [4] N. Kerru, L. Gummidi, S. Maddila, K.K. Gangu, S.B. Jonnalagadda, A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications, *Molecules*. 25 (2020) 1909. <https://doi.org/10.3390/molecules25081909>
- [5] J. McMurry, *Chemia organiczna*. Tom 4, Wyd. PWN, 2017, Rozdział 24. ISBN: 978-83-01-19456-7
- [6] R. T. Morrison, R. N. Boyd, *Chemia organiczna, TOM II*, Wyd. PWN, 2009, Rozdział 31. ISBN: 978-83-01-04166-3
- [7] T. Eicher, S. Hauptmann, A. Speicher, *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications*, Wyd. Wiley-VCH, 2003, Rozdziały: 1, 5-6. ISBN: 9783527601837
- [8] J.A. Joule, G. F. Smith, *Chemia związków heterocyklicznych*, Wyd. PWN, 1984, Rozdziały: 1, 3, 9, 15, 17, 22. ISBN: 83-01-04772-0
- [9] G.B. Barlin, *Chemistry of Heterocyclic Compounds: The Pyrazines*, Volume 41, Wyd. Wiley, 1982. ISBN: 978-0471381198
- [10] H.R. Nadeem, S. Akhtar, T. Ismail, P. Sestili, J.M. Lorenzo, M.M.A.N. Ranjha, L. Jooste, C. Hano, R.M. Aadil, Heterocyclic Aromatic Amines in Meat: Formation, Isolation, Risk Assessment, and Inhibitory Effect of Plant Extracts, *Foods*. 10 (2021) 1466. <https://doi.org/10.3390/foods10071466>
- [11] A. Woziwodzka, J. Piosik, Heterocykliczne aminy aromatyczne: Charakterystyka i znaczenie w indukcji procesów nowotworowych, *Biotechnologia*. 4 (2009) 133–151.
- [12] J.R. Bacon, G. Williamson, R.C. Garner, G. Lappin, S. Langouët, Y. Bao, Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes, *Carcinogenesis*. 24 (2003) 1903–1911. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg157>
- [13] D. Tang, J.J. Liu, A. Rundle, C. Neslund-Dudas, A.T. Savera, C.H. Bock, N.L. Nock, J.J. Yang, B.A. Rybicki, Grilled meat consumption and PhIP-DNA adducts in prostate carcinogenesis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16 (2007) 803–808. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0973>
- [14] D.T. Davies, *Aromatic Heterocyclic Chemistry*, Oxford Science Publications, 1992, Rozdziały: 2, 8. ISBN: 9780198556602
- [15] M.K. Liang, S. Patwardhan, E. Danilovtseva, V. Annenkov, C. Perry, Imidazole catalyzed silica synthesis: Progress toward understanding the role of histidine in (bio) silicification, *J. Mater. Res.* 24 (2009). <https://doi.org/10.1557/jmr.2009.0223>
- [16] E. Portenkirchner, C. Enengl, S. Enengl, G. Hinterberger, S. Schlager, D. Apaydin, H. Neugebauer, G. Knör, N.S. Sariciftci, A Comparison of Pyridazine and Pyridine as Electrocatalysts for the Reduction of Carbon Dioxide to Methanol, *ChemElectroChem*. 1 (2014) 1543–1548. <https://doi.org/10.1002/celec.201402132>

- [17] S. Ganguly, K. K. Kundu, Deprotonation energetics of purine and uric acid in water from emfmeasurements at different temperatures, *Indian Journal of Chemistry*. 34 (1995) 47–51.
- [18] M. Asif, The Pharmacological Importance of Some Diazine Containing Drug Molecules, *SOP Trans. Org. Chem.* 1 (2014) 1–17.
- [19] A. Ahmed, K.I. Molvi, S. Nazim, I. Baig, T. Memon, M. Rahil, The Importance of Six Membered Saturated Nitrogen Containing Ring in Psychological disorders, *J. Chem. Pharm. Res.* 4 (2012) 872–880.
- [20] A.D. Mills, M.Z. Nazer, M.J. Haddadin, M.J. Kurth, N,N-bond-forming heterocyclization: Synthesis of 3-alkoxy-2H-indazoles, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 2687–2689. <https://doi.org/10.1021/jo0524831>
- [21] K. Schofield, *Hetero-aromatic nitrogen compounds Pyrroles and Pyridines*, Wyd. Springer, 1967. ISBN: 978-1-4899-5892-1
- [22] I.J. Krems and P. E. Spoerri, *The Pyrazines.*, American Chemical Society, 106 (1972) 581–588. <https://doi.org/10.1021/cr60126a004>
- [23] S.B. Ferreira, C.R. Kaiser, Pyrazine derivatives: A patent review (2008 present), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 22 (2012) 1033–1051. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.714370>
- [24] J.H. Burn, *Essentials of Medical Pharmacology*, 1961, *Br Med J*, 2, 1131. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5260.1131>
- [25] L. Tůmová, J. Tůma, K. Megušar, M. Doležal, Substituted pyrazinecarboxamides as abiotic elicitors of flavolignan production in *Silybum marianum* (L.) gaertn cultures in Vitro, *Molecules*. 15 (2010) 331–340. <https://doi.org/10.3390/molecules15010331>
- [26] S. Demirayak, I. Kayagil, Synthesis of some 6,8-diarylimidazo[1,2-a]pyrazine derivatives by using either reflux or microwave irradiation method and investigation of their anticancer activities, *J. Heterocycl. Chem.* 42 (2005) 319–325. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570420224>
- [27] H. El-Kashef, T. El-Emary, P. Verhaeghe, P. Vanelle, M. Samy, Anticancer and anti-inflammatory activities of some new pyrazolo[3,4-b]pyrazines, *Molecules*. 23 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules23102657>
- [28] S.P. Vaijyanthi, N. Mathiyalagan, activities of N-chloropyrazinamide, 7 (2014) 1–8.
- [29] F. De Wael, G.G. Muccioli, D.M. Lambert, T. Sergent, Y.J. Schneider, J.F. Rees, J. Marchand-Brynaert, Chemistry around imidazopyrazine and ibuprofen: Discovery of novel fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 3564–3574. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.04.040>
- [30] B.G. Ghosh P., Chakraborty P., Antibacterial, antifungal and phytotoxic screening of some prepared pyrazine derivatives in comparison to their respective α -diketo precursors, *IJPSR*. 2 (2011) 1687–1692
- [31] T.I. El-Emary, A.M. Kamal El-Dean, H.S. El-Kashef, Facile synthesis of some new pyrazolo [3,4-b] pyrazines and their antifungal activity, *Farmaco*. 53 (1998) 383–388. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(98\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(98)00014-7)
- [32] C. H. S. Lima, M. G. M. O. Henriques, A. L. P. Candea, M. C. S. Lourenco, F. A. F. M. Bezerra, M. L. Ferreira, C. R. Kaiser, M. V. N. de Souza, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation of N-(E)-heteroaromaticpyrazine-2-carbohydrazide Derivatives, *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 7 (2011) 245–249. <https://doi.org/10.2174/157340611795564303>
- [33] M. Doležal, J. Zitko, D. Kešetovičová, J. Kuneš, M. Svobodová, Substituted N-phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and antimycobacterial evaluation, *Molecules*. 14 (2009) 4180–4189. <https://doi.org/10.3390/molecules14104180>

- [34] M.H. Cynamon, S.P. Klemens, T.S. Chou, R.H. Gimi, J.T. Welch, Antimycobacterial Activity of a Series of Pyrazinoic Acid Esters, *J. Med. Chem.* 35 (1992) 1212–1215. <https://doi.org/10.1021/jm00085a007>
- [35] M. Dolezal, P. Cmedlova, L. Palek, J. Vinsova, J. Kunes, V. Buchta, J. Jampilek, K. Kralova, Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1105–1113. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.07.013>
- [36] K. Gobis, H. Foks, A. Kędzia, M. Wierzchowska, E. Kwapisz, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopeć, Studies on pyrazine derivatives. XLVII. Synthesis and antibacterial activity of novel pyrazine derivatives with amidoxime moiety, *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 63 (2006) 39–45. ISSN 0001-6837
- [37] U.T. Yamamoto S., Toida I., Watanabe N., In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2088–2091. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.9.2088>
- [38] Y. Zhang, D. Mitchison, The curious characteristics of pyrazinamide: A review, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7 (2003) 6–21.
- [39] V. Chiş, A. Pîrnău, T. Jurcă, M. Vasilescu, S. Simon, O. Cozar, L. David, Experimental and DFT study of pyrazinamide, *Chem. Phys.* 316 (2005) 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2005.05.004>
- [40] A. Chylewska, M. Biedulska, A. Głębocka, E.D. Raczyńska, M. Makowski, Drug-like properties and complete physicochemical profile of pyrazine-2-amidoxime: A combined multi-experimental and computational studies, *J. Mol. Liq.* 276 (2019) 453–470. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.147>
- [41] M. Ogryzek, A. Chylewska, A. Królicka, R. Banasiuk, K. Turecka, D. Lesiak, D. Nidzworski, M. Makowski, Coordination chemistry of pyrazine derivatives analogues of: PZA: design, synthesis, characterization and biological activity, *RSC Adv.* 6 (2016) 52009–52025. <https://doi.org/10.1039/c6ra03068h>
- [42] A. Chylewska, A. Sikorski, M. Ogryzek, M. Makowski, Attractive S $\cdots\pi$ and $\pi\cdots\pi$ Interactions in the pyrazine-2-thiocarboxamide structure: Experimental and computational studies in the context of crystal engineering and microbiological properties, *J. Mol. Struct.* 1105 (2016) 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.10.032>
- [43] M. Dolezal, J. Zitko, Pyrazine derivatives: A patent review (June 2012-present), *Expert Opin. Ther. Pat.* 25 (2015) 33–47. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.982533>
- [44] R. J. Henry, The mode of action of sulfonamides, *Bacteriol. Rev.* 7 (1943) 175–262. <https://doi.org/10.1128/br.7.4.175-262.1943>
- [45] J. Ławecka, A. Kołaczek, D. Branowska, I. Fusiarz, Aktywność biologiczna i metody syntezy sulfonamidów (przegląd literaturowy), *Chemik.* 68 (2014) 620–628
- [46] F. Carta, et all, Sulfonamides : A patent review (2008-2012) Sulfonamides: a patent review, *Pub. Med.* (2016) 12–15. DOI: <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.698264>
- [47] A. Scozzafava, T. Owa, A. Mastrolorenzo, C. Supuran, Anticancer and Antiviral Sulfonamides, *Curr. Med. Chem.* 10 (2005) 925–953. <https://doi.org/10.2174/0929867033457647>
- [48] C.T. Supuran, Special issue: Sulfonamides, *Molecules.* 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22101642>
- [49] P. Pospisil, P. Ballmer, L. Scapozza, G. Folkers, Tautomerism in Computer-Aided Drug Design, *J. Recept. Signal Transduct.* 23 (2003) 361–371. <https://doi.org/10.1081/RRS-120026975>
- [50] T.W. Johnson, R.A. Gallego, M.P. Edwards, Lipophilic Efficiency as an Important Metric

- in Drug Design, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 6401–6420. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00077>
- [51] D.T. Manallack, R.J. Pranker, E. Yuriev, T.I. Oprea, D.K. Chalmers, The significance of acid/base properties in drug discovery, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 485–496. <https://doi.org/10.1039/c2cs35348b>
- [52] D.W. Newton, R.B. Kluza, pKa values of medicinal compounds in pharmacy practice, *Drug Intell. Clin. Pharm.* 12 (1978) 546–554. <https://doi.org/10.1177/106002807801200906>
- [53] S. Babić, A.J.M. Horvat, D. Mutavdžić Pavlović, M. Kastelan-Macan, Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1043–1061. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.004>
- [54] J. Reijenga, A. Van Hoof, A. Van Loon, B. Teunissen, Development of Methods for the Determination of pKa Values, *Anal. Chem. Insights.* 8 (2013) 53–71. <https://doi.org/10.4137/ACI.S12304>
- [55] Z. Qiang, C. Adams, Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, *Water Res.* 38 (2004) 2874–2890. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.017>
- [56] K.S. Alongi, G.C. Shields, Theoretical Calculations of Acid Dissociation Constants: A Review Article, Elsevier Masson SAS, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(10\)06008-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(10)06008-1)
- [57] A. Śliwińska, A. Pobudkowska, A. Kowalkowska, Physicochemical Characteristics of Dibromobenzimidazole Derivatives, *J. Solution Chem.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s10953-022-01153-3>
- [58] F.M. Carvalho, Y.A. de O. Só, A.S.K. Wernik, M. de A. Silva, R. Gargano, Accurate acid dissociation constant (pKa) calculation for the sulfachloropyridazine and similar molecules, *J. Mol. Model.* 27 (2021) 233. <https://doi.org/10.1007/s00894-021-04851-9>
- [59] D.A. Smith, Design of Drugs Involving the Concept and Theories of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 14 (1999) 56–58. https://doi.org/10.2133/dmpk.14.supplement_56
- [60] M.S. Roberts, W.J. Pugh, J. Hadgraft, A.C. Watkinson, Epidermal permeability-penetrant structure relationships: 1. An analysis of methods of predicting penetration of monofunctional solutes from aqueous solutions, *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 219–233. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04130-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04130-3)
- [61] Alessandra Pagliara, a G.L. Giulia Caron, W. Fan, P. Gaillard, B.T. Pierre-Alain Carrupt, M.H. Abraham, Solvatochromic analysis of di- n -butyl ether / water partition coefficients as compared to other solvent systems, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1997) 2639–2643
- [62] X. Liu, B. Testa, A. Fahr, Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation, *Pharm. Res.* 28 (2011) 962–977. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7>
- [63] J.C. Dearden, G.M. Bresnen, The Measurement of Partition Coefficients, *Quant. Struct. Relationships.* 7 (1988) 133–144. <https://doi.org/10.1002/qsar.19880070304>
- [64] C.C. Bannan, G. Calabró, D.Y. Kyu, D.L. Mobley, Calculating Partition Coefficients of Small Molecules in Octanol/Water and Cyclohexane/Water, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 4015–4024. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00449>
- [65] V. Pliška, B. Testa, H. van de Waterbeemd, Lipophilicity in Drug Action and Toxicology, *Lipophilicity Drug Action Toxicol.* 4 (2008) 1–438. <https://doi.org/10.1002/9783527614998>
- [66] A. Amar, H. Meghezzi, A. Boucekine, R. Kaoua, B. Kolli, How to drive imine-enamine tautomerism of pyronic derivatives of biological interest - A theoretical and experimental

- study of substituent and solvent effects, *Comptes Rendus Chim.* 13 (2010) 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.11.009>
- [67] A.R. Katritzky, C. Dennis Hall, B.E.D.M. El-Gendy, B. Draghici, Tautomerism in drug discovery, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 24 (2010) 475–484. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9359-z>
- [68] J. Elguero, A.R. Katritzky, O. V. Denisko, Prototropic tautomerism of heterocycles: Heteroaromatic tautomerism - General overview and methodology, *Adv. Heterocycl. Chem.* 76 (2000) 1–84. [https://doi.org/10.1016/S0065-2725\(00\)76003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2725(00)76003-X)
- [69] L.H. Hurley, DNA and its associated processes as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 188–200. <https://doi.org/10.1038/nrc749>
- [70] B. Zhang, K. Chen, N. Wang, C. Gao, Q. Sun, L. Li, Y. Chen, C. Tan, H. Liu, Y. Jiang, Molecular design, synthesis and biological research of novel pyridyl acridones as potent DNA-binding and apoptosis-inducing agents, *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.003>
- [71] A. Regiel-Futyra, J.M. Dąbrowski, O. Mazuryk, K. Śpiewak, A. Kyzioł, B. Pucelik, M. Brindell, G. Stochel, Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era, *Coord. Chem. Rev.* 351 (2017) 76–117. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.005>
- [72] S. Rauf, J.J. Gooding, K. Akhtar, M.A. Ghauri, M. Rahman, M.A. Anwar, A.M. Khalid, Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.10.037>
- [73] L. Streckowski, B. Wilson, Noncovalent interactions with DNA: An overview, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 623 (2007) 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.008>
- [74] R. Mehandi, R. Arif, M. Rana, S. Ahmedi, R. Sultana, M.S. Khan, M. Maseet, M. Khanuja, N. Manzoor, Rahisuddin, N. Nishat, Synthesis, characterization, DFT calculation, antifungal, antioxidant, CT-DNA/pBR322 DNA interaction and molecular docking studies of heterocyclic analogs, *J. Mol. Struct.* 1245 (2021) 131248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131248>
- [75] S. Goswami, R. Ghosh, P. Prasanthan, N. Kishore, Mode of interaction of altretamine with calf thymus DNA: biophysical insights, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2022) 1–13. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2054472>
- [76] C. Dykstra, G. Frenking, K. Kim, G. Scuseria, Theorey and applications of computational chemistry. The first forty years, Wyd. Elsevier B.V., 2005, Rozdziały: 1, 6, 10, 20. ISBN: 9780080456249
- [77] W. Hohenberg, P. Kohn, Inhomogenous Electron Gas, *Physical Review B.* 136 (1964) 864–871. DOI: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864>
- [78] W. Kohn, L.J. Sham, Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Phys. Rev.* 140 (1965) 1133–1138. DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133>
- [79] R. Haunschild, A. Barth, B. French, A comprehensive analysis of the history of DFT based on the bibliometric method RPYS, *J. Cheminform.* 11 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0395-y>
- [80] D. Bagayoko, Understanding density functional theory (DFT) and completing it in practice, *AIP Adv.* 4 (2014). <https://doi.org/10.1063/1.4903408>
- [81] W. Kohn, Nobel lecture: Electronic structure of matter - Wave functions and density functional, *Rev. Mod. Phys.* 71 (1999) 1253–1266. <https://doi.org/10.1103/revmodphys.71.1253>
- [82] A. Gołębiewski, *Elementy mechaniki i chemii kwantowej*, Wyd. Państwowe

- Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1982. ISBN: 83-01-02367-8
- [83] L. Piela, *Idee chemii kwantowej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2011. ISBN: 978-83-0114-000-7
- [84] W. Koch, M.C. Holthausen, *Wiley: A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, 2nd Edition - Wolfram Koch, Max C. Holthausen, 2001. <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-3527303723.html>
- [85] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys Rev B*. 37 (1988) 785–789
- [86] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06 Functionals and Twelve Other Functionals, *Theor Chem Account.* (2008) 120, 215–241. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00214-007-0310-x>
- [87] Y. Wang, P. Verma, X. Jin, D.G. Truhlar, X. He, Revised M06 density functional for main-group and transition-metal chemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) 10257–10262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810421115>
- [88] D. Gao, P. Svoronos, P.K. Wong, J. Maddalena, Deborah Hwang, H. Walker, pKa of Acetate in Water: A Computational Study, *J. Phys. Chem. A*, 2005, 109 (47), Pp 10776–10785. 109 (2005) 10776–10785. <https://doi.org/10.1021/jp053996e>
- [89] F. Jensen, *Introduction to computational chemistry*, Wyd. Wiley, 2007. ISBN: 978-0-470-05804-6
- [90] C.J. Cramer, *Essentials Of Computational Chemistry Theories And Models* -Christopher Cramer.pdf, Book. 43 (2004) 1720–1720. <https://doi.org/10.1021/ci010445m>
- [91] A. Klamt, C. Moya, J. Palomar, A Comprehensive Comparison of the IEFPCM and SS(V)PE Continuum Solvation Methods with the COSMO Approach, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 4220–4225. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00601>
- [92] R.C. Benedetta Mennucci, *Continuum Solvation Models in Chemical Physics: From Theory to Applications*, Wyd. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470515235>
- [93] B. Mennucci, Polarizable continuum model, *WIREs Comput Mol Sci* 2012,. 2 (2012) 386–404. <https://doi.org/10.1002/wcms.1086>
- [94] J. Miertus S., Scrocco E., Tomasi, Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of ab initio molecular potentials for the prevision of solvent effects, *Chem. Phys.* 55 (1981) 117–129. DOI: [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(81\)85090-2](https://doi.org/10.1016/0301-0104(81)85090-2)
- [95] A. V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 6378–6396. <https://doi.org/10.1021/jp810292n>
- [96] O. Silakari, P. Singh, Molecular docking analysis: Basic technique to predict drug-receptor interactions, in: 2021: pp. 131–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820546-4.00006-4>
- [97] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin, A geometric approach to macromolecule-ligand interactions, *J. Mol. Biol.* 161 (1982) 269–288. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90153-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90153-X)
- [98] F. Stanzione, I. Giangreco, J.C. Cole, Chapter Four - Use of molecular docking computational tools in drug discovery, in: D.R. Witt, Elsevier, 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>
- [99] J. Caballero, The latest automated docking technologies for novel drug discovery, *Expert*

- Opin. Drug Discov. 16 (2021) 625–645. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1858793>
- [100] M.A. Lill, M.L. Danielson, Computer-aided drug design platform using PyMOL, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 25 (2011) 13–19. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9395-8>
- [101] R. Wang, Y. Lu, S. Wang, Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 2287–2303. <https://doi.org/10.1021/jm0203783>
- [102] N. Brooijmans, I.D. Kuntz, Molecular recognition and docking algorithms, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32 (2003) 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- [103] S. Agarwal, R. Mehrotra, An Overview of Molecular Simulation, *JSM Chem.* 4 (2016) 1024–1028
- [104] G.L. Warren, C.W. Andrews, A.M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M.H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S.F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I.D. Wall, J.M. Woolven, C.E. Peishoff, M.S. Head, A critical assessment of docking programs and scoring functions, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5912–5931. <https://doi.org/10.1021/jm050362n>
- [105] G. M. Morris, D. S. Goodsell, A.J.O. Robert, S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662. %5C.
- [106] D.S. Goodsell, G.M. Morris, A.J. Olson, Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock, *J. Mol. Recognit.* 9 (1996) 1–5. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199601\)9:1<1::AID-JMR241>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199601)9:1<1::AID-JMR241>3.0.CO;2-6)
- [107] 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. 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. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. 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, D.J. Fox, *Gaussian 09*, (2009).
- [108] Y.S. Mary, N.R. El-Brollosy, A.A. El-Emam, O.A. Al-Deeb, P.J. Jojo, C.Y. Panicker, C. Van Alsenoy, Vibrational spectra, NBO analysis, HOMO-LUMO and first hyperpolarizability of 2-[[2-Methylprop-2-en-1-yl]oxy]methyl]-6-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1,2,4-triazine-3,5-dione, a potential chemotherapeutic agent based on density functional theory calculations, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 133 (2014) 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.036>
- [109] S.R. Pilli, T. Banerjee, K. Mohanty, HOMO-LUMO energy interactions between endocrine disrupting chemicals and ionic liquids using the density functional theory: Evaluation and comparison, *J. Mol. Liq.* 207 (2015) 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.03.019>
- [110] J.A. Keith, E.A. Carter, Quantum Chemical Benchmarking, Validation, and Prediction of Acidity Constants for Substituted Pyridinium Ions and Pyridinyl Radicals, *J. Chem. Theory Comput.* 12, 8 (2012) 3187–3206
- [111] M. Remko, C.W. Von Der Lieth, Theoretical study of gas-phase acidity, pK_a, lipophilicity, and solubility of some biologically active sulfonamides, *Bioorganic Med. Chem.* 12 (2004) 5395–5403. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.049>

- [112] T.W. Johnson, R.A. Gallego, M.P. Edwards, Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 6401–6420. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00077>
- [113] A.J. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flex, *J. Comput. Chem.* 16 (2009) 2785–91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- [114] Wheatley P.J., The Crystal and Molecular Structure of Pyrazine, *Acta Cryst.* 10 (1957) 182–187. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0365110X57000596>
- [115] P. Mech, M. Makowski, A. Kawiak, A. Chylewska, When biomolecules meet 2-hydrazinopyrazine: From theory through experiment to molecular levels using a wide spectrum of techniques, *RSC Adv.* 10 (2020) 40673–40688. <https://doi.org/10.1039/d0ra06239a>
- [116] P. Mech-Warda, A. Giełdoń, A. Kawiak, N. Maciejewska, Mateusz, Olszewski, M. Makowski, A. Chylewska, Low-molecular pyrazine-based DNA binders: physicochemical and antimicrobial properties, *Molecules*, 2022, 27(12), 3704. DOI: 10.3390/molecules27123704
- [117] S. Breda, I.D. Reva, L. Lapinski, M.J. Nowak, R. Fausto, Infrared spectra of pyrazine, pyrimidine and pyridazine in solid argon, *J. Mol. Struct.* 786 (2006) 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.09.010>
- [118] S. Gunasekaran, E. Sailatha, Vibrational analysis of pyrazinamide, *Indian J. Pure Appl. Phys.* 47 (2009) 259–264.
- [119] H. Endrédi, F. Billes, S. Holly, Vibrational spectroscopic and quantum chemical study of the chlorine substitution of pyrazine, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 633 (2003) 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(03\)00329-4](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(03)00329-4)
- [120] J. Karpagam, N. Sundaraganesan, S. Sebastian, S. Manoharan, M. Kurt, Molecular structure, vibrational spectroscopic, first-order hyperpolarizability and HOMO, LUMO studies of 3-hydroxy-2-naphthoic acid hydrazide, *J. Raman Spectrosc.* 41 (2010) 53–62. <https://doi.org/10.1002/jrs.2408>
- [121] A. Głębocka, E.D. Raczyńska, A. Chylewska, M. Makowski, Experimental (FT-IR) and theoretical (DFT) studies on prototropy and H-bond formation for pyrazine-2-amidoxime, *J. Phys. Org. Chem.* 29 (2016) 326–335. <https://doi.org/10.1002/poc.3538>
- [122] A.M. Asiri, M. Karabacak, M. Kurt, K.A. Alamry, Synthesis, molecular conformation, vibrational and electronic transition, isometric chemical shift, polarizability and hyperpolarizability analysis of 3-(4-Methoxy-phenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acrylonitrile: A combined experimental and theoretical analysis, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 82 (2011) 444–455. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.07.076>
- [123] M. Govindarajan, M. Karabacak, S. Periandy, S. Xavier, Vibrational spectroscopic studies, NLO, HOMO-LUMO and electronic structure calculations of α,α,α -trichlorotoluene using HF and DFT, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 94 (2012) 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.03.074>
- [124] K.J. Hamam, M.I. Alomari, A study of the optical band gap of zinc phthalocyanine nanoparticles using UV–Vis spectroscopy and DFT function, *Appl. Nanosci.* 7 (2017) 261–268. <https://doi.org/10.1007/s13204-017-0568-9>
- [125] A.S. Bhadwal, R.M. Tripathi, R.K. Gupta, N. Kumar, R.P. Singh, A. Shrivastav, Biogenic synthesis and photocatalytic activity of CdS nanoparticles, *RSC Adv.* 4 (2014) 9484–

9490. <https://doi.org/10.1039/c3ra46221h>
- [126] K. Manojkumar, K.T. Prabhu Charan, A. Sivaramakrishna, P.C. Jha, V.M. Khedkar, R. Siva, G. Jayaraman, K. Vijayakrishna, Biophysical Characterization and Molecular Docking Studies of Imidazolium Based Polyelectrolytes-DNA Complexes: Role of Hydrophobicity, *Biomacromolecules*. 16 (2015) 894–903. <https://doi.org/10.1021/bm5018029>
- [127] L. In, R. Content, X. Li, Y. Hu, H. Wang, Q. Yu, H. Yue, H. Normal, Molecular Spectroscopy Evidence of Berberine Binding to DNA :, *Biomacromolecules*. 13 (2012) 873–880
- [128] Z.H. J. Sheng, J. Gan, Structure-Based DNA-Targeting Strategies with SmallMolecule Ligands for Drug Discovery, *Med. Res. Rev.* 33 (2013) 1119–1173. <https://doi.org/10.1002/med>
- [129] R.M. Wartell, J.E. Larson, R.D. Wells, Netropsin, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 6719–6731. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42119-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42119-4)
- [130] W.D. Wilson, F.A. Tanious, A. Mathis, D. Tevis, J.E. Hall, D.W. Boykin, Antiparasitic compounds that target DNA, *Biochimie*. 90 (2008) 999–1014. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.017>
- [131] A.M. Dąbrowska, P. Mech-Warda, M. Wera, M. Domzalska, M. Makowski, A. Chylewska, Prototropic tautomerism of (E)-N-((4-((2-hydroxy-5-methoxybenzylidene) amino)phenyl)sulfonyl)acetamide and its coordination abilities towards Ru, Rh, and Ir trivalent metal ions, *Polyhedron*. 222 (2022) 115909. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115909>
- [132] P.S. Peixoto, I. V. Tóth, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, Fluoroquinolones and sulfonamides: features of their determination in water. A review, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 96 (2016) 185–202. <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1128539>
- [133] P. Mech, M. Bogunia, A. Nowacki, M. Makowski, Calculations of p Ka Values of Selected Pyridinium and Its N-Oxide Ions in Water and Acetonitrile, *J. Phys. Chem. A*. 124 (2020) 538–551. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b10319>

8. Dorobek naukowy

Staż:

1) 3-miesięczny staż zagraniczny w grupie p. prof. Celia Fonseca Guerra na Wydziale Chemii Teoretycznej na Uniwersytecie Vrije w Amsterdamie, w zespole Molekularnej Chemii Teoretycznej. 01.06-31.08.2021

Projekty obejmujące tematykę omówioną w pracy:

BMN 2020: nr 539-T120-B461-20 „Analiza strukturalna i fizykochemiczna 2-hydrazynopirazyny na podstawie symulacji DFT”

BMN 2021: nr 539-T120-B897-21 „Bioaktywność hydrazynowych pochodnych pirazyny względem DNA metodami chemii obliczeniowej”

BMN 2022: nr 539-T120-B026-22 „Wyznaczanie stałych kwasowo-zasadowych (pKa) wybranych pochodnych sulfonamidowych za pomocą metod chemii obliczeniowej”

Publikacje (w tym nr 1 i 3 zawarte z rozprawie doktorskiej):

- 1) **Mech-Warda Paulina**, Artur Giełdoń, Anna Kawiak, Natalia Maciejewska, Mateusz Olszewski, Mariusz Makowski, Agnieszka Chylewska: Low-molecular pyrazine-based DNA binders: physicochemical and antimicrobial properties, *Molecules*, 2022, vol. 27(12), s. 3704. DOI: 10.3390/molecules27123704
- 2) Dąbrowska Aleksandra M., **Mech-Warda Paulina**, Wera Michał, Domzalska Marta, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Prototropic tautomerism of (E)-N-((2-hydroxy-5-methoxybenzylidene) amino)phenyl)sulfonylacetamide and its coordination abilities towards Ru, Rh, and Ir trivalent metal ions, *Polyhedron*, 2022, vol. 222, s. 115909. DOI: 10.1016/j.poly.2022.115909
- 3) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz, Kawiak Anna, Chylewska Agnieszka: When biomolecules meet 2-hydrazinopyrazine: from theory through experiment to molecular levels using a wide spectrum of techniques, *RSC Advances*, 2020, vol. 10, nr 67, s.40673-40688. DOI:10.1039/D0RA06239A
- 4) Bocian Aleksandra, **Mech Paulina**, Bogunia Małgorzata, Brzeski Jakub, Makowski Mariusz [i in.]: New benzothiazole based copper(II) hydrazone Schiff base complexes for selective and environmentally friendly oxidation of benzylic alcohols: The importance of the bimetallic species tuned by the choice of the counterion, *Journal of Molecular Liquids*, 2020, vol. 302, s.1-9, Numer artykułu:112590. DOI:10.1016/j.molliq.2020.112590
- 5) **Mech Paulina**, Bogunia Małgorzata, Nowacki Andrzej, Makowski Mariusz: Calculations of pKa values of selected pyridinium and its N-oxide ions in water and acetonitrile, *Journal of Physical Chemistry A*, 2020, vol. 124, nr 3, s.538-551. DOI:10.1021/acs.jpca.9b10319
- 6) Sieradzan Adam, Bogunia Małgorzata, **Mech Paulina**, Ganzynkiewicz Robert, Giełdoń Artur, Liwo Józef Adam, Makowski Mariusz: Introduction of phosphorylated residues into the UNRES coarse-grained model: toward modeling of signaling processes, *Journal of Physical Chemistry B*, 2019, vol. 123, nr 27, s.5721-5729. DOI:10.1021/acs.jpccb.9b03799

Wystąpienia konferencyjne:

Komunikaty ustne:

- 1) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Teoretyczne badania struktury 2-hydrazynopirazyny, 2019, II Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko" 2019
- 2) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Charakterystyka fizykochemiczna 2-hydrazynopirazyny na podstawie symulacji DFT, 2019, 1. Konferencja Naukowa "Pirazyny jako substancje biologicznie aktywne - dziś i jutro" 2019
- 3) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Physicochemical characterization of 2-hydrazinopyrazine - a theoretical case study, 2020, 15th Chemistry Conference for Young Scientists 2020
- 4) **Mech Paulina**, Kawiak Anna, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Ocena potencjału biologicznego hydrazynowych pochodnych pirazyny, 2020, I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego „Dzieli nas odległość, ale łączy pasja do nauki” 2020
- 5) **Mech Paulina**, Kawiak Anna, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Czy 2-hydrazynopirazyna wykazuje aktywność biologiczną?, 2020, I Ogólnopolskie Sympozjum Studentów Chemii "UWiedzeni Chemią" 2020
- 6) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz, Kawiak Anna, Chylewska Agnieszka: 2-hydrazynopirazyna i jej chloropochodna - wpływ efektu podstawnikowego na właściwościoraz aktywność biologiczną, 2020, Kopernikańskie E-Seminarium Doktoranckie 2020
- 7) **Mech-Warda Paulina**, Kawiak Anna, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Jak 2-hydrazynopirazyna i jej chlorkowa pochodna oddziałują z DNA, czyli o ich bioaktywności, 2020, e-Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2020
- 8) **Mech-Warda Paulina**, Giełdoń Artur, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Powinowactwo wybranych pochodnych hydrazynowych do DNA - okiem teoretyka, 2021, e-Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2021
- 9) **Mech-Warda Paulina**, Giełdoń Artur, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Ocena zdolności wybranych pochodnych pirazyny do oddziaływania z DNA, 2021, XVII Wrocławskie Studenckie Sympozjum Chemiczne 2021
- 10) **Mech-Warda Paulina**, Giełdoń Artur, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: Bioaktywność wybranych hydrazynowych pochodnych pirazyny wobec DNA, 2021, II Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne 2021
- 11) **Mech-Warda Paulina**, Giełdoń Artur, Makowski Mariusz, Chylewska Agnieszka: 2-hydrazynopirazyna i jej chlorkowa pochodna - wpływ efektu podstawnikowego na siłę oddziaływania z DNA, 2021, III Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko" 2021

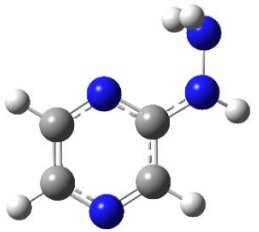
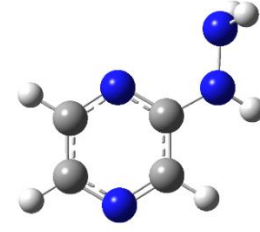
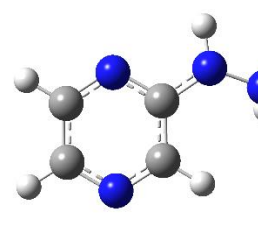
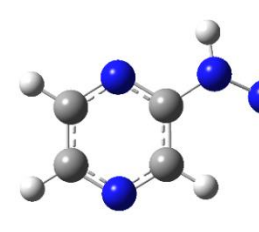
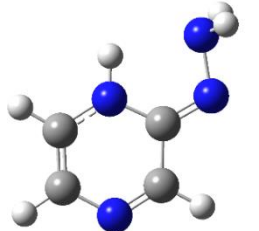
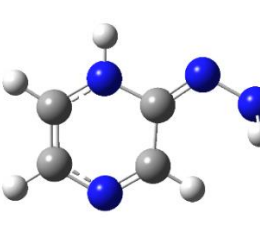
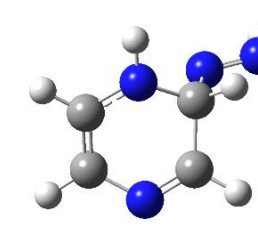
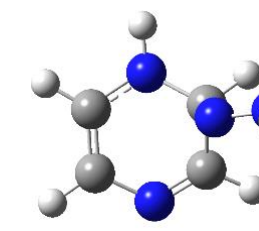
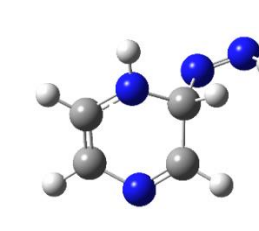
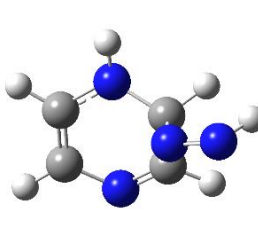
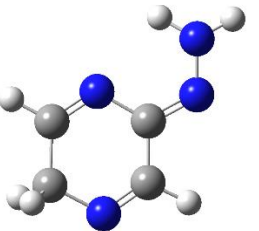
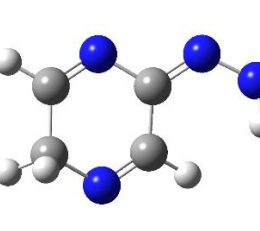
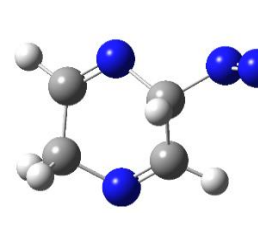
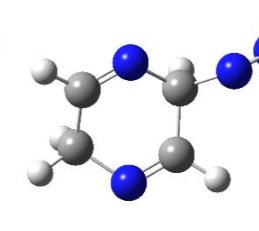
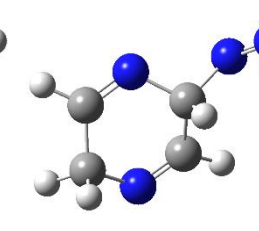
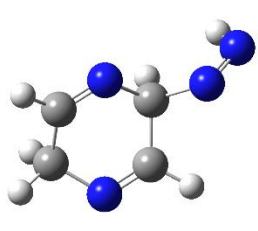
Postery:

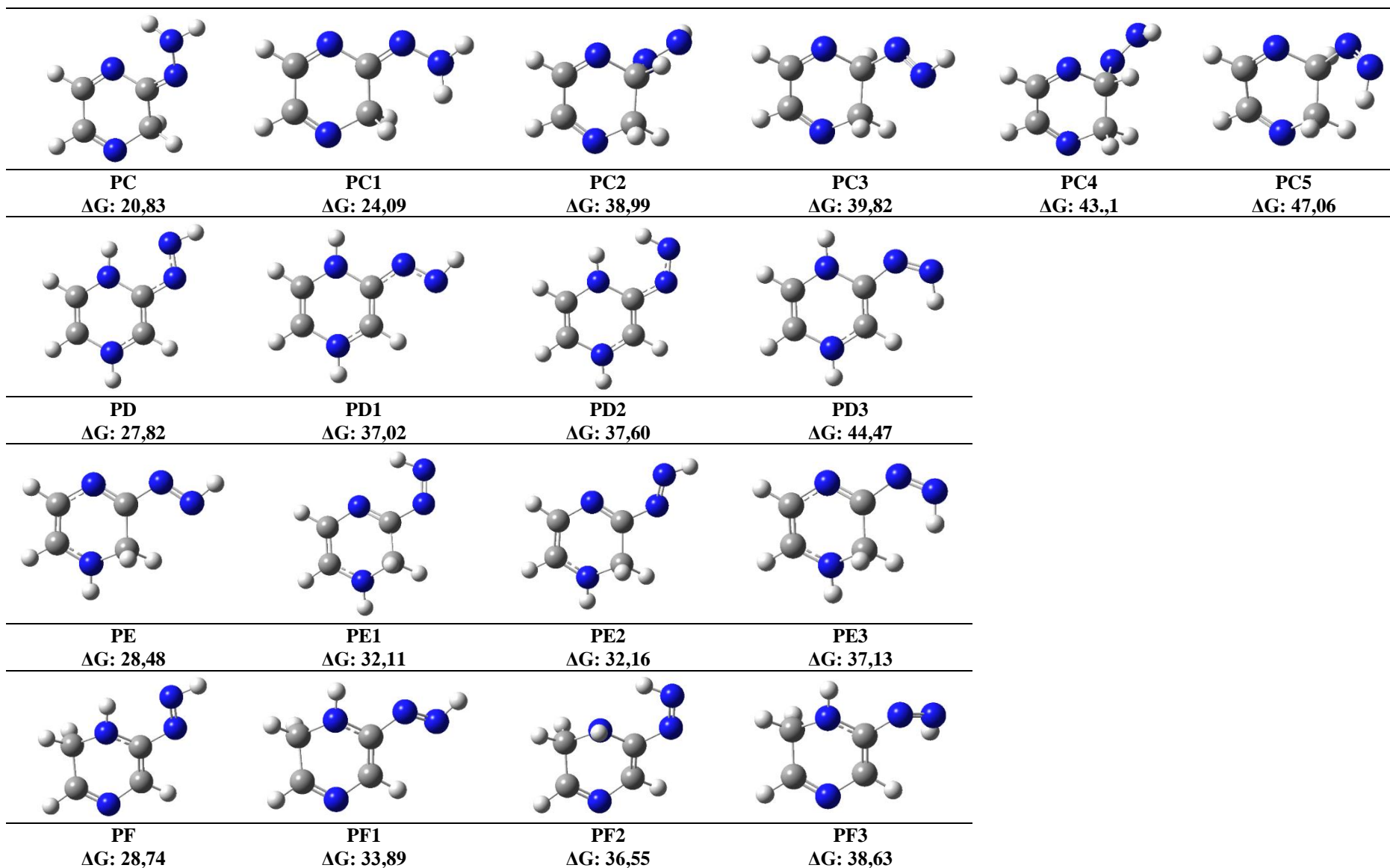
- 1) **Mech Paulina**, Bogunia Małgorzata, Makowski Mariusz [i in.]: Badanie mechanizmu reakcji utleniania alkoholi benzylowych przy użyciu kompleksu miedzi(II) z zasadą Schiffa w ujęciu teoretycznym, 2018, XXI Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2018

- 2) Bogunia Małgorzata, **Mech Paulina**, Makowski Mariusz: 8000 m n.p.m.: walka o przetrwanie, 2018, XXI Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2018
- 3) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz: Po co chemikowi komputer?, 2019, XXXVI Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2019
- 4) **Mech Paulina**, Makowski Mariusz, Kawiak Anna, Chylewska Agnieszka: 2-hydrazynopirazyna - molekula bezpieczna fizjologicznie, 2019, XXII Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2019
- 5) **Mech Paulina**, Chylewska Agnieszka, Kawiak Anna, Makowski Mariusz: Jak obecność podstawnika chlorowego wpływa na właściwości oraz aktywność biologiczną 2-hydrazynopirazyny?, 2020, I Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne 2020
- 6) Dąbrowska Aleksandra, Wera Michał, **Mech-Warda Paulina**, Chylewska Agnieszka, Makowski Mariusz: Tautomeria prototropowa w pochodnych sulfonamidu w stanie stałym, 2021, IV Ogólnopolskie Forum Chemii Nieorganicznej 2021

9. Załączniki

Tabela S1. Konformery 2HP(A)-2HP(D) i formy prototropowe (PA-PI3) 2-hydrazynopirazyny wraz z wartościami względnych energii swobodnej Gibbsa (ΔG) w kcal/mol (w odniesieniu do konformeru 2HP(A)).

					
2HP(A) $\Delta G: 0,00$	2HP(B) $\Delta G: 4,98$	2HP(C) $\Delta G: 1,16$	2HP(D) $\Delta G: 0,82$		
					
PA $\Delta G: 10,00$	PA1 $\Delta G: 13,87$	PA2 $\Delta G: 33,45$	PA3 $\Delta G: 33,45$	PA4 $\Delta G: 38,30$	PA5 $\Delta G: 38,30$
					
PB $\Delta G: 14,75$	PB1 $\Delta G: 23,74$	PB2 $\Delta G: 37,28$	PB3 $\Delta G: 3,28$	PB4 $\Delta G: 42,36$	PB5 $\Delta G: 42,36$



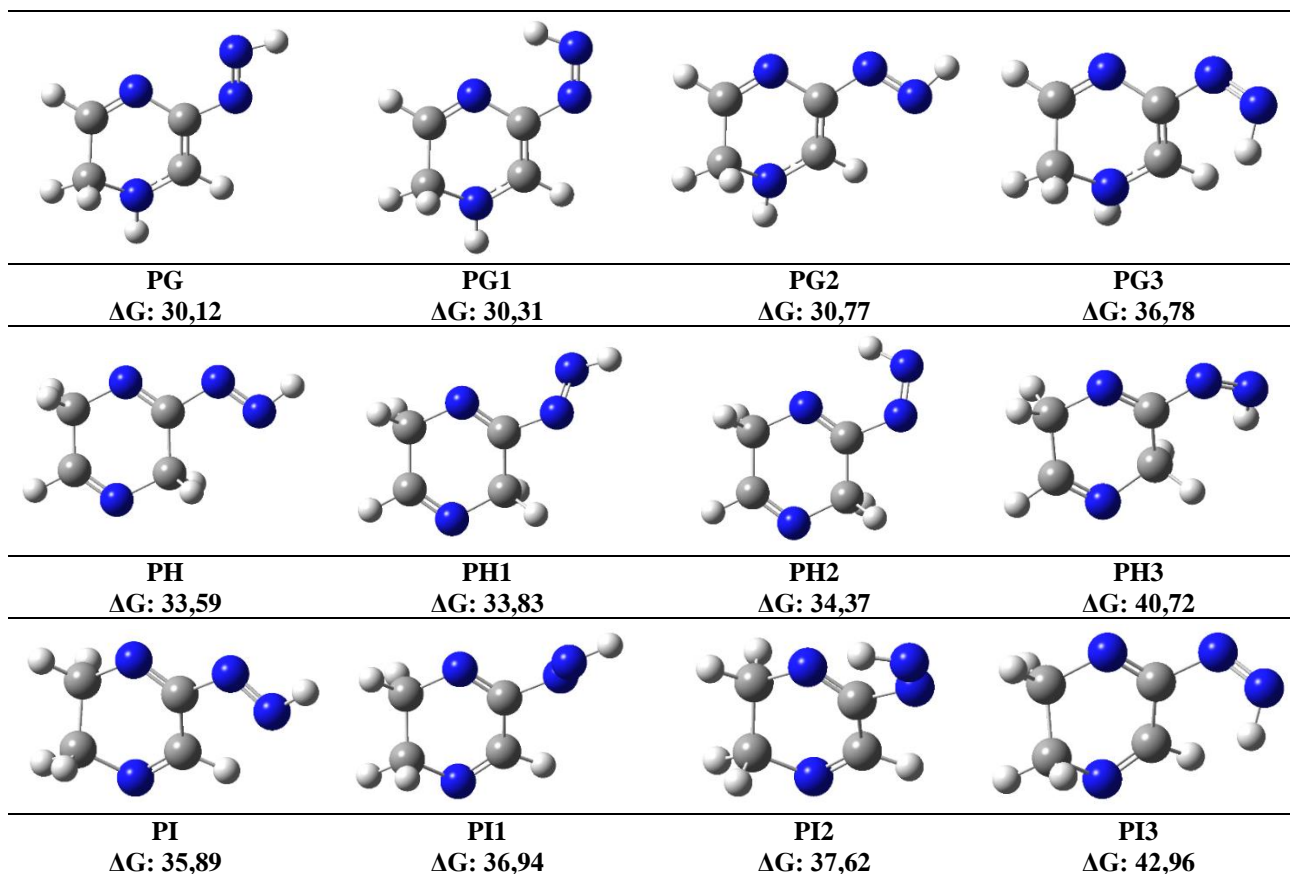
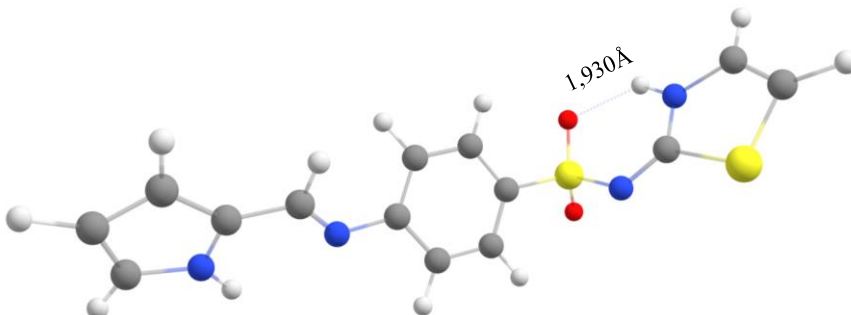


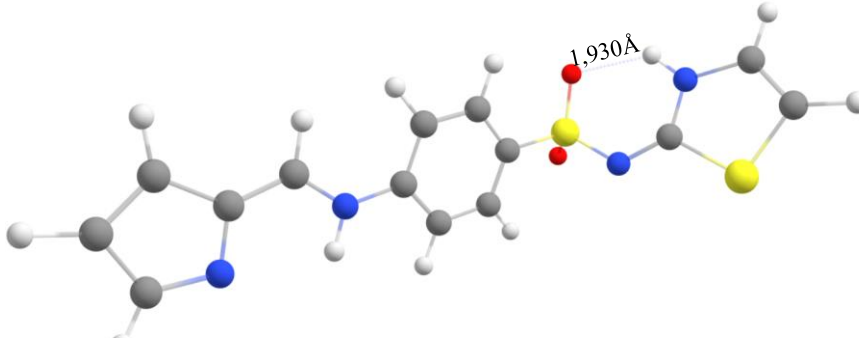
Tabela S2. Wartości energii swobodnych Gibbsa zoptymalizowanych struktur zjonizowanych 2-hydrazynopirazyny i 2-chloro-3-hydrazynopirazyny.

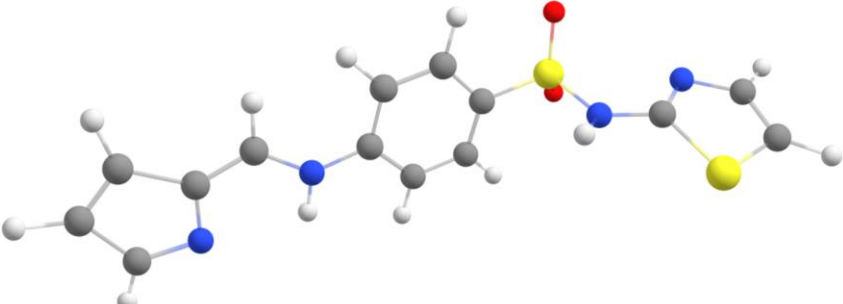
Forma jonowa											
2HP					2Cl3HP						
trójsprotonowana H_4A^{3+}											
	P1P2P3	P2P3P4	P1P2P4	P1P3P4*		P1P2P4	P1P2P3	P2P3P4	P1P3P4		
G [hartree]	-375,528186	-375,528449	-375,562878	-	-835,192377	-835,159323	-835,158389	-835,108746			
ΔG [kcal/mol]	0,00	21,60	21,77	-	0,00	20,74	21,33	52,48			
dwusprotonowana H_3A^{2+}											
	P1P2	P2P4	P1P4	P3P4	P1P3		P1P2	P2P4	P1P4	P2P3	P1P3
G [hartree]	-375,565913	-375,565848	-375,528805	-375,509192	-375,497217	-835,192769	-835,191740	-835,160673	-835,157079	-835,140423	
ΔG [kcal/mol]	0,00	0,04	23,29	35,60	43,11	0,00	0,65	20,14	22,40	32,85	
jednosprotonowana H_2A^+											
	P1	P2	P4	P3*		P1	P2	P4	P3		
G [hartree]	-375,383774	-375,374572	-375,358894	-	-835,014951	-835,001107	-834,991593	-834,980270			
ΔG [kcal/mol]	0,00	5,77	15,61	-	0,00	8,69	14,66	21,76			
neutralna HA											
	HA	Z13	Z34	Z14		HA	Z34	Z23	Z13		
G [hartree]	-375,028923	-375,012962	-374,991331	-374,980543	-834,667189	-834,630700	-834,619509	-834,647735			
ΔG [kcal/mol]	0,00	5,03	10,86	25,37	0,00	12,22	22,91	29,94			
zdeprotonowana A^-											
G [hartree]			-374,472158				-834,118138				

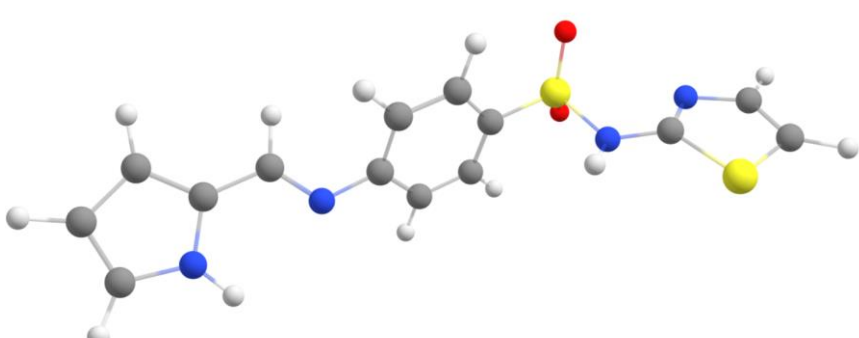
*nie znaleziono stabilnej energetycznie struktury

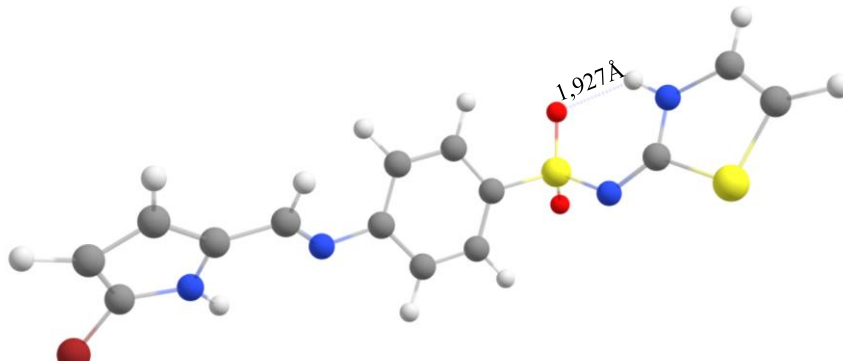
Tabela S3. Zoptymalizowane, w fazie gazowej metodą M06/6-311++G(2d,2p), struktury tautomerów związku ScB_A (AH1-AH4) i związku ScB_B (BH1-BH4) wraz z wartościami energii swobodnych układów (G).

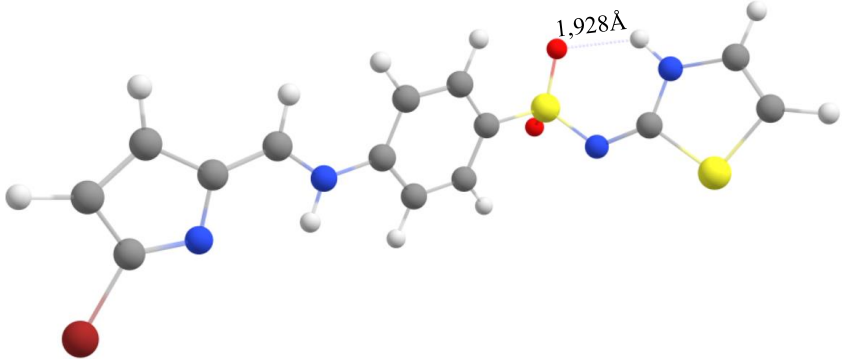
Tautomer	G [hartree]	Zoptymalizowana struktura wraz z koordynatami
AH1	-1705,936566	 N -4.557904000 -0.557424000 -0.900416000 C -3.900934000 -0.538720000 0.288906000 S -4.537963000 -1.834108000 1.299869000 C -5.645185000 -2.319076000 0.035322000 C -5.512587000 -1.541001000 -1.041449000 N -2.966285000 0.237797000 0.721195000 S -2.364655000 1.453808000 -0.198280000 O -2.647114000 2.696736000 0.461168000 C -0.632761000 1.145444000 -0.083806000 C 0.028952000 1.472900000 1.092115000 C 1.384785000 1.250337000 1.188807000 C 2.089333000 0.681881000 0.124369000 C 1.410501000 0.382344000 -1.058121000 C 0.050295000 0.610648000 -1.160995000 N 3.461093000 0.490415000 0.275469000 C 4.014197000 -0.554675000 -0.206729000 C 5.426177000 -0.758305000 -0.131536000 N 6.261137000 0.167632000 0.436473000 C 7.540507000 -0.276879000 0.374271000 C 7.542480000 -1.507638000 -0.243313000 C 6.207545000 -1.813106000 -0.562321000 O -2.749053000 1.299414000 -1.595708000 H -0.524400000 1.912946000 1.912630000 H 1.930006000 1.507700000 2.088566000 H 1.962539000 0.004514000 -1.910747000 H -0.483221000 0.398080000 -2.079079000 H -6.067156000 -1.608115000 -1.964578000 H -6.326252000 -3.140361000 0.173752000 H 8.356790000 0.305622000 0.769131000 H 8.413056000 -2.111569000 -0.438369000 H 5.837536000 -2.700080000 -1.052674000 H 5.926894000 1.031660000 0.831725000 H -4.260980000 0.100516000 -1.615513000 H 3.440292000 -1.359184000 -0.686112000

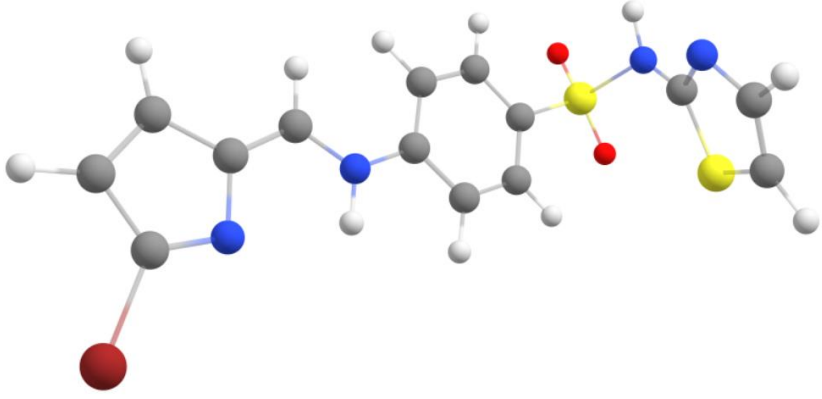
AH2	-1705,923224																																																																																																																																									
																																																																																																																																										
		<table border="0"> <tr><td>C</td><td>6.631746000</td><td>-1.001176000</td><td>-1.179713000</td></tr> <tr><td>C</td><td>5.587885000</td><td>-0.530385000</td><td>-0.318219000</td></tr> <tr><td>N</td><td>6.058598000</td><td>-0.345587000</td><td>0.975399000</td></tr> <tr><td>C</td><td>7.320605000</td><td>-0.682347000</td><td>0.919390000</td></tr> <tr><td>C</td><td>7.737031000</td><td>-1.098753000</td><td>-0.393222000</td></tr> <tr><td>C</td><td>4.287771000</td><td>-0.273240000</td><td>-0.627807000</td></tr> <tr><td>N</td><td>3.421506000</td><td>0.167298000</td><td>0.300442000</td></tr> <tr><td>C</td><td>2.071762000</td><td>0.457938000</td><td>0.154619000</td></tr> <tr><td>C</td><td>1.374483000</td><td>0.894369000</td><td>1.284037000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.035042000</td><td>1.197967000</td><td>1.203142000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.625385000</td><td>1.060172000</td><td>-0.009799000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.053495000</td><td>0.632988000</td><td>-1.136080000</td></tr> <tr><td>C</td><td>1.400743000</td><td>0.333812000</td><td>-1.059875000</td></tr> <tr><td>S</td><td>-2.342049000</td><td>1.450457000</td><td>-0.094724000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-2.731031000</td><td>1.410915000</td><td>-1.498645000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-2.992629000</td><td>0.203697000</td><td>0.741046000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-3.947654000</td><td>-0.514961000</td><td>0.253240000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-4.595798000</td><td>-0.436359000</td><td>-0.937821000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.578210000</td><td>-1.380963000</td><td>-1.146601000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.739604000</td><td>-2.222199000</td><td>-0.122685000</td></tr> <tr><td>S</td><td>-4.627852000</td><td>-1.852358000</td><td>1.174783000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-2.561832000</td><td>2.656123000</td><td>0.651038000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-0.507409000</td><td>1.546198000</td><td>2.073572000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.901197000</td><td>0.996436000</td><td>2.226414000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.919926000</td><td>0.008508000</td><td>-1.951666000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-0.475778000</td><td>0.545949000</td><td>-2.076352000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-6.128762000</td><td>-1.372313000</td><td>-2.074426000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-6.445197000</td><td>-3.030200000</td><td>-0.039991000</td></tr> <tr><td>H</td><td>7.950817000</td><td>-0.636835000</td><td>1.800466000</td></tr> <tr><td>H</td><td>8.726882000</td><td>-1.419819000</td><td>-0.679181000</td></tr> <tr><td>H</td><td>6.536134000</td><td>-1.225635000</td><td>-2.231906000</td></tr> <tr><td>H</td><td>3.837869000</td><td>0.280969000</td><td>1.219866000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-4.275335000</td><td>0.258605000</td><td>-1.606982000</td></tr> <tr><td>H</td><td>3.920983000</td><td>-0.420433000</td><td>-1.635927000</td></tr> </table>	C	6.631746000	-1.001176000	-1.179713000	C	5.587885000	-0.530385000	-0.318219000	N	6.058598000	-0.345587000	0.975399000	C	7.320605000	-0.682347000	0.919390000	C	7.737031000	-1.098753000	-0.393222000	C	4.287771000	-0.273240000	-0.627807000	N	3.421506000	0.167298000	0.300442000	C	2.071762000	0.457938000	0.154619000	C	1.374483000	0.894369000	1.284037000	C	0.035042000	1.197967000	1.203142000	C	-0.625385000	1.060172000	-0.009799000	C	0.053495000	0.632988000	-1.136080000	C	1.400743000	0.333812000	-1.059875000	S	-2.342049000	1.450457000	-0.094724000	O	-2.731031000	1.410915000	-1.498645000	N	-2.992629000	0.203697000	0.741046000	C	-3.947654000	-0.514961000	0.253240000	N	-4.595798000	-0.436359000	-0.937821000	C	-5.578210000	-1.380963000	-1.146601000	C	-5.739604000	-2.222199000	-0.122685000	S	-4.627852000	-1.852358000	1.174783000	O	-2.561832000	2.656123000	0.651038000	H	-0.507409000	1.546198000	2.073572000	H	1.901197000	0.996436000	2.226414000	H	1.919926000	0.008508000	-1.951666000	H	-0.475778000	0.545949000	-2.076352000	H	-6.128762000	-1.372313000	-2.074426000	H	-6.445197000	-3.030200000	-0.039991000	H	7.950817000	-0.636835000	1.800466000	H	8.726882000	-1.419819000	-0.679181000	H	6.536134000	-1.225635000	-2.231906000	H	3.837869000	0.280969000	1.219866000	H	-4.275335000	0.258605000	-1.606982000	H	3.920983000	-0.420433000	-1.635927000
C	6.631746000	-1.001176000	-1.179713000																																																																																																																																							
C	5.587885000	-0.530385000	-0.318219000																																																																																																																																							
N	6.058598000	-0.345587000	0.975399000																																																																																																																																							
C	7.320605000	-0.682347000	0.919390000																																																																																																																																							
C	7.737031000	-1.098753000	-0.393222000																																																																																																																																							
C	4.287771000	-0.273240000	-0.627807000																																																																																																																																							
N	3.421506000	0.167298000	0.300442000																																																																																																																																							
C	2.071762000	0.457938000	0.154619000																																																																																																																																							
C	1.374483000	0.894369000	1.284037000																																																																																																																																							
C	0.035042000	1.197967000	1.203142000																																																																																																																																							
C	-0.625385000	1.060172000	-0.009799000																																																																																																																																							
C	0.053495000	0.632988000	-1.136080000																																																																																																																																							
C	1.400743000	0.333812000	-1.059875000																																																																																																																																							
S	-2.342049000	1.450457000	-0.094724000																																																																																																																																							
O	-2.731031000	1.410915000	-1.498645000																																																																																																																																							
N	-2.992629000	0.203697000	0.741046000																																																																																																																																							
C	-3.947654000	-0.514961000	0.253240000																																																																																																																																							
N	-4.595798000	-0.436359000	-0.937821000																																																																																																																																							
C	-5.578210000	-1.380963000	-1.146601000																																																																																																																																							
C	-5.739604000	-2.222199000	-0.122685000																																																																																																																																							
S	-4.627852000	-1.852358000	1.174783000																																																																																																																																							
O	-2.561832000	2.656123000	0.651038000																																																																																																																																							
H	-0.507409000	1.546198000	2.073572000																																																																																																																																							
H	1.901197000	0.996436000	2.226414000																																																																																																																																							
H	1.919926000	0.008508000	-1.951666000																																																																																																																																							
H	-0.475778000	0.545949000	-2.076352000																																																																																																																																							
H	-6.128762000	-1.372313000	-2.074426000																																																																																																																																							
H	-6.445197000	-3.030200000	-0.039991000																																																																																																																																							
H	7.950817000	-0.636835000	1.800466000																																																																																																																																							
H	8.726882000	-1.419819000	-0.679181000																																																																																																																																							
H	6.536134000	-1.225635000	-2.231906000																																																																																																																																							
H	3.837869000	0.280969000	1.219866000																																																																																																																																							
H	-4.275335000	0.258605000	-1.606982000																																																																																																																																							
H	3.920983000	-0.420433000	-1.635927000																																																																																																																																							

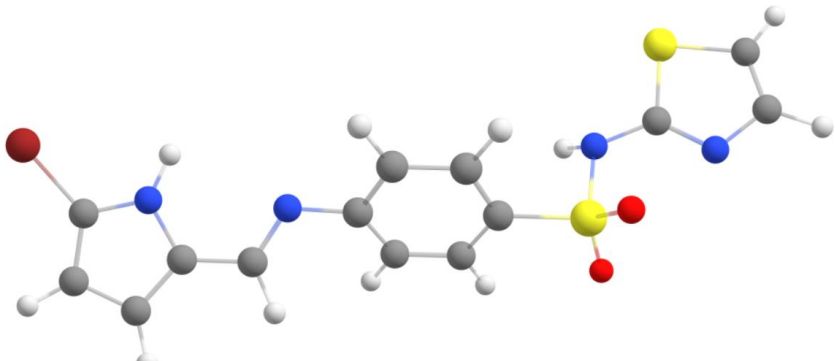
AH3	-1705,911101			
N	-5.120084000	0.365822000	0.021416000	
C	-4.212261000	-0.500891000	-0.254574000	
S	-4.796505000	-2.125987000	-0.553327000	
C	-6.400611000	-1.530551000	-0.303821000	
C	-6.359018000	-0.215126000	0.006290000	
N	-2.837508000	-0.268219000	-0.282961000	
S	-2.232774000	1.232389000	0.255338000	
O	-2.680455000	1.383901000	1.604558000	
C	-0.519017000	0.821845000	0.241010000	
C	-0.008567000	-0.005143000	1.233236000	
C	1.331934000	-0.310727000	1.235835000	
C	2.180510000	0.208815000	0.252151000	
C	1.657085000	1.044642000	-0.733470000	
C	0.309211000	1.348057000	-0.735240000	
N	3.520187000	-0.135302000	0.308067000	
C	4.515229000	0.232285000	-0.522600000	
C	5.787577000	-0.204191000	-0.332298000	
N	6.096751000	-1.046854000	0.729283000	
C	7.379610000	-1.264342000	0.615401000	
C	7.971552000	-0.586528000	-0.509398000	
C	6.956439000	0.086948000	-1.110956000	
O	-2.456003000	2.241318000	-0.738921000	
H	-0.667850000	-0.395600000	1.999028000	
H	1.743711000	-0.953883000	2.005541000	
H	2.293492000	1.467951000	-1.499068000	
H	-0.106982000	2.007455000	-1.486609000	
H	-2.382304000	-0.545620000	-1.145269000	
H	-7.227151000	0.393201000	0.219357000	
H	-7.257502000	-2.174925000	-0.409839000	
H	7.904051000	-1.899073000	1.320807000	
H	9.010090000	-0.616656000	-0.800671000	
H	6.995804000	0.714747000	-1.988794000	
H	3.828035000	-0.747367000	1.058237000	
H	4.273285000	0.886902000	-1.350020000	

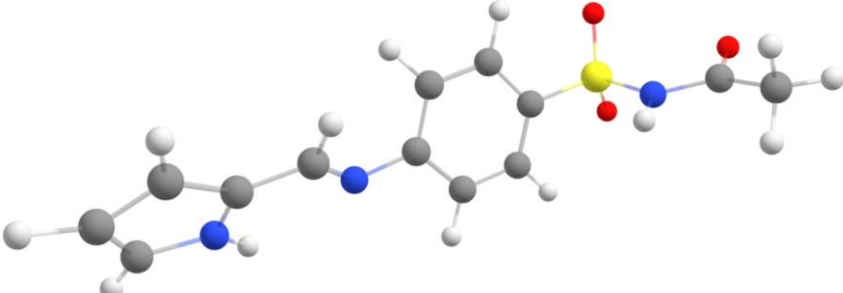
AH4	-1705,925087			
N	-6.181430000	1.233638000	0.396370000	
C	-5.772214000	0.075193000	-0.211878000	
C	-6.892542000	-0.528704000	-0.751106000	
C	-7.996032000	0.289573000	-0.457044000	
C	-7.522080000	1.369710000	0.254746000	
C	-4.404941000	-0.330064000	-0.222359000	
N	-3.493514000	0.361236000	0.348349000	
C	-2.164050000	-0.035690000	0.257708000	
C	-1.355678000	0.114760000	1.389166000	
C	-0.030269000	-0.256773000	1.357753000	
C	0.506757000	-0.756104000	0.177125000	
C	-0.267560000	-0.889962000	-0.962840000	
C	-1.601546000	-0.528847000	-0.922208000	
S	2.205199000	-1.226034000	0.134934000	
N	2.868936000	0.352319000	0.051225000	
C	4.245562000	0.503470000	-0.062391000	
S	4.907152000	2.087756000	-0.426039000	
C	6.486799000	1.382893000	-0.318233000	
C	6.382662000	0.070998000	-0.014004000	
N	5.113850000	-0.424597000	0.124962000	
O	2.458230000	-1.923283000	-1.092651000	
O	2.588819000	-1.769521000	1.399768000	
H	0.596668000	-0.168283000	2.236665000	
H	-1.801866000	0.514784000	2.291289000	
H	-2.210310000	-0.602054000	-1.815478000	
H	0.178692000	-1.281441000	-1.868851000	
H	2.329384000	0.925899000	-0.585831000	
H	7.223362000	-0.597189000	0.113031000	
H	7.371004000	1.974329000	-0.487717000	
H	-8.046672000	2.216478000	0.666366000	
H	-9.024376000	0.118084000	-0.728585000	
H	-6.894264000	-1.459786000	-1.296158000	
H	-5.547420000	1.852894000	0.874552000	
H	-4.192307000	-1.279708000	-0.731482000	

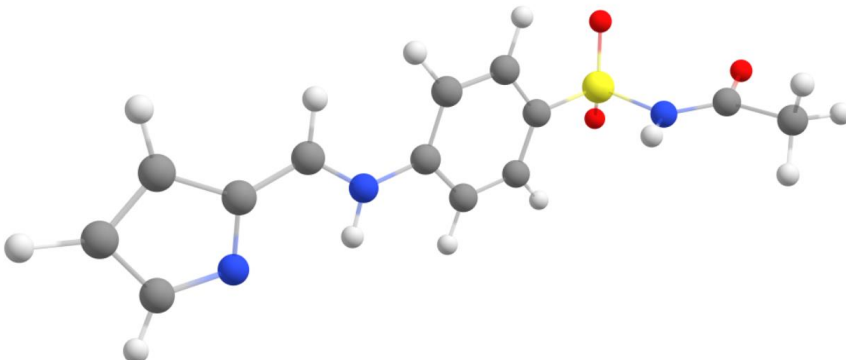
ABr1	-4279,360265			
C	4.626591000	2.120014000	0.943223000	
C	3.892951000	1.035611000	0.505428000	
N	4.774976000	0.124161000	-0.020302000	
C	6.028925000	0.621058000	0.082268000	
C	5.982917000	1.859306000	0.676851000	
C	2.486400000	0.785363000	0.532769000	
N	1.991868000	-0.288201000	0.051424000	
C	0.622495000	-0.528931000	0.147638000	
C	-0.008550000	-1.156121000	-0.929542000	
C	-1.358026000	-1.427014000	-0.889066000	
C	-2.087605000	-1.088067000	0.242995000	
C	-1.476797000	-0.495616000	1.332939000	
C	-0.122017000	-0.219916000	1.286844000	
S	-3.810906000	-1.460585000	0.281656000	
O	-4.284351000	-1.222783000	1.639471000	
N	-4.399732000	-0.341605000	-0.759620000	
C	-5.377373000	0.435866000	-0.436917000	
N	-6.094595000	0.527598000	0.713657000	
C	-7.083098000	1.487652000	0.726963000	
C	-7.181840000	2.172277000	-0.415050000	
S	-5.997565000	1.625103000	-1.579248000	
O	-4.004834000	-2.758164000	-0.299155000	
H	-1.854657000	-1.912413000	-1.720333000	
H	0.587930000	-1.419748000	-1.794190000	
H	0.373775000	0.204594000	2.152072000	
H	-2.060780000	-0.272522000	2.216872000	
H	-7.686658000	1.609876000	1.612818000	
H	-7.877946000	2.957206000	-0.653501000	
Br	7.502734000	-0.341729000	-0.538674000	
H	6.832780000	2.486372000	0.886421000	
H	4.213893000	3.003037000	1.405860000	
H	4.496163000	-0.759138000	-0.418522000	
H	-5.817587000	-0.064022000	1.492302000	
H	1.868974000	1.579998000	0.972550000	

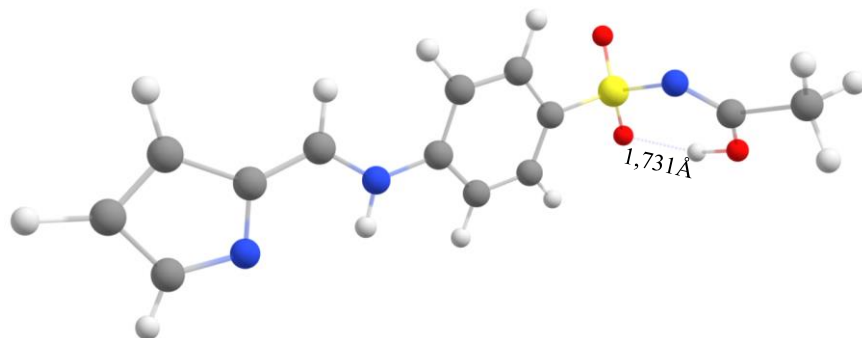
ABr2	-4279,354429			
S	-5.871649000	2.411067000	-0.022364000	
C	-5.323684000	0.738442000	-0.031028000	
N	-6.090571000	0.027149000	0.834747000	
C	-7.063008000	0.743826000	1.498905000	
C	-7.097908000	2.036233000	1.165796000	
N	-4.342902000	0.368791000	-0.785959000	
S	-3.820059000	-1.179830000	-0.819940000	
O	-3.983364000	-1.681637000	-2.153882000	
C	-2.094845000	-0.963945000	-0.524990000	
C	-1.315791000	-0.373011000	-1.509901000	
C	0.032488000	-0.200258000	-1.296330000	
C	0.618947000	-0.624187000	-0.101825000	
C	-0.170343000	-1.224391000	0.875577000	
C	-1.526048000	-1.389446000	0.661035000	
N	1.986661000	-0.427761000	0.053953000	
C	2.757932000	-0.745592000	1.105481000	
C	4.095368000	-0.491979000	1.115784000	
C	5.040943000	-0.766145000	2.156199000	
C	6.240691000	-0.326466000	1.692151000	
C	5.956447000	0.194381000	0.384806000	
N	4.713994000	0.109911000	0.025536000	
O	-4.360073000	-1.950652000	0.292438000	
H	-1.773727000	-0.055872000	-2.438691000	
H	0.651094000	0.261429000	-2.057906000	
H	0.261539000	-1.571197000	1.804959000	
H	-2.146952000	-1.861632000	1.411514000	
H	-7.703209000	0.235595000	2.203014000	
H	-7.768393000	2.792893000	1.533992000	
Br	7.273356000	0.945723000	-0.732641000	
H	7.206925000	-0.348220000	2.170269000	
H	4.822838000	-1.228424000	3.107887000	
H	2.493178000	0.009978000	-0.709361000	
H	-5.859895000	-0.952432000	0.977731000	
H	2.286528000	-1.215291000	1.959516000	

ABr3	-4279,353541			
C	4.779447000	-1.561985000	1.598723000	
C	3.740090000	-1.002194000	0.784921000	
N	4.246547000	-0.028722000	-0.070269000	
C	5.511130000	-0.000625000	0.209123000	
C	5.920313000	-0.922311000	1.233640000	
C	2.415538000	-1.308328000	0.780656000	
N	1.553246000	-0.686299000	-0.044030000	
C	0.186137000	-0.882247000	-0.165047000	
C	-0.512793000	-0.081011000	-1.068735000	
C	-1.873943000	-0.227372000	-1.227368000	
C	-2.548357000	-1.182907000	-0.481613000	
C	-1.863708000	-1.991144000	0.414019000	
C	-0.502460000	-1.845865000	0.573812000	
S	-4.295253000	-1.348233000	-0.626323000	
O	-4.662541000	-2.692542000	-0.296781000	
N	-4.925097000	-0.434922000	0.639316000	
C	-4.635969000	0.918721000	0.766446000	
N	-4.256649000	1.435798000	1.888851000	
C	-4.122664000	2.792078000	1.765730000	
C	-4.385190000	3.305726000	0.543031000	
S	-4.860067000	2.046775000	-0.543303000	
O	-4.709010000	-0.691127000	-1.830231000	
H	-2.417809000	0.385979000	-1.934309000	
H	0.025266000	0.659935000	-1.649304000	
H	0.017448000	-2.491447000	1.268852000	
H	-2.399850000	-2.748734000	0.972854000	
H	-4.844883000	-0.923867000	1.525398000	
H	-3.809043000	3.370236000	2.623937000	
H	-4.313596000	4.328057000	0.209958000	
Br	6.703800000	1.162304000	-0.666204000	
H	6.923365000	-1.051181000	1.607375000	
H	4.656740000	-2.333702000	2.344385000	
H	1.988041000	0.015801000	-0.634924000	
H	2.027086000	-2.063257000	1.451925000	

ABr4	-4279,348753			
N	6.596328000	-0.060702000	-0.000371000	
C	5.606612000	0.716565000	-0.264864000	
S	6.022779000	2.405474000	-0.477640000	
C	7.674341000	1.971981000	-0.213179000	
C	7.765775000	0.646448000	0.042122000	
N	4.265142000	0.342449000	-0.343870000	
S	3.790695000	-1.184846000	0.246398000	
O	4.233513000	-1.239295000	1.605254000	
C	2.044858000	-0.937555000	0.194607000	
C	1.450488000	-0.102535000	1.133442000	
C	0.088220000	0.090146000	1.097493000	
C	-0.696788000	-0.570553000	0.146966000	
C	-0.079896000	-1.396484000	-0.794555000	
C	1.290613000	-1.581317000	-0.770712000	
N	-2.068410000	-0.335885000	0.153069000	
C	-2.877857000	-1.302074000	-0.053725000	
C	-4.288346000	-1.097472000	-0.124187000	
N	-4.846794000	0.150546000	0.005476000	
C	-6.190054000	0.040347000	-0.102799000	
C	-6.526453000	-1.277073000	-0.306907000	
C	-5.318743000	-1.996306000	-0.319035000	
O	4.124155000	-2.207307000	-0.702226000	
H	2.063966000	0.386418000	1.880407000	
H	-0.403163000	0.742397000	1.808707000	
H	-0.677871000	-1.872036000	-1.562958000	
H	1.780747000	-2.225820000	-1.489660000	
H	3.826422000	0.530178000	-1.238437000	
H	8.689022000	0.124032000	0.252353000	
H	8.461061000	2.705713000	-0.272811000	
Br	-7.294779000	1.537719000	0.036933000	
H	-7.526157000	-1.657973000	-0.428583000	
H	-5.197816000	-3.059938000	-0.453262000	
H	-4.314681000	0.991232000	0.166875000	
H	-2.541675000	-2.341160000	-0.167788000	

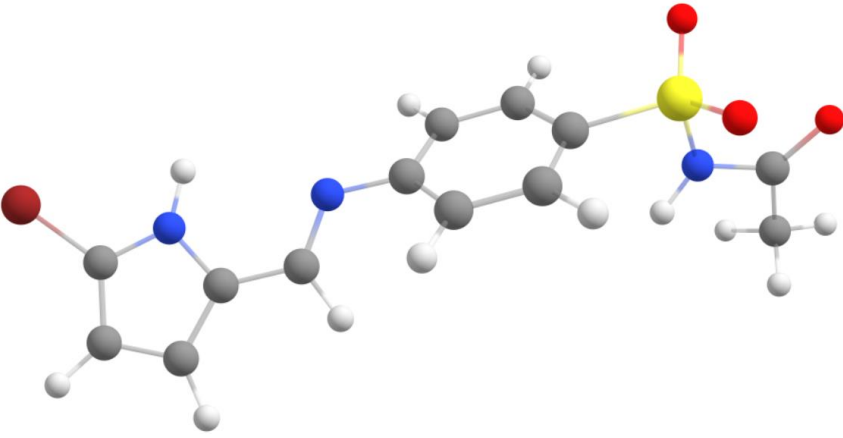
BH1	-1290,756944																																																																																																																																					
		<table border="0"> <tbody> <tr><td>C</td><td>1.384423000</td><td>-0.675187000</td><td>-0.141205000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.812018000</td><td>-0.937096000</td><td>1.097357000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.556743000</td><td>-0.866949000</td><td>1.234449000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-1.363535000</td><td>-0.518139000</td><td>0.147005000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.769343000</td><td>-0.283934000</td><td>-1.096271000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.603229000</td><td>-0.359646000</td><td>-1.240706000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.444814000</td><td>-1.211261000</td><td>1.932799000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.034683000</td><td>-1.079320000</td><td>2.182795000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-2.739237000</td><td>-0.475167000</td><td>0.342571000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.394263000</td><td>-0.080565000</td><td>-1.957718000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.076238000</td><td>-0.202266000</td><td>-2.202565000</td></tr> <tr><td>S</td><td>3.135529000</td><td>-0.781060000</td><td>-0.319311000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-3.436759000</td><td>0.427623000</td><td>-0.234460000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-4.857331000</td><td>0.468870000</td><td>-0.119657000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.774749000</td><td>1.361637000</td><td>-0.641960000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-7.051313000</td><td>0.944085000</td><td>-0.230351000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-6.880691000</td><td>-0.190371000</td><td>0.532681000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-5.556529000</td><td>-0.469965000</td><td>0.593604000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-5.110394000</td><td>-1.232748000</td><td>1.076715000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-7.608293000</td><td>-0.810161000</td><td>1.030659000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-7.994769000</td><td>1.411313000</td><td>-0.458964000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-5.530334000</td><td>2.216624000</td><td>-1.252874000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-2.983190000</td><td>1.230598000</td><td>-0.831140000</td></tr> <tr><td>O</td><td>3.651823000</td><td>-1.759618000</td><td>0.586002000</td></tr> <tr><td>O</td><td>3.457554000</td><td>-0.802509000</td><td>-1.715841000</td></tr> <tr><td>N</td><td>3.531001000</td><td>0.755138000</td><td>0.315026000</td></tr> <tr><td>C</td><td>4.846665000</td><td>1.213589000</td><td>0.352567000</td></tr> <tr><td>H</td><td>2.785538000</td><td>1.434422000</td><td>0.257022000</td></tr> <tr><td>C</td><td>4.951653000</td><td>2.674371000</td><td>0.695487000</td></tr> <tr><td>O</td><td>5.785012000</td><td>0.497364000</td><td>0.144840000</td></tr> <tr><td>H</td><td>6.000378000</td><td>2.931701000</td><td>0.819557000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.527858000</td><td>3.281054000</td><td>-0.108170000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.405725000</td><td>2.902511000</td><td>1.612825000</td></tr> </tbody> </table>	C	1.384423000	-0.675187000	-0.141205000	C	0.812018000	-0.937096000	1.097357000	C	-0.556743000	-0.866949000	1.234449000	C	-1.363535000	-0.518139000	0.147005000	C	-0.769343000	-0.283934000	-1.096271000	C	0.603229000	-0.359646000	-1.240706000	H	1.444814000	-1.211261000	1.932799000	H	-1.034683000	-1.079320000	2.182795000	N	-2.739237000	-0.475167000	0.342571000	H	-1.394263000	-0.080565000	-1.957718000	H	1.076238000	-0.202266000	-2.202565000	S	3.135529000	-0.781060000	-0.319311000	C	-3.436759000	0.427623000	-0.234460000	C	-4.857331000	0.468870000	-0.119657000	C	-5.774749000	1.361637000	-0.641960000	C	-7.051313000	0.944085000	-0.230351000	C	-6.880691000	-0.190371000	0.532681000	N	-5.556529000	-0.469965000	0.593604000	H	-5.110394000	-1.232748000	1.076715000	H	-7.608293000	-0.810161000	1.030659000	H	-7.994769000	1.411313000	-0.458964000	H	-5.530334000	2.216624000	-1.252874000	H	-2.983190000	1.230598000	-0.831140000	O	3.651823000	-1.759618000	0.586002000	O	3.457554000	-0.802509000	-1.715841000	N	3.531001000	0.755138000	0.315026000	C	4.846665000	1.213589000	0.352567000	H	2.785538000	1.434422000	0.257022000	C	4.951653000	2.674371000	0.695487000	O	5.785012000	0.497364000	0.144840000	H	6.000378000	2.931701000	0.819557000	H	4.527858000	3.281054000	-0.108170000	H	4.405725000	2.902511000	1.612825000
C	1.384423000	-0.675187000	-0.141205000																																																																																																																																			
C	0.812018000	-0.937096000	1.097357000																																																																																																																																			
C	-0.556743000	-0.866949000	1.234449000																																																																																																																																			
C	-1.363535000	-0.518139000	0.147005000																																																																																																																																			
C	-0.769343000	-0.283934000	-1.096271000																																																																																																																																			
C	0.603229000	-0.359646000	-1.240706000																																																																																																																																			
H	1.444814000	-1.211261000	1.932799000																																																																																																																																			
H	-1.034683000	-1.079320000	2.182795000																																																																																																																																			
N	-2.739237000	-0.475167000	0.342571000																																																																																																																																			
H	-1.394263000	-0.080565000	-1.957718000																																																																																																																																			
H	1.076238000	-0.202266000	-2.202565000																																																																																																																																			
S	3.135529000	-0.781060000	-0.319311000																																																																																																																																			
C	-3.436759000	0.427623000	-0.234460000																																																																																																																																			
C	-4.857331000	0.468870000	-0.119657000																																																																																																																																			
C	-5.774749000	1.361637000	-0.641960000																																																																																																																																			
C	-7.051313000	0.944085000	-0.230351000																																																																																																																																			
C	-6.880691000	-0.190371000	0.532681000																																																																																																																																			
N	-5.556529000	-0.469965000	0.593604000																																																																																																																																			
H	-5.110394000	-1.232748000	1.076715000																																																																																																																																			
H	-7.608293000	-0.810161000	1.030659000																																																																																																																																			
H	-7.994769000	1.411313000	-0.458964000																																																																																																																																			
H	-5.530334000	2.216624000	-1.252874000																																																																																																																																			
H	-2.983190000	1.230598000	-0.831140000																																																																																																																																			
O	3.651823000	-1.759618000	0.586002000																																																																																																																																			
O	3.457554000	-0.802509000	-1.715841000																																																																																																																																			
N	3.531001000	0.755138000	0.315026000																																																																																																																																			
C	4.846665000	1.213589000	0.352567000																																																																																																																																			
H	2.785538000	1.434422000	0.257022000																																																																																																																																			
C	4.951653000	2.674371000	0.695487000																																																																																																																																			
O	5.785012000	0.497364000	0.144840000																																																																																																																																			
H	6.000378000	2.931701000	0.819557000																																																																																																																																			
H	4.527858000	3.281054000	-0.108170000																																																																																																																																			
H	4.405725000	2.902511000	1.612825000																																																																																																																																			

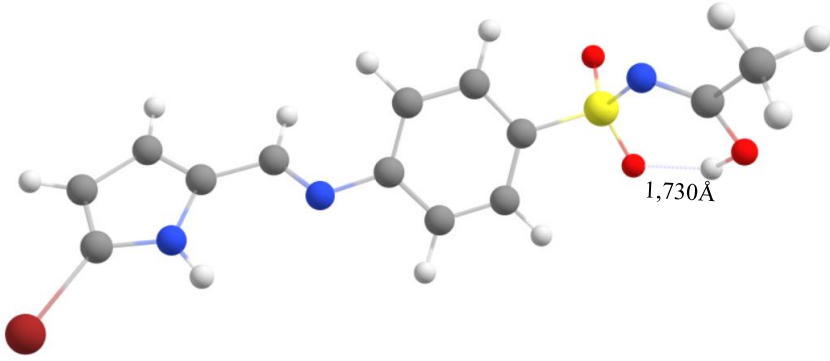
BH2	-1290,741894																																																																																																																																					
		<table border="0"> <tr><td>C</td><td>-1.367401000</td><td>-0.585380000</td><td>-0.044080000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.765236000</td><td>-0.439826000</td><td>-1.286722000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.597314000</td><td>-0.262772000</td><td>-1.360866000</td></tr> <tr><td>C</td><td>1.373954000</td><td>-0.234413000</td><td>-0.198233000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.756690000</td><td>-0.388487000</td><td>1.043885000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.610826000</td><td>-0.564206000</td><td>1.116056000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.369748000</td><td>-0.481256000</td><td>-2.184559000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.081531000</td><td>-0.153107000</td><td>-2.324807000</td></tr> <tr><td>N</td><td>2.738870000</td><td>-0.057567000</td><td>-0.337240000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.336324000</td><td>-0.384898000</td><td>1.956989000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.098465000</td><td>-0.706485000</td><td>2.072658000</td></tr> <tr><td>S</td><td>-3.108896000</td><td>-0.838716000</td><td>0.049292000</td></tr> <tr><td>C</td><td>3.678504000</td><td>0.015598000</td><td>0.627036000</td></tr> <tr><td>C</td><td>4.988899000</td><td>0.190610000</td><td>0.315959000</td></tr> <tr><td>C</td><td>6.112892000</td><td>0.292735000</td><td>1.201811000</td></tr> <tr><td>C</td><td>7.194938000</td><td>0.461312000</td><td>0.398666000</td></tr> <tr><td>C</td><td>6.687143000</td><td>0.455395000</td><td>-0.950074000</td></tr> <tr><td>N</td><td>5.392431000</td><td>0.297138000</td><td>-1.010407000</td></tr> <tr><td>H</td><td>7.279613000</td><td>0.566649000</td><td>-1.851208000</td></tr> <tr><td>H</td><td>8.226690000</td><td>0.576165000</td><td>0.693227000</td></tr> <tr><td>H</td><td>6.079753000</td><td>0.242129000</td><td>2.279981000</td></tr> <tr><td>H</td><td>3.359871000</td><td>-0.067363000</td><td>1.658278000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-3.551788000</td><td>-1.510058000</td><td>-1.132136000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-3.430470000</td><td>-1.321222000</td><td>1.359728000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-3.603978000</td><td>0.790211000</td><td>-0.076736000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-4.953191000</td><td>1.139956000</td><td>-0.000375000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-2.915854000</td><td>1.460298000</td><td>0.237117000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.171664000</td><td>2.620226000</td><td>0.146414000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-5.830513000</td><td>0.326543000</td><td>-0.065280000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-6.237927000</td><td>2.824832000</td><td>0.095644000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-4.786669000</td><td>2.965537000</td><td>1.108810000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-4.653328000</td><td>3.171696000</td><td>-0.640142000</td></tr> <tr><td>H</td><td>3.119331000</td><td>0.030194000</td><td>-1.275336000</td></tr> </table>	C	-1.367401000	-0.585380000	-0.044080000	C	-0.765236000	-0.439826000	-1.286722000	C	0.597314000	-0.262772000	-1.360866000	C	1.373954000	-0.234413000	-0.198233000	C	0.756690000	-0.388487000	1.043885000	C	-0.610826000	-0.564206000	1.116056000	H	-1.369748000	-0.481256000	-2.184559000	H	1.081531000	-0.153107000	-2.324807000	N	2.738870000	-0.057567000	-0.337240000	H	1.336324000	-0.384898000	1.956989000	H	-1.098465000	-0.706485000	2.072658000	S	-3.108896000	-0.838716000	0.049292000	C	3.678504000	0.015598000	0.627036000	C	4.988899000	0.190610000	0.315959000	C	6.112892000	0.292735000	1.201811000	C	7.194938000	0.461312000	0.398666000	C	6.687143000	0.455395000	-0.950074000	N	5.392431000	0.297138000	-1.010407000	H	7.279613000	0.566649000	-1.851208000	H	8.226690000	0.576165000	0.693227000	H	6.079753000	0.242129000	2.279981000	H	3.359871000	-0.067363000	1.658278000	O	-3.551788000	-1.510058000	-1.132136000	O	-3.430470000	-1.321222000	1.359728000	N	-3.603978000	0.790211000	-0.076736000	C	-4.953191000	1.139956000	-0.000375000	H	-2.915854000	1.460298000	0.237117000	C	-5.171664000	2.620226000	0.146414000	O	-5.830513000	0.326543000	-0.065280000	H	-6.237927000	2.824832000	0.095644000	H	-4.786669000	2.965537000	1.108810000	H	-4.653328000	3.171696000	-0.640142000	H	3.119331000	0.030194000	-1.275336000
C	-1.367401000	-0.585380000	-0.044080000																																																																																																																																			
C	-0.765236000	-0.439826000	-1.286722000																																																																																																																																			
C	0.597314000	-0.262772000	-1.360866000																																																																																																																																			
C	1.373954000	-0.234413000	-0.198233000																																																																																																																																			
C	0.756690000	-0.388487000	1.043885000																																																																																																																																			
C	-0.610826000	-0.564206000	1.116056000																																																																																																																																			
H	-1.369748000	-0.481256000	-2.184559000																																																																																																																																			
H	1.081531000	-0.153107000	-2.324807000																																																																																																																																			
N	2.738870000	-0.057567000	-0.337240000																																																																																																																																			
H	1.336324000	-0.384898000	1.956989000																																																																																																																																			
H	-1.098465000	-0.706485000	2.072658000																																																																																																																																			
S	-3.108896000	-0.838716000	0.049292000																																																																																																																																			
C	3.678504000	0.015598000	0.627036000																																																																																																																																			
C	4.988899000	0.190610000	0.315959000																																																																																																																																			
C	6.112892000	0.292735000	1.201811000																																																																																																																																			
C	7.194938000	0.461312000	0.398666000																																																																																																																																			
C	6.687143000	0.455395000	-0.950074000																																																																																																																																			
N	5.392431000	0.297138000	-1.010407000																																																																																																																																			
H	7.279613000	0.566649000	-1.851208000																																																																																																																																			
H	8.226690000	0.576165000	0.693227000																																																																																																																																			
H	6.079753000	0.242129000	2.279981000																																																																																																																																			
H	3.359871000	-0.067363000	1.658278000																																																																																																																																			
O	-3.551788000	-1.510058000	-1.132136000																																																																																																																																			
O	-3.430470000	-1.321222000	1.359728000																																																																																																																																			
N	-3.603978000	0.790211000	-0.076736000																																																																																																																																			
C	-4.953191000	1.139956000	-0.000375000																																																																																																																																			
H	-2.915854000	1.460298000	0.237117000																																																																																																																																			
C	-5.171664000	2.620226000	0.146414000																																																																																																																																			
O	-5.830513000	0.326543000	-0.065280000																																																																																																																																			
H	-6.237927000	2.824832000	0.095644000																																																																																																																																			
H	-4.786669000	2.965537000	1.108810000																																																																																																																																			
H	-4.653328000	3.171696000	-0.640142000																																																																																																																																			
H	3.119331000	0.030194000	-1.275336000																																																																																																																																			

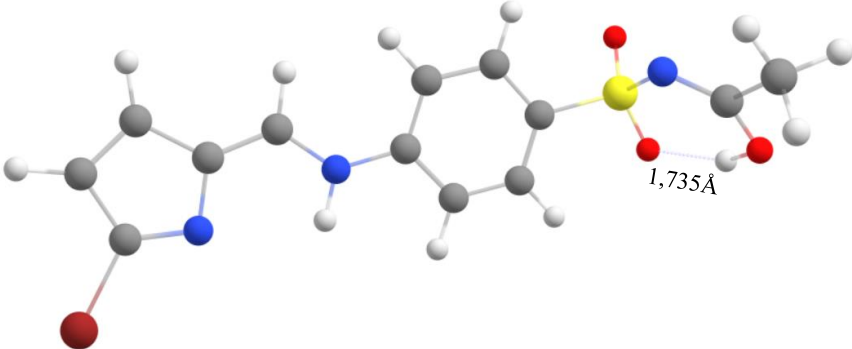
BH3**-1290,744432**

C	1.427672000	-0.650721000	-0.063655000
C	0.839520000	-0.681410000	1.189379000
C	-0.524128000	-0.510815000	1.302209000
C	-1.308091000	-0.302710000	0.166786000
C	-0.701914000	-0.278230000	-1.091788000
C	0.659793000	-0.455449000	-1.201988000
H	1.452343000	-0.851052000	2.065289000
H	-0.998120000	-0.540514000	2.276937000
N	-2.672399000	-0.130507000	0.340461000
H	-1.287448000	-0.126205000	-1.988494000
H	1.136648000	-0.447243000	-2.174559000
S	3.164285000	-0.861283000	-0.240892000
C	-3.614897000	0.078003000	-0.597524000
C	-4.923115000	0.233134000	-0.262383000
C	-6.043290000	0.458822000	-1.128337000
C	-7.124891000	0.544337000	-0.309823000
C	-6.619379000	0.366896000	1.026598000
N	-5.326394000	0.182835000	1.066648000
H	-7.211075000	0.376797000	1.935102000
H	-8.154246000	0.710652000	-0.587944000
H	-6.009234000	0.539468000	-2.204727000
H	-3.301796000	0.118576000	-1.633065000
O	3.691230000	-1.276225000	1.057045000
O	3.417261000	-1.680400000	-1.388236000
N	3.636671000	0.676514000	-0.611226000
C	4.525917000	1.303749000	0.074972000
C	4.927134000	2.675235000	-0.324549000
O	5.171607000	0.874643000	1.141215000
H	4.760655000	3.360489000	0.508456000
H	5.996590000	2.687990000	-0.542693000
H	4.366305000	2.998956000	-1.196358000
H	-3.043185000	-0.159763000	1.285824000
H	4.836073000	-0.018709000	1.379737000

BH4	-1290,760714																																																																																																																																					
		<table border="0"> <tbody> <tr><td>C</td><td>1.414831000</td><td>-0.540530000</td><td>0.202953000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.859996000</td><td>-0.001340000</td><td>1.352743000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.488638000</td><td>0.290002000</td><td>1.379103000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-1.293999000</td><td>0.028106000</td><td>0.270350000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.710205000</td><td>-0.499299000</td><td>-0.886785000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.637883000</td><td>-0.788533000</td><td>-0.918947000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.486736000</td><td>0.179672000</td><td>2.216340000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-0.949675000</td><td>0.713976000</td><td>2.262726000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-2.645732000</td><td>0.350137000</td><td>0.352400000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.318187000</td><td>-0.655729000</td><td>-1.769857000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.096675000</td><td>-1.200876000</td><td>-1.809684000</td></tr> <tr><td>S</td><td>3.133079000</td><td>-0.911491000</td><td>0.135560000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-3.516598000</td><td>-0.411618000</td><td>-0.190075000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-4.905838000</td><td>-0.084943000</td><td>-0.185608000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.991463000</td><td>-0.767794000</td><td>-0.700434000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-7.138787000</td><td>-0.002870000</td><td>-0.428637000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-6.724632000</td><td>1.124328000</td><td>0.245956000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-5.377814000</td><td>1.067354000</td><td>0.386741000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-7.294497000</td><td>1.954048000</td><td>0.631109000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-8.156524000</td><td>-0.239745000</td><td>-0.690826000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-5.942083000</td><td>-1.714921000</td><td>-1.214818000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-3.252447000</td><td>-1.363523000</td><td>-0.669753000</td></tr> <tr><td>O</td><td>3.669932000</td><td>-0.776174000</td><td>1.488135000</td></tr> <tr><td>O</td><td>3.316174000</td><td>-2.150274000</td><td>-0.560168000</td></tr> <tr><td>N</td><td>3.687211000</td><td>0.296642000</td><td>-0.846161000</td></tr> <tr><td>C</td><td>4.611728000</td><td>1.109812000</td><td>-0.475605000</td></tr> <tr><td>C</td><td>5.080451000</td><td>2.162653000</td><td>-1.410964000</td></tr> <tr><td>O</td><td>5.242307000</td><td>1.142570000</td><td>0.682282000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.940234000</td><td>3.143490000</td><td>-0.952711000</td></tr> <tr><td>H</td><td>6.150832000</td><td>2.039407000</td><td>-1.585617000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.540844000</td><td>2.107189000</td><td>-2.351854000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.864384000</td><td>0.448690000</td><td>1.268903000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-4.776897000</td><td>1.736427000</td><td>0.839927000</td></tr> </tbody> </table>	C	1.414831000	-0.540530000	0.202953000	C	0.859996000	-0.001340000	1.352743000	C	-0.488638000	0.290002000	1.379103000	C	-1.293999000	0.028106000	0.270350000	C	-0.710205000	-0.499299000	-0.886785000	C	0.637883000	-0.788533000	-0.918947000	H	1.486736000	0.179672000	2.216340000	H	-0.949675000	0.713976000	2.262726000	N	-2.645732000	0.350137000	0.352400000	H	-1.318187000	-0.655729000	-1.769857000	H	1.096675000	-1.200876000	-1.809684000	S	3.133079000	-0.911491000	0.135560000	C	-3.516598000	-0.411618000	-0.190075000	C	-4.905838000	-0.084943000	-0.185608000	C	-5.991463000	-0.767794000	-0.700434000	C	-7.138787000	-0.002870000	-0.428637000	C	-6.724632000	1.124328000	0.245956000	N	-5.377814000	1.067354000	0.386741000	H	-7.294497000	1.954048000	0.631109000	H	-8.156524000	-0.239745000	-0.690826000	H	-5.942083000	-1.714921000	-1.214818000	H	-3.252447000	-1.363523000	-0.669753000	O	3.669932000	-0.776174000	1.488135000	O	3.316174000	-2.150274000	-0.560168000	N	3.687211000	0.296642000	-0.846161000	C	4.611728000	1.109812000	-0.475605000	C	5.080451000	2.162653000	-1.410964000	O	5.242307000	1.142570000	0.682282000	H	4.940234000	3.143490000	-0.952711000	H	6.150832000	2.039407000	-1.585617000	H	4.540844000	2.107189000	-2.351854000	H	4.864384000	0.448690000	1.268903000	H	-4.776897000	1.736427000	0.839927000
C	1.414831000	-0.540530000	0.202953000																																																																																																																																			
C	0.859996000	-0.001340000	1.352743000																																																																																																																																			
C	-0.488638000	0.290002000	1.379103000																																																																																																																																			
C	-1.293999000	0.028106000	0.270350000																																																																																																																																			
C	-0.710205000	-0.499299000	-0.886785000																																																																																																																																			
C	0.637883000	-0.788533000	-0.918947000																																																																																																																																			
H	1.486736000	0.179672000	2.216340000																																																																																																																																			
H	-0.949675000	0.713976000	2.262726000																																																																																																																																			
N	-2.645732000	0.350137000	0.352400000																																																																																																																																			
H	-1.318187000	-0.655729000	-1.769857000																																																																																																																																			
H	1.096675000	-1.200876000	-1.809684000																																																																																																																																			
S	3.133079000	-0.911491000	0.135560000																																																																																																																																			
C	-3.516598000	-0.411618000	-0.190075000																																																																																																																																			
C	-4.905838000	-0.084943000	-0.185608000																																																																																																																																			
C	-5.991463000	-0.767794000	-0.700434000																																																																																																																																			
C	-7.138787000	-0.002870000	-0.428637000																																																																																																																																			
C	-6.724632000	1.124328000	0.245956000																																																																																																																																			
N	-5.377814000	1.067354000	0.386741000																																																																																																																																			
H	-7.294497000	1.954048000	0.631109000																																																																																																																																			
H	-8.156524000	-0.239745000	-0.690826000																																																																																																																																			
H	-5.942083000	-1.714921000	-1.214818000																																																																																																																																			
H	-3.252447000	-1.363523000	-0.669753000																																																																																																																																			
O	3.669932000	-0.776174000	1.488135000																																																																																																																																			
O	3.316174000	-2.150274000	-0.560168000																																																																																																																																			
N	3.687211000	0.296642000	-0.846161000																																																																																																																																			
C	4.611728000	1.109812000	-0.475605000																																																																																																																																			
C	5.080451000	2.162653000	-1.410964000																																																																																																																																			
O	5.242307000	1.142570000	0.682282000																																																																																																																																			
H	4.940234000	3.143490000	-0.952711000																																																																																																																																			
H	6.150832000	2.039407000	-1.585617000																																																																																																																																			
H	4.540844000	2.107189000	-2.351854000																																																																																																																																			
H	4.864384000	0.448690000	1.268903000																																																																																																																																			
H	-4.776897000	1.736427000	0.839927000																																																																																																																																			

BBr1	-3864,179748			
N	4.084616000	0.032027000	-0.050690000	
C	3.284821000	1.105117000	0.257708000	
C	4.111738000	2.188264000	0.484929000	
C	5.439424000	1.761545000	0.310597000	
C	5.376861000	0.427444000	-0.018559000	
C	1.863907000	0.990850000	0.308274000	
N	1.271326000	-0.108497000	0.039253000	
C	-0.109507000	-0.207025000	0.169035000	
C	-0.803833000	-0.963990000	-0.779813000	
C	-2.169956000	-1.115685000	-0.690323000	
C	-2.850704000	-0.522479000	0.365603000	
C	-2.180160000	0.207552000	1.333063000	
C	-0.810202000	0.363723000	1.234709000	
S	-4.595323000	-0.745484000	0.499011000	
N	-5.077692000	0.454506000	-0.617348000	
C	-6.425031000	0.737210000	-0.838472000	
O	-7.304420000	0.024786000	-0.444031000	
O	-4.958714000	-2.012253000	-0.054382000	
O	-5.011193000	-0.348629000	1.812055000	
C	-6.643220000	2.001332000	-1.623334000	
H	-2.716855000	-1.706025000	-1.415583000	
H	-0.241389000	-1.428209000	-1.580274000	
H	-0.267692000	0.893490000	2.008601000	
H	-2.734151000	0.622519000	2.166146000	
H	3.733621000	-0.888711000	-0.263959000	
Br	6.758663000	-0.769913000	-0.389521000	
H	6.341221000	2.341915000	0.408564000	
H	3.778210000	3.179728000	0.749116000	
H	1.320560000	1.907941000	0.573332000	
H	-4.402312000	1.193807000	-0.751455000	
H	-7.695121000	2.073241000	-1.887418000	
H	-6.368714000	2.868341000	-1.017738000	
H	-6.033387000	2.016062000	-2.528409000	

BBr2	-3864,183139																																																																																																																																					
		<table border="0"> <tbody> <tr><td>N</td><td>4.026107000</td><td>0.057985000</td><td>-0.003432000</td></tr> <tr><td>C</td><td>3.361461000</td><td>-1.112005000</td><td>0.271091000</td></tr> <tr><td>C</td><td>4.307060000</td><td>-2.055943000</td><td>0.620134000</td></tr> <tr><td>C</td><td>5.571609000</td><td>-1.444618000</td><td>0.555346000</td></tr> <tr><td>C</td><td>5.352628000</td><td>-0.144387000</td><td>0.166423000</td></tr> <tr><td>C</td><td>1.940601000</td><td>-1.210091000</td><td>0.174912000</td></tr> <tr><td>N</td><td>1.223056000</td><td>-0.218466000</td><td>-0.189661000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.164291000</td><td>-0.340292000</td><td>-0.210164000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.863555000</td><td>0.274287000</td><td>-1.248532000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-2.239507000</td><td>0.184775000</td><td>-1.316672000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-2.923050000</td><td>-0.505820000</td><td>-0.329199000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-2.250112000</td><td>-1.102726000</td><td>0.726347000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-0.875534000</td><td>-1.013997000</td><td>0.788506000</td></tr> <tr><td>S</td><td>-4.675581000</td><td>-0.649818000</td><td>-0.397117000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-5.130676000</td><td>0.310794000</td><td>0.866813000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.961907000</td><td>1.281134000</td><td>0.721660000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-6.553304000</td><td>1.678086000</td><td>-0.388190000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-5.116536000</td><td>-0.085667000</td><td>-1.670928000</td></tr> <tr><td>O</td><td>-5.043834000</td><td>-1.995714000</td><td>-0.071646000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-6.353995000</td><td>2.093167000</td><td>1.900460000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-2.789529000</td><td>0.639132000</td><td>-2.130753000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-0.301520000</td><td>0.808233000</td><td>-2.004705000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-0.341969000</td><td>-1.445762000</td><td>1.626884000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-2.809511000</td><td>-1.627740000</td><td>1.491257000</td></tr> <tr><td>Br</td><td>6.583613000</td><td>1.227776000</td><td>-0.125814000</td></tr> <tr><td>H</td><td>6.532874000</td><td>-1.884090000</td><td>0.761779000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.093007000</td><td>-3.078148000</td><td>0.890860000</td></tr> <tr><td>H</td><td>1.514850000</td><td>-2.193772000</td><td>0.413881000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-6.118419000</td><td>3.142417000</td><td>1.713392000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-7.434414000</td><td>2.025925000</td><td>2.040579000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-5.841231000</td><td>1.745471000</td><td>2.792454000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-6.219645000</td><td>1.136760000</td><td>-1.138985000</td></tr> <tr><td>H</td><td>3.569876000</td><td>0.909758000</td><td>-0.291068000</td></tr> </tbody> </table>	N	4.026107000	0.057985000	-0.003432000	C	3.361461000	-1.112005000	0.271091000	C	4.307060000	-2.055943000	0.620134000	C	5.571609000	-1.444618000	0.555346000	C	5.352628000	-0.144387000	0.166423000	C	1.940601000	-1.210091000	0.174912000	N	1.223056000	-0.218466000	-0.189661000	C	-0.164291000	-0.340292000	-0.210164000	C	-0.863555000	0.274287000	-1.248532000	C	-2.239507000	0.184775000	-1.316672000	C	-2.923050000	-0.505820000	-0.329199000	C	-2.250112000	-1.102726000	0.726347000	C	-0.875534000	-1.013997000	0.788506000	S	-4.675581000	-0.649818000	-0.397117000	N	-5.130676000	0.310794000	0.866813000	C	-5.961907000	1.281134000	0.721660000	O	-6.553304000	1.678086000	-0.388190000	O	-5.116536000	-0.085667000	-1.670928000	O	-5.043834000	-1.995714000	-0.071646000	C	-6.353995000	2.093167000	1.900460000	H	-2.789529000	0.639132000	-2.130753000	H	-0.301520000	0.808233000	-2.004705000	H	-0.341969000	-1.445762000	1.626884000	H	-2.809511000	-1.627740000	1.491257000	Br	6.583613000	1.227776000	-0.125814000	H	6.532874000	-1.884090000	0.761779000	H	4.093007000	-3.078148000	0.890860000	H	1.514850000	-2.193772000	0.413881000	H	-6.118419000	3.142417000	1.713392000	H	-7.434414000	2.025925000	2.040579000	H	-5.841231000	1.745471000	2.792454000	H	-6.219645000	1.136760000	-1.138985000	H	3.569876000	0.909758000	-0.291068000
N	4.026107000	0.057985000	-0.003432000																																																																																																																																			
C	3.361461000	-1.112005000	0.271091000																																																																																																																																			
C	4.307060000	-2.055943000	0.620134000																																																																																																																																			
C	5.571609000	-1.444618000	0.555346000																																																																																																																																			
C	5.352628000	-0.144387000	0.166423000																																																																																																																																			
C	1.940601000	-1.210091000	0.174912000																																																																																																																																			
N	1.223056000	-0.218466000	-0.189661000																																																																																																																																			
C	-0.164291000	-0.340292000	-0.210164000																																																																																																																																			
C	-0.863555000	0.274287000	-1.248532000																																																																																																																																			
C	-2.239507000	0.184775000	-1.316672000																																																																																																																																			
C	-2.923050000	-0.505820000	-0.329199000																																																																																																																																			
C	-2.250112000	-1.102726000	0.726347000																																																																																																																																			
C	-0.875534000	-1.013997000	0.788506000																																																																																																																																			
S	-4.675581000	-0.649818000	-0.397117000																																																																																																																																			
N	-5.130676000	0.310794000	0.866813000																																																																																																																																			
C	-5.961907000	1.281134000	0.721660000																																																																																																																																			
O	-6.553304000	1.678086000	-0.388190000																																																																																																																																			
O	-5.116536000	-0.085667000	-1.670928000																																																																																																																																			
O	-5.043834000	-1.995714000	-0.071646000																																																																																																																																			
C	-6.353995000	2.093167000	1.900460000																																																																																																																																			
H	-2.789529000	0.639132000	-2.130753000																																																																																																																																			
H	-0.301520000	0.808233000	-2.004705000																																																																																																																																			
H	-0.341969000	-1.445762000	1.626884000																																																																																																																																			
H	-2.809511000	-1.627740000	1.491257000																																																																																																																																			
Br	6.583613000	1.227776000	-0.125814000																																																																																																																																			
H	6.532874000	-1.884090000	0.761779000																																																																																																																																			
H	4.093007000	-3.078148000	0.890860000																																																																																																																																			
H	1.514850000	-2.193772000	0.413881000																																																																																																																																			
H	-6.118419000	3.142417000	1.713392000																																																																																																																																			
H	-7.434414000	2.025925000	2.040579000																																																																																																																																			
H	-5.841231000	1.745471000	2.792454000																																																																																																																																			
H	-6.219645000	1.136760000	-1.138985000																																																																																																																																			
H	3.569876000	0.909758000	-0.291068000																																																																																																																																			

BBr3	-3864,177290			
N	-3.981275000	-0.062855000	0.026152000	
C	-3.393118000	1.172022000	0.278865000	
C	-4.382141000	2.152064000	0.619248000	
C	-5.575844000	1.505481000	0.571741000	
C	-5.245998000	0.156722000	0.202371000	
C	-2.045815000	1.333317000	0.186601000	
N	-1.235580000	0.314857000	-0.150435000	
C	0.145503000	0.322944000	-0.289103000	
C	0.770177000	-0.859431000	-0.685091000	
C	2.139784000	-0.908420000	-0.839505000	
C	2.892481000	0.228997000	-0.603034000	
C	2.284119000	1.412591000	-0.212807000	
C	0.916729000	1.462365000	-0.050774000	
S	4.639196000	0.202102000	-0.810341000	
N	5.149718000	0.248923000	0.758133000	
C	5.957691000	-0.629422000	1.239336000	
O	6.480267000	-1.668760000	0.619463000	
O	4.985390000	-1.069946000	-1.439256000	
O	5.047540000	1.422787000	-1.438458000	
C	6.402189000	-0.521834000	2.650736000	
H	2.629564000	-1.820553000	-1.155289000	
H	0.168568000	-1.740776000	-0.877038000	
H	0.456857000	2.392353000	0.255661000	
H	2.888967000	2.294541000	-0.041536000	
Br	-6.537372000	-1.196372000	-0.010867000	
H	-6.566017000	1.887283000	0.761741000	
H	-4.193486000	3.187969000	0.860399000	
H	-1.598422000	2.299143000	0.382614000	
H	6.147977000	-1.440422000	3.182696000	
H	7.488950000	-0.424160000	2.679512000	
H	5.939582000	0.333862000	3.133798000	
H	-1.726202000	-0.556548000	-0.326955000	
H	6.114389000	-1.716809000	-0.292242000	

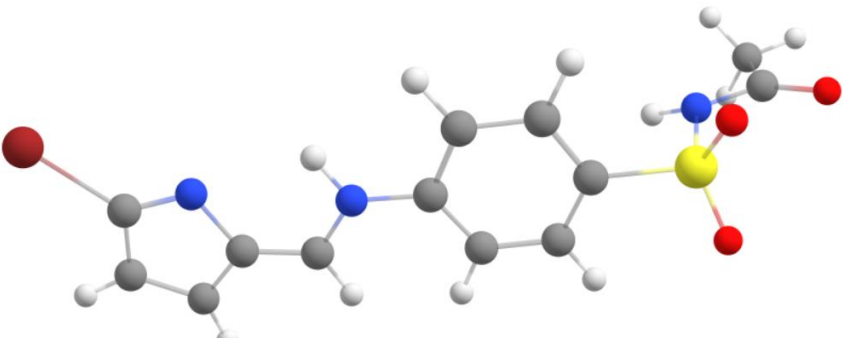
BBr4	-3864,173648																																																																																																																																					
		<table border="0"> <tbody> <tr><td>N</td><td>-4.024046000</td><td>-0.061311000</td><td>0.034633000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-3.436350000</td><td>1.166702000</td><td>0.322488000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-4.428073000</td><td>2.139452000</td><td>0.680496000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.620828000</td><td>1.495650000</td><td>0.607412000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-5.289441000</td><td>0.154900000</td><td>0.206078000</td></tr> <tr><td>C</td><td>-2.089737000</td><td>1.327310000</td><td>0.241339000</td></tr> <tr><td>N</td><td>-1.281193000</td><td>0.310653000</td><td>-0.114576000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.097108000</td><td>0.317968000</td><td>-0.254205000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.721618000</td><td>-0.873279000</td><td>-0.636137000</td></tr> <tr><td>C</td><td>2.087587000</td><td>-0.924963000</td><td>-0.795203000</td></tr> <tr><td>C</td><td>2.844857000</td><td>0.216291000</td><td>-0.567715000</td></tr> <tr><td>C</td><td>2.239356000</td><td>1.404642000</td><td>-0.193626000</td></tr> <tr><td>C</td><td>0.868967000</td><td>1.459435000</td><td>-0.035190000</td></tr> <tr><td>S</td><td>4.592568000</td><td>0.156581000</td><td>-0.793002000</td></tr> <tr><td>N</td><td>5.011801000</td><td>-0.515578000</td><td>0.718458000</td></tr> <tr><td>C</td><td>6.347996000</td><td>-0.728952000</td><td>1.066289000</td></tr> <tr><td>O</td><td>7.235532000</td><td>-0.676202000</td><td>0.263540000</td></tr> <tr><td>O</td><td>4.906564000</td><td>-0.813650000</td><td>-1.793915000</td></tr> <tr><td>O</td><td>5.088740000</td><td>1.499618000</td><td>-0.857542000</td></tr> <tr><td>C</td><td>6.533695000</td><td>-1.043843000</td><td>2.524383000</td></tr> <tr><td>H</td><td>2.575080000</td><td>-1.840137000</td><td>-1.108510000</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.117628000</td><td>-1.755513000</td><td>-0.816044000</td></tr> <tr><td>H</td><td>0.409302000</td><td>2.397263000</td><td>0.246637000</td></tr> <tr><td>H</td><td>2.847605000</td><td>2.288474000</td><td>-0.046999000</td></tr> <tr><td>Br</td><td>-6.580288000</td><td>-1.188203000</td><td>-0.056435000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-6.612342000</td><td>1.873390000</td><td>0.798612000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-4.240714000</td><td>3.169000000</td><td>0.948175000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.639444000</td><td>2.286078000</td><td>0.462825000</td></tr> <tr><td>H</td><td>4.352291000</td><td>-0.315686000</td><td>1.457664000</td></tr> <tr><td>H</td><td>7.574523000</td><td>-1.304293000</td><td>2.698262000</td></tr> <tr><td>H</td><td>6.276979000</td><td>-0.173351000</td><td>3.132728000</td></tr> <tr><td>H</td><td>5.890753000</td><td>-1.870485000</td><td>2.832149000</td></tr> <tr><td>H</td><td>-1.775829000</td><td>-0.555276000</td><td>-0.306952000</td></tr> </tbody> </table>	N	-4.024046000	-0.061311000	0.034633000	C	-3.436350000	1.166702000	0.322488000	C	-4.428073000	2.139452000	0.680496000	C	-5.620828000	1.495650000	0.607412000	C	-5.289441000	0.154900000	0.206078000	C	-2.089737000	1.327310000	0.241339000	N	-1.281193000	0.310653000	-0.114576000	C	0.097108000	0.317968000	-0.254205000	C	0.721618000	-0.873279000	-0.636137000	C	2.087587000	-0.924963000	-0.795203000	C	2.844857000	0.216291000	-0.567715000	C	2.239356000	1.404642000	-0.193626000	C	0.868967000	1.459435000	-0.035190000	S	4.592568000	0.156581000	-0.793002000	N	5.011801000	-0.515578000	0.718458000	C	6.347996000	-0.728952000	1.066289000	O	7.235532000	-0.676202000	0.263540000	O	4.906564000	-0.813650000	-1.793915000	O	5.088740000	1.499618000	-0.857542000	C	6.533695000	-1.043843000	2.524383000	H	2.575080000	-1.840137000	-1.108510000	H	0.117628000	-1.755513000	-0.816044000	H	0.409302000	2.397263000	0.246637000	H	2.847605000	2.288474000	-0.046999000	Br	-6.580288000	-1.188203000	-0.056435000	H	-6.612342000	1.873390000	0.798612000	H	-4.240714000	3.169000000	0.948175000	H	-1.639444000	2.286078000	0.462825000	H	4.352291000	-0.315686000	1.457664000	H	7.574523000	-1.304293000	2.698262000	H	6.276979000	-0.173351000	3.132728000	H	5.890753000	-1.870485000	2.832149000	H	-1.775829000	-0.555276000	-0.306952000
N	-4.024046000	-0.061311000	0.034633000																																																																																																																																			
C	-3.436350000	1.166702000	0.322488000																																																																																																																																			
C	-4.428073000	2.139452000	0.680496000																																																																																																																																			
C	-5.620828000	1.495650000	0.607412000																																																																																																																																			
C	-5.289441000	0.154900000	0.206078000																																																																																																																																			
C	-2.089737000	1.327310000	0.241339000																																																																																																																																			
N	-1.281193000	0.310653000	-0.114576000																																																																																																																																			
C	0.097108000	0.317968000	-0.254205000																																																																																																																																			
C	0.721618000	-0.873279000	-0.636137000																																																																																																																																			
C	2.087587000	-0.924963000	-0.795203000																																																																																																																																			
C	2.844857000	0.216291000	-0.567715000																																																																																																																																			
C	2.239356000	1.404642000	-0.193626000																																																																																																																																			
C	0.868967000	1.459435000	-0.035190000																																																																																																																																			
S	4.592568000	0.156581000	-0.793002000																																																																																																																																			
N	5.011801000	-0.515578000	0.718458000																																																																																																																																			
C	6.347996000	-0.728952000	1.066289000																																																																																																																																			
O	7.235532000	-0.676202000	0.263540000																																																																																																																																			
O	4.906564000	-0.813650000	-1.793915000																																																																																																																																			
O	5.088740000	1.499618000	-0.857542000																																																																																																																																			
C	6.533695000	-1.043843000	2.524383000																																																																																																																																			
H	2.575080000	-1.840137000	-1.108510000																																																																																																																																			
H	0.117628000	-1.755513000	-0.816044000																																																																																																																																			
H	0.409302000	2.397263000	0.246637000																																																																																																																																			
H	2.847605000	2.288474000	-0.046999000																																																																																																																																			
Br	-6.580288000	-1.188203000	-0.056435000																																																																																																																																			
H	-6.612342000	1.873390000	0.798612000																																																																																																																																			
H	-4.240714000	3.169000000	0.948175000																																																																																																																																			
H	-1.639444000	2.286078000	0.462825000																																																																																																																																			
H	4.352291000	-0.315686000	1.457664000																																																																																																																																			
H	7.574523000	-1.304293000	2.698262000																																																																																																																																			
H	6.276979000	-0.173351000	3.132728000																																																																																																																																			
H	5.890753000	-1.870485000	2.832149000																																																																																																																																			
H	-1.775829000	-0.555276000	-0.306952000																																																																																																																																			

Tabela S4. Wartości energii swobodnych Gibbsa zoptymalizowanych tautomerów związku ScB_A i związku ScB_B.

	Tautomer			
	Pochodna ScB_AH			
	A1	A2	A4	A3
G [hartree]	-1705,936566	-1705,923224	-1705,925087	-1705,911101
ΔG [kcal/mol]	0,00	8,37	7,20	15,98
	Pochodna ScB_ABr			
G [hartree]	-4279,360265	-4279,354429	-4279,353541	-4279,348753
ΔG [kcal/mol]	0,00	3,66	4,22	7,22
	Pochodna ScB_BH			
	B1	B4	B3	B2
G [hartree]	-1290,756944/ -1290,791941	-1290,760714/ -1290,782565	-1290,744432	-1290,741894
ΔG [kcal/mol] f. gaz./woda	2,37/ 0,00	0,00/5,88	10,22	11,81
	Pochodna ScB_BBr			
G [hartree]	-3864,179748	-3864,177290	-3864,183139	-3864,173648
ΔG [kcal/mol]	0,00	1,54	2,13	3,83

Tabela S5. Wartości energii swobodnych Gibbsa zoptymalizowanych struktur zjonizowanych pochodnych A1 (ScB_AH i ScB_ABr).

Forma jonowa				
ScB_AH		ScB_ABr		
dwusprotonowana H₄A²⁺				
P2P3		P2P3		
Ggas [hartree]	-1706,573699	-4279,997943		
GH ₂ O [hartree]	-1706,820442	-4280,240214		
jednosprotonowana H₃A⁺				
	P2	P3	P2	P3
Ggas [hartree]	-1706,296900	-1706,298878	-4279,720051	-4279,721744
GH ₂ O [hartree]	-1706,403491	-1706,385417	-4279,825269	-4279,808370
neutralna H₂A				
Ggas [hartree]	-1705,936566		-4279,360265	
GH ₂ O [hartree]	-1705,965280		-4279,388686	
zdeprotonowana HA⁻				
	D1	D4	D1	D4
Ggas [hartree]	-1705,398080	-1705,414348	-4278,837846	-4278,839419
GH ₂ O [hartree]	-1705,497217	-1705,516166	-4278,931011	-4278,939323
podwójnie zdeprotonowana A²⁻				
	D1D4		D1D4	
Ggas [hartree]	-1704,805677		-4278,249467	
GH ₂ O [hartree]	-1705,044848		-4278,480104	

Tabela S6. Wartości energii swobodnych Gibbsa zoptymalizowanych struktur zjonizowanych pochodnej ScB_B1 (ScB_BH i ScB_BBr).

Forma jonowa				
ScB_BH			ScB_BBr	
dwusprotonowana H₄A²⁺				
P2P4			P2P4	
Ggas [hartree]	-1291,367533		-3864,790127	
GH ₂ O [hartree]	-1291,634272		-3865,052142	
jednosprotonowana H₃A⁺				
	P2	P4	P2	P4
Ggas [hartree]	-1291,120934	-1291,097589	-3864,543690	-3864,520925
GH ₂ O [hartree]	-1291,233142	-1291,199118	-3864,651370	-3864,621441
neutralna H₂A				
Ggas [hartree]	-1290,756944		-3864,179748	
GH ₂ O [hartree]	-1290,791941		-3864,213768	
zdeprotonowana HA⁻				
	D1	D3	D1	D3
Ggas [hartree]	-1290,227432	-1290,240189	-3863,667193	-3863,666198
GH ₂ O [hartree]	-1290,323689	-1290,347796	-3863,760130	-3863,770175
podwójnie zdeprotonowana A²⁻				
	D1D3		D1D3	
Ggas [hartree]	-1289,629624		-3863,073318	
GH ₂ O [hartree]	-1289,877162		-3863,312821	

Tabela S6. Wartości energii swobodnych Gibbsa zoptymalizowanych struktur zjonizowanych pochodnej BH4 związku ScB_BH.

Forma jonowa				
BH4				
dwusprotonowana H₄A²⁺			ΔG [kcal/mol]	
P2P3				
Ggas [hartree]	-1291,374284		-	
GH ₂ O [hartree]	-1291,634258		-	
dwusprotonowana H₄A²⁺				
	P2	P3	P2	P3
Ggas [hartree]	-1291,115218	-1291,109770	0,00	3,42
GH ₂ O [hartree]	-1291,221397	-1291,200048	0,00	13,40
neutralna H₂A				
Ggas [hartree]	-1290,760714		-	
GH ₂ O [hartree]	-1290,782565		-	
zdeprotonowana HA⁻				
	D1	D4	D1	D4
Ggas [hartree]	-1290,225123	-1290,238669	8,50	0,00
GH ₂ O [hartree]	-1290,315800	-1290,347653	19,99	0,00
podwójnie zdeprotonowana A²⁻				
D1D4				
Ggas [hartree]	-1289,629413		-	
GH ₂ O [hartree]	-1289,878212		-	

Tabela S6. Wartości stałych dysocjacji kwasowej (pKaH/pKa) pochodnej BH4 związku ScB_BH wyznaczone metodą SMD/M06/6-311++G(2d,2p).

Związek	wartość pKaH/pKa			
	pKaH ₁	pKaH ₂	pKa ₃	pKa ₄
BH4	-8,22	3,72	1,92	17,80