



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

Escola Superior de Tecnologia i Ciències Experimentals
Departament de Química Física i Analítica
Àrea de Química Física

TESIS DOCTORAL

Estudio teórico del mecanismo antimalaria de la artemisinina y sus derivados

Pamela Moles Tena
Castellón de la Plana, julio de 2011



Vicent Sixte Safont Villarreal, profesor titular de Química Física del Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló, y Mónica Oliva Domínguez, profesora titular Química Física del Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló,

CERTIFICAN

Que el trabajo con título **Estudio teórico del mecanismo antimalaria de la artemisinina y sus derivados** has sido realizado por Pamela Moles Tena bajo nuestra dirección, para optar al grado de Doctora en Química.

Así, autorizan la presentación de este trabajo a efectos de seguir los trámites correspondientes de la Universitat Jaume I de Castelló.

Castelló de la Plana, 6 de julio de 2011.

Vicent Sixte Safont Villarreal

Mónica Oliva Domínguez

A mi familia, a Sergi y a mis amigos

Agradecimientos

La elaboración de esta tesis doctoral no habría sido posible sin la colaboración y el apoyo de muchas personas, a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Sin duda, gran parte del mérito que este trabajo pueda tener corresponde a mis directores de tesis, los doctores Vicent Sixte Safont Villarreal y Mónica Oliva Domínguez, por su inestimable ayuda y constante dedicación, pero sobre todo les quiero expresar mi gratitud por mostrarme su lado más humano a lo largo de todos estos años.

No menos importante ha sido la colaboración y los ánimos prestados por los que han compartido, en una época u otra, despacho conmigo: Lourdes Gracia, Maite Roca, Silvia Ferrer, Sergio Martí, Patricio González, Conchín Meliá, Nacho Viciano, Javi Ruiz y Raquel Castillo. El ritual del café, acompañado de los largos momentos de tertulia, constituye una parte también importante en esta etapa que he compartido con todos ellos. Y, en general, me gustaría agradecer a todos los miembros del grupo de Química Teórica y Computacional la hospitalidad y cercanía que han hecho tan agradables las horas de trabajo, entre ellos a Juan Andrés, Armando Beltrán y Vicente Moliner; así como a nuestros “vecinos” de

pasillo, Rosa Llusar, Eva Guillamón, Iván Sorribes, Tomás Beltrán, Cristian Vicent y, en su día, Marta Feliz. En estas líneas quiero mencionar muy afectuosamente a Sonia Triguero, quien siempre nos acompañará en nuestros recuerdos. También me gustaría recordar a los estudiantes que han realizado estancias en nuestro grupo, en particular a Ángel Sánchez. Y tras toda esta larga lista de gente me gustaría destacar de manera más especial a Natal Kanaan, con quien tantas vivencias he compartido y a quien quiero agradecer la paciencia y amistad que me ha demostrado durante todo este tiempo. Gracias a todos ellos me he sentido muy afortunada de pertenecer a este grupo de investigación.

Merecen también ser citados la Universitat Jaume I, por haberme concedido una beca predoctoral sin la cual esta tesis doctoral no hubiera podido ser culminada, así como Merche Campos y el Servei d'Informàtica de la universidad, por facilitarnos los trámites y el trabajo.

Tampoco me gustaría dejar pasar la oportunidad de recordar mi estancia en la Université de Montpellier II (Francia) que, aunque no con una contribución directa sobre este trabajo, sí fue una estancia que me aportó muchos valores tanto científicos como personales. Por ello, les agradezco a David Balcells, Odile Eisenstein y Eric Clot la oportunidad que me brindaron al haber hecho posible mi estancia, así como haber sido mis tutores de una u otra forma en el centro.

En este largo trayecto el papel de mis amigos ha sido indiscutible, sus muestras de cariño y palabras de ánimo me han acompañado haciendo el camino mucho más fácil. En este grupo quiero dejar claro que se encuentran incluidas muchas amistades, exactamente todos aquéllos que entienden y comparten mi alegría en este momento. Así que, aunque no voy a nombraros a todos y cada uno, vosotros ya sabéis a quiénes me refiero. Por un lado, la “troupe” morellana, amigos de toda la vida, que

mejor que muchos comprenden mi manera de ser y por tanto lo que esta tesis significa para mí. En este punto no puedo dejar de nombrar a Sonia, Rocío y Patri, con quienes el sentido de amistad cobra un sentido especial. La “colla” de Lleida, que siempre me han hecho sentir una más y han seguido mi trayectoria desde muy cerca, deseando profundamente mi título de doctora. Para finalizar, mencionar a las amigas de la carrera, “el equipo”, ya que sin el apoyo mutuo prestado no habiéramos alcanzado nuestros retos; así como a Edu, por estar ahí siempre.

Por supuesto también me gustaría expresar sobre papel escrito el agradecimiento más profundo y sentido a mi familia, mis padres y mi hermano, por su apoyo más incondicional ya que, aunque estoy convencida de que a veces han pensado que había perdido un poco el norte, nunca han dejado de apoyar las decisiones que tomaba, así como no han dejado de impulsar mi espíritu de superación. Y por último a ti, Sergi, que en todo momento has estado animándome en este y otros proyectos, mostrándome eternamente tu comprensión, ayudándome a superar los momentos bajos y acompañando cada una de mis sonrisas con las tuyas.

Gracias a todos.

Prólogo

La eficacia de algunos medicamentos utilizados para combatir la malaria, como la artemisinina y varios de sus derivados, es incuestionable. Sin embargo, el mecanismo de acción de este tipo de moléculas no se conoce con detalle, y ha sido motivo de debate desde hace tiempo. El conocimiento completo del modo de acción de estos medicamentos constituiría un paso muy importante hacia el diseño de nuevos fármacos, más eficaces y menos tóxicos.

En esta Tesis Doctoral se presenta un estudio teórico completo del mecanismo de descomposición de la artemisinina, catalizada por diferentes agentes reductores. La complejidad del sistema se aumenta de manera progresiva con el fin de mejorar las aproximaciones realizadas, de modo que el modelo utilizado sea más realista.

En el primer capítulo de la tesis se realiza una introducción general en la que se explica la problemática de la malaria y se hace una descripción de la artemisinina y las hipótesis acerca de su modo de acción. El capítulo 2 incluye los objetivos que persigue esta Tesis Doctoral. En el capítulo 3 se detallan los conceptos propios de la Química Teórica y Computacional relacionados con la investigación desarrollada, y se explican los métodos computacionales utilizados. El cuarto capítulo es el más extenso, ya que en él se exponen los resultados obtenidos, junto con la discusión de los mismos. En el primer apartado de este capítulo se estudia la descomposición de dos modelos de la artemisinina activados por el radical hidrógeno. En el segundo apartado se utiliza un compuesto de Fe(II) como agente reductor (el $\text{Fe}(\text{OH})_2$ dihidratado), y se realiza un análisis topológico de la densidad electrónica que permite una mejor descripción del enlace. En el tercer apartado se considera el grupo hemo

como iniciador de la reacción de descomposición de la artemisinina y se realiza el estudio con diferentes ligandos que modifican la coordinación del hierro del grupo hemo. En el último apartado de resultados se amplía el sistema por inclusión de los efectos del medio en la reactividad. En el capítulo 5 se exponen las conclusiones, que se deducen del conjunto de resultados obtenidos. La memoria finaliza con un sexto capítulo donde se explican las perspectivas de futuro en el tema objeto de estudio. Como Anexos se incluye material suplementario, la descripción de los programas de cálculo utilizados, y los artículos publicados hasta la fecha.

Índice

1. Introducción	1
1.1. La malaria: origen y consecuencias	3
1.2. Artemisinina: obtención, propiedades y modo de acción.....	10
Referencias.....	21
2. Objetivos	25
3. Fundamentos teóricos	31
3.1. Superficies de energía potencial.....	35
3.2. Método de Hartree-Fock	40
3.2.1. Sistemas de capa cerrada	46
3.2.2. Sistemas de capa abierta	47
3.2.3. Limitaciones del método de Hartree-Fock.....	50
3.3. Métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT).....	52
3.4. Conjuntos de funciones de base	66
3.5. Reacciones en dos estados electrónicos.....	80
3.5.1. Métodos para evaluar el punto de cruce.....	86
3.6. Análisis topológico de la densidad electrónica	88
3.6.1. Teoría cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM)	90
3.6.2. Función de localización electrónica (ELF).....	96
3.7. Métodos teóricos de representación del solvente.....	99
3.7.1. PCM.....	100
3.7.2. Método QM/MM.....	101
3.7.2.1. Definición de las diferentes regiones	101
3.7.2.2. Distancias de corte	110
Referencias.....	114

4. Resultados y discusión

III

4.1. Estudio de la descomposición de la artemisinina utilizando el radical hidrógeno como agente reductor	118
4.1.1. Reacción de reducción del enlace endoperóxido.....	122
4.1.2. Reacción de formación de 3 α -hidrodeoxi-artemisinina (6).....	134
4.1.3. Reacción de formación de la deoxiartemisinina (8).....	140
4.1.4. Reacción de formación del tetrahidrofurano 12	151
4.1.5. Reacción de formación del O-radical 14.....	155
4.1.5. Reacción de formación del dioxodecanodial 15.....	162
4.1.6. Perfiles globales de reacción	170
Conclusiones	175
4.2. Estudio topológico con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(OH) ₂ dihidratado como agente reductor.....	178
4.2.1. Formación de los C-radicales y estudio de la competitividad entre la artemisinina y el O ₂	182
4.2.2. Análisis topológico de las reacciones de obtención de los C-radicales.....	186
4.2.3. Análisis topológico de las reacciones de obtención de los productos finales	201
4.3. Estudio de la descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(II)-hemo como agente reductor	223
4.3.1. Estados electrónicos de los modelos del grupo hemo	226
4.3.2. Estudio de la reactividad entre la artemisinina y el Fe(II)-hemo	231
4.3.3. Estudio comparativo de la descomposición de la artemisinina utilizando diferentes modelos del grupo hemo	240
Conclusiones	243
4.4. Introducción del solvente en el estudio de la descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(II)-hemo-H ₂ O como agente reductor.....	245
4.4.1. Estudio con el método PCM.....	246
4.4.2. Estudio con el método QM/MM.....	249
Conclusiones	260
Referencias	262

5. General conclusions	267
6. Summary and Outlook	273
6.1. Summary.....	275
6.2. Outlook.....	279
6.2.1. Free energy calculations	279
6.2.2. Studies focused on later stages of artemisinin decomposition..	280
AnexoI. Frecuencias imaginarias	281
AnexoII. Programas utilizados	295
Anexo III. Publicaciones	305



Capítulo 1. Introducción

I didn't finish the stories until we went to the Philippines and I got malaria. I couldn't work and I didn't have any money, but I had seven stories. So I wrote three or four more.

Denis Johnson

Introducción

1.1. La malaria: origen y consecuencias.....	3
1.2. Artemisinina: obtención, propiedades y modo de acción.....	10
Referencias.....	21

1.1. La malaria: origen y consecuencias

La malaria, cuyo término proviene del italiano medieval “mala aria” (mal aire) y conocida también como paludismo (en latín “palus” significa pantano), es una de las enfermedades parasitarias que más comúnmente se da en los seres humanos. Las regiones tropicales y subtropicales son las más afectadas por la enfermedad, aunque ésta amenaza potencialmente a más de 100 países. Solamente en el África sub-Sahariana se dan el 80% de los casos, pero se registran casos incluso en Europa.^[1-3] En total se estima que aproximadamente un 40% de la población mundial habita en áreas endémicas.^[4] Las cifras anuales de mortandad a causa de malaria oscilan entre 1 y 3 millones de personas, y entre 300 y 500 millones de personas contraen la enfermedad cada año.^[5] En la Figura 1.1 se muestra un mapa donde figuran las zonas más afectadas por la malaria.

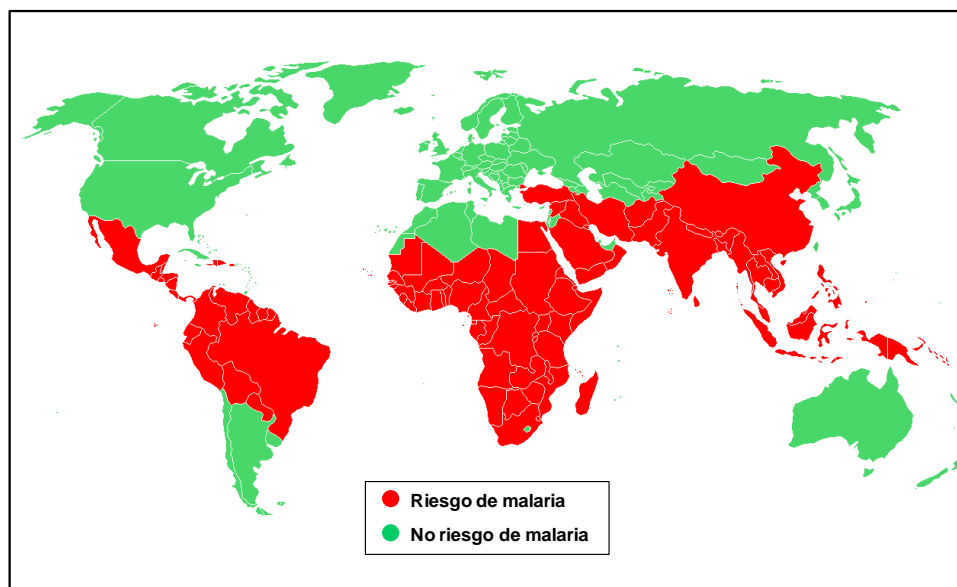


Figura 1.1 – Mapa de las zonas endémicas

La enfermedad está causada un parásito unicelular eucariota del grupo de los protozoos del género *Plasmodium* que con el tiempo ha evolucionado dando lugar a numerosas especies distintas, cuatro de ellas específicas para el ataque al género humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarae* y *Plasmodium ovale*. Existen otras especies del parásito específicas para ser transmitidas a otros mamíferos: *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium berghei* y *Plasmodium yoelii* serían ejemplos de éstas. De entre las especies del parásito específicas de los seres humanos, la *Plasmodium falciparum* es la que provoca infecciones más severas, incluso letales; mientras que el resto son causantes de capítulos intermitentes de fiebre elevada, que provocan un gran malestar al enfermo, pero que no suelen producir la muerte. La infección de un ser humano por este tipo de parásito empieza con la picadura del mosquito *Anopheles* hembra infectado (ver Figura 1.2). Tan sólo las hembras de mosquitos se alimentan de sangre para poder madurar los huevos, mientras que los

machos se alimentan de néctares y jugos vegetales, por lo que no muerden y no pueden transmitir la enfermedad.



Figura 1.2 – Mosquito de la malaria (*Anopheles* hembra) atacando a un ser humano

Cuando un mosquito *Anopheles* hembra infectado pica a otro ser vivo, le absorbe sangre para su propia alimentación, y simultáneamente le transmite el parásito en forma de esporozoitos al nuevo huésped. Los esporozoitos rápidamente acceden al flujo sanguíneo, a través del cual circulan hasta llegar al hígado, donde se multiplican y evolucionan a merozoitos. La fase de infección hepática es asintomática y tiene una duración de seis días aproximadamente. Transcurrido este tiempo, los merozoitos entran en el flujo sanguíneo y penetran en los glóbulos rojos (también llamados eritrocitos), donde degradan la hemoglobina, que es la proteína que transporta el oxígeno, para así disponer de los aminoácidos necesarios para sintetizar sus propias proteínas. Cuando los glóbulos rojos se destruyen, los merozoitos, que se han multiplicado por dieciséis en lo que se denomina etapa asexual, escapan e infectan otros eritrocitos. Algunos de estos merozoitos evolucionan hacia formas sexuales conocidas como gametocitos y pueden ser absorbidos por otro mosquito que pique de nuevo al ser vivo. Si dos merozoitos sexualmente activos se encuentran en el intestino del mosquito forman un cigoto, de modo que producen una nueva generación de parásitos que pueden volver a infectar a otro ser vivo, repitiéndose el proceso tal como se muestra en la Figura 1.3.

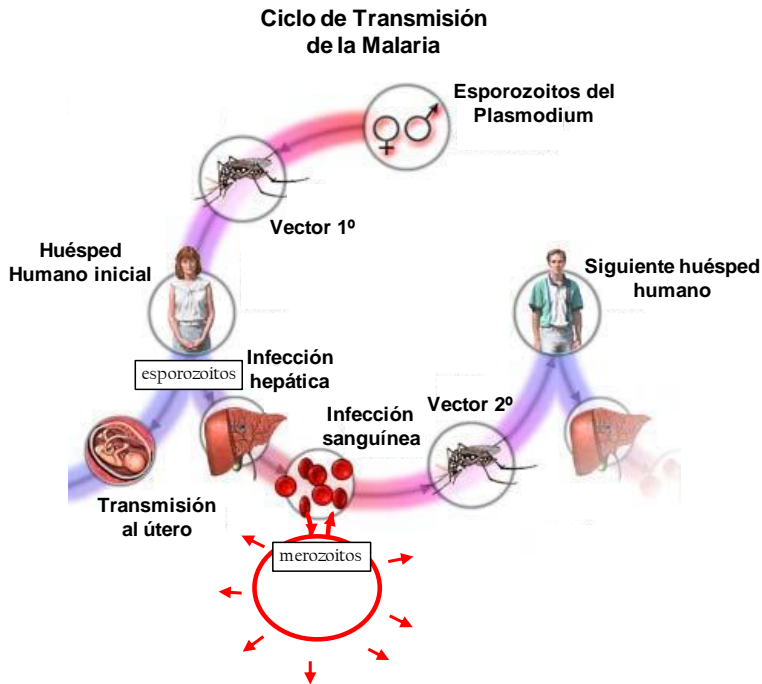


Figura 1.3 – Ciclo de transmisión de la malaria

Las etapas asexuales son patogénicas, es decir, en esas etapas a los individuos afectados se les pueden presentar diversas secuelas que afectan a diferentes órganos. Entre los síntomas del paludismo destacan la fiebre, las cefaleas y los vómitos, que generalmente aparecen de 10 a 15 días después de la picadura del mosquito. Si no se trata, la enfermedad puede dañar órganos vitales y poner en peligro la vida, aunque normalmente puede ser curada con medicamentos antimalaria. En cambio, las etapas sexuales son no-patogénicas pero, tal como se ha dicho anteriormente, son transmisibles al vector *Anopheles* y pueden dar lugar a la formación de nuevos esporozoitos, y de este modo, dar comienzo al ciclo de infección nuevamente. El desarrollo de la especie *Plasmodium falciparum* dentro del mosquito requiere altas temperaturas y un clima húmedo, ese es el motivo de que la malaria severa predomine en

regiones tropicales y subtropicales. En cambio, el desarrollo del *Plasmodium vivax* puede ocurrir a temperaturas menos elevadas, por lo que las infecciones debidas a esta subespecie se suelen dar fuera de éstas zonas.^[6, 7]

El parásito, para sostener su propio desarrollo, tiene que sintetizar sus propias proteínas, y para ello necesita aminoácidos que obtiene fundamentalmente de la digestión de la hemoglobina del huésped. Entre el 60% y 80% de la hemoglobina presente en los glóbulos rojos del huésped es digerida por el *Plasmodium falciparum*.^[8] Este proceso tiene lugar en un orgánulo del parásito llamado vacuola digestiva, y está catalizado por una batería de enzimas proteolíticas.^[9-11] En el proceso de degradación de la hemoglobina, el grupo hemo (libre de la proteína) es liberado en la vacuola digestiva, resultando potencialmente tóxico para el parásito por su capacidad de desestabilizar y romper membranas constituyentes del parásito, así como de inhibir la actividad de algunas de sus enzimas. Por tanto, el parásito necesita un proceso paralelo que elimine el hemo tóxico producido por la digestión de la hemoglobina del huésped.^[12] Se han identificado varios mecanismos mediante los cuales se produce la detoxificación del hemo:

- Degradación del grupo hemo facilitada por el peróxido de hidrógeno presente en la vacuola digestiva del parásito.
- Degradación del grupo hemo dependiente de la glutatona en el citoplasma del parásito.
- Eliminación del grupo hemo mediante la formación de la hemozoína o pigmento de la malaria. Este proceso está catalizado por la proteína *HPR*, (*Histidine-Rich Protein*).

Algunos estudios sugieren que al menos el 95% del hierro procedente de la digestión de la hemoglobina del huésped se encuentra finalmente en la hemozoína, y por tanto parece que el principal mecanismo de detoxificación es la formación del pigmento de la malaria.^[13] En este proceso, el hemo (Fe(II)protoporfirina IX) se oxida a hemin (Fe(III)protoporfirina IX) y posteriormente éste forma un dímero cíclico, denominado β -hematín (ver Figura 1.4), por interacción del Fe(III) de una de las moléculas con el grupo propionato de la otra molécula.

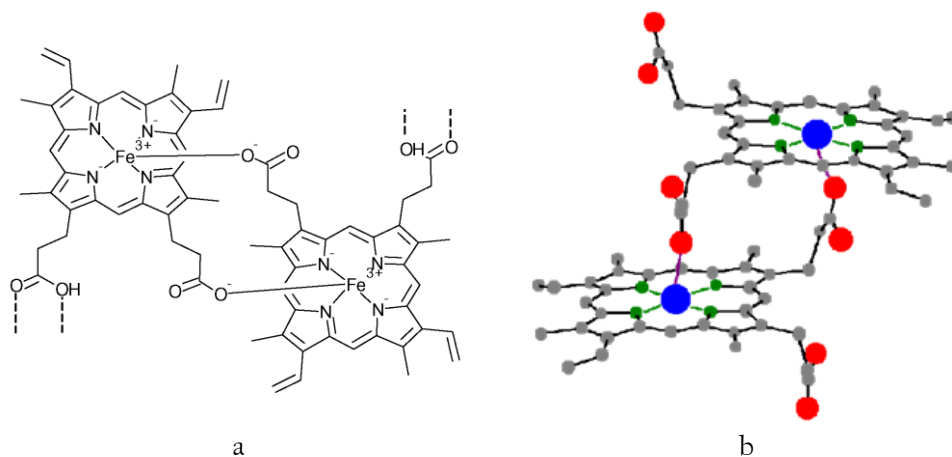


Figura 1.4 – a) Estructura química del dímero β -hematín y b) Modelo 'ball and stick' del mismo

Estos dímeros interactúan con otros dímeros mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos propiónicos ácidos, dando lugar a un material cristalino insoluble, que es la hemozoína o pigmento de la malaria. En la Figura 1.5 se muestra la estructura de la hemozoína.^[14]

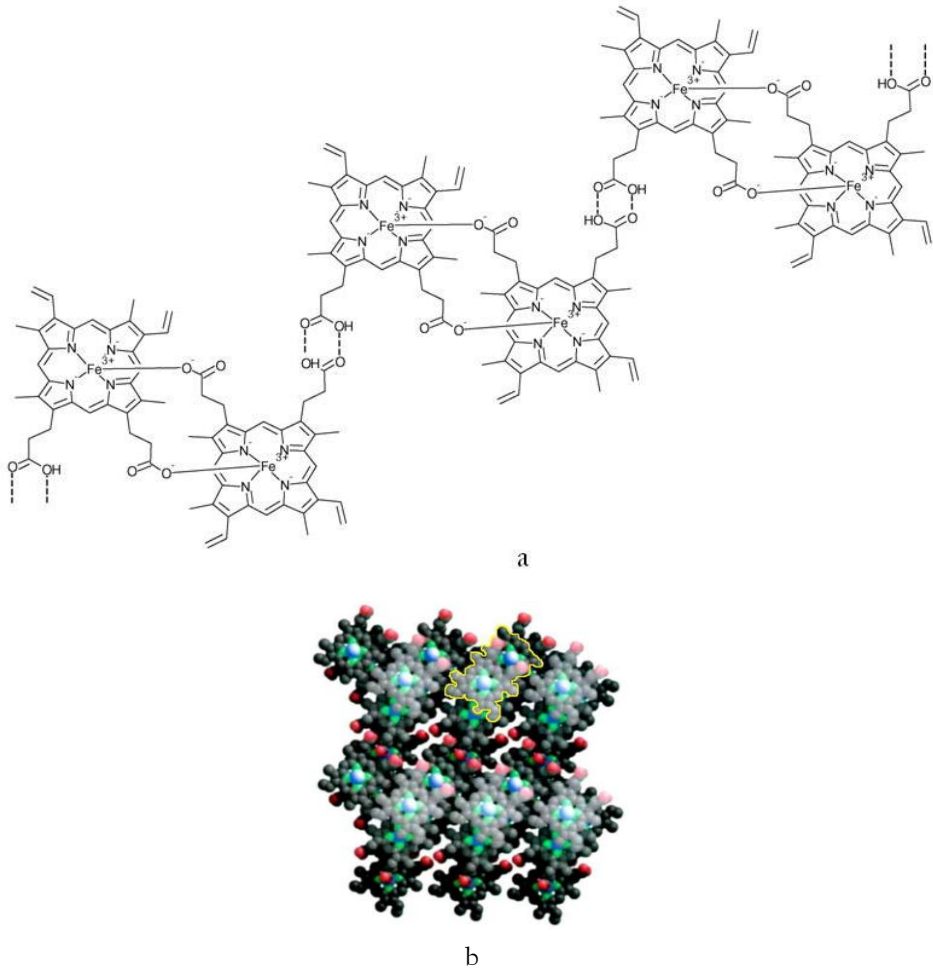


Figura 1.5 – a) Estructura química de la hemozoína y b) Modelo tridimensional de la hemozoína en la que una unidad β -hematín está marcada en amarillo

Cualquier perturbación o interrupción de este proceso de detoxificación del hemo provoca la muerte del parásito debido a la acumulación de residuos redox activos de hemo. En consecuencia, el control de la malaria depende en gran medida de medicamentos que consigan interrumpir el proceso de agregación del hemo. En el siguiente apartado se explican algunos de los procesos que conllevan la interrupción de la formación de la hemozoína, así como otros procesos que impiden los ciclos vitales del parásito de la malaria.

1.2. Artemisinina: obtención, propiedades y modo de acción

Aunque ya en el siglo XVII los indios peruanos usaban quinina para tratar la malaria, no fue hasta el siglo XX cuando se descubrió que esta enfermedad era causada por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*. Se tiene constancia de la existencia de esta enfermedad desde épocas remotas, puesto que en restos fósiles del mosquito se han encontrado signos de malaria.^[15] Después de la segunda Guerra Mundial se redujo el número de infecciones por malaria debido al descubrimiento de insecticidas de bajo coste, como el DDT, y la creación de medicamentos fácilmente disponibles, como la cloroquina y más tarde la mefloquina.^[16] Estas drogas, en un principio, fueron altamente eficaces contra todas las especies de parásitos de la malaria, incluyendo el *Plasmodium falciparum*. Sin embargo, posteriormente el parásito desarrolló resistencia a este tipo de medicamentos por mutaciones genéticas. Ésta apareció en primer lugar en Tailandia y América del Sur en los años 60, pero actualmente está tan extendida que la cloroquina ya no se utiliza en la mayor parte del mundo.^[17, 18] Consecuentemente, se han abierto muchas líneas de investigación para buscar una solución al problema: el desarrollo de medicamentos combinados para superar la resistencia del parásito, el estudio de la secuencia del genoma del *Plasmodium falciparum*, la búsqueda de nuevos medicamentos antimalaria, etc.^[19] En la Guerra de Vietnam, en los años setenta, muchos soldados murieron por carecer de fármacos efectivos contra el parásito. El gobierno chino, respondiendo a la alarma de su país vecino, lanzó un programa para descubrir nuevos medicamentos antimalaria, de modo que fueron examinadas muchas plantas usadas en la medicina tradicional, como la *Artemisia annua*, mostrada en la Figura 1.6, cuyas hojas, o bien su disolución acuosa, habían sido usadas durante más de 2000 años para combatir la fiebre.^[20, 21] Ésta es una hierba aromática anual que crece en varios países, como

China, Yugoslavia, Hungría, Bulgaria, Rumania, Turquía, Argentina, Italia, Francia y España. Esta planta, además de ser de interés en la industria de los perfumes, es la fuente de la artemisinina o *Qinghaosu* (QHS, en chino significa 'planta verde'), cuya estructura química se muestra en la Figura 1.6. Este compuesto es una lactona endoperóxido sesquiterpeno efectivo contra las especies del parásito *Plasmodium* resistentes a otros medicamentos antimalaria. En 1972 un grupo de investigadores chinos realizó la extracción de la artemisinina a partir de la *Artemisia annua* con hexano, y el aceite amarillento que obtuvo fue purificado con sílica gel, de modo que, tras repetidas extracciones, se obtuvo el compuesto cristalino.^[22] En 1979 la estructura de la artemisinina fue definida mediante un análisis con rayos-X.^[23] Posteriormente se han desarrollado otras técnicas de extracción más cuantitativas, como la descrita por Solhy, mediante la cual se realiza la extracción de artemisinina con hexano, seguida de una partición con una fase de CH₃CN.^[24] Vonwiller y colaboradores, también desarrollaron una técnica para extraer ácido artemisínico y artemisinina.^[25] El rendimiento de artemisinina en las hojas secas de la *Artemisia annua* varía entre 0,01 % y 0,5%, insuficiente para satisfacer la demanda creciente del medicamento y la resistencia emergente del parásito de la malaria a otros medicamentos, de modo que se hace indiscutible la necesidad de desarrollar derivados de la artemisinina sintéticos.^[20] La síntesis química de este compuesto es bastante compleja, puesto que su estructura es una de los 64 estereoisómeros posibles. La primera síntesis total de la artemisinina fue realizada por Schmid y Hofheinz en 1983, a partir del (-)-isopulegol.^[26] Posteriormente Ravindranathan y colaboradores también han realizado la síntesis estereoselectiva de la artemisinina a partir del (+)-isolemoneno;^[27] mientras que Avery y sus colaboradores la han realizado partiendo de la (R)-(+)-pulegona.^[28] Como alternativa,

Roth y Acton han sintetizado artemisinina a partir de ácido artemisínico, síntesis cuyo rendimiento es mayor.^[29]

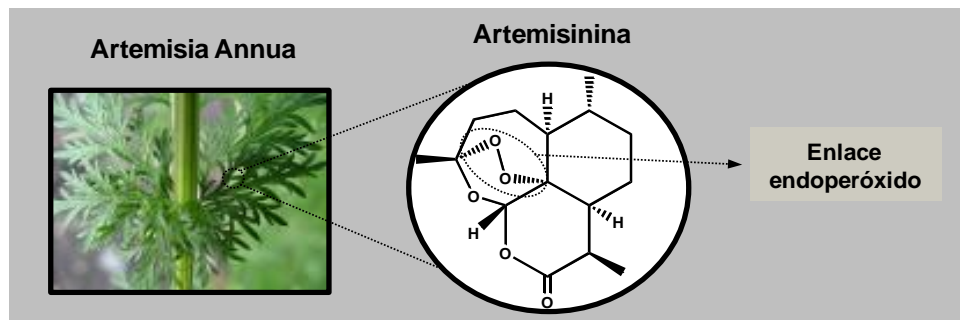


Figura 1.6 – *Artemisia annua* y estructura química de la artemisinina

La artemisinina es uno de los medicamentos más eficaces que actualmente existen para combatir la malaria, y es su peculiar estructura la que le confiere estas propiedades. La artemisinina, mostrada en la Figura 1.6, es una lactona sesquiterpeno (constituída por tres unidades de isopreno) enantioméricamente pura. Contiene un puente endoperóxido esencial para la actividad antimalaria, puesto que la misma molécula con el peróxido reducido (denominada deoxiartemisinina) es inactiva.^[30]

Aunque la artemisinina ha sido usada clínicamente como tratamiento contra el *Plasmodium falciparum*, que es una especie del parásito altamente resistente a un elevado número de medicamentos, su valor terapéutico se ha visto limitado por su baja solubilidad tanto en agua como en aceites, ya que solamente puede administrarse por vía oral. En consecuencia, se han preparado derivados semisintéticos de la artemisinina de primera generación (ver Figura 1.7), como la dihidroartemisinina, producida por reducción de la lactona de la artemisinina con borohidruro de sodio, y utilizada para la síntesis del arteméter y el arteéter, ambos liposolubles.

Estos dos últimos son antimaláricos más potentes que la artemisinina, aunque se ha demostrado que administrados en grandes dosis, son más tóxicos para el sistema nervioso central en perros y ratas. Sin embargo, en seres humanos no se ha demostrado el efecto neurotóxico. El arteéter es la fórmula comercial más utilizada ya que, aunque el arteméter es igual de potente, cuando se metaboliza da lugar a etanol, que presenta menos toxicidad que el metanol. Otros derivados de la artemisinina son el artesunato y artelinato de sodio, más estables en solución acuosa que el arteméter y el arteéter; además son menos tóxicos en perros y ratas. Estos medicamentos están registrados en países como Brasil, China, Tailandia, Vietnam y al menos nueve países africanos, y pueden encontrarse en diferentes formulaciones, como pastillas, cápsulas o supositorios.

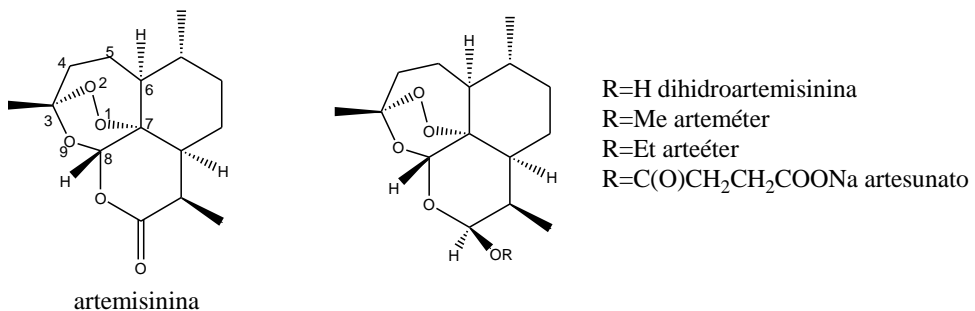


Figura I.7 – Artemisinina y derivados de primera generación

Existe una segunda generación de endoperóxidos que también ejercen actividad antimalárica. Su síntesis es relativamente simple, puesto que todos ellos tienen el anillo de seis miembros que contiene al grupo endoperóxido que se encuentra en la artemisinina, pero el resto de molécula es más sencilla. Ejemplos de ello son el Fenozan 50F, particularmente activo contra el *Plasmodium berghei*; y WR 279137 y WR 279138, efectivos contra el *Plasmodium falciparum* en monos. La efectividad de estos medicamentos es comparable a la de los derivados de la artemisinina. Otro ejemplo es el artefleno, efectivo contra *Plasmodium*

falciparum en seres humanos, pero es menos efectivo que los anteriores.^[31, 32] En la Figura 1.7 se muestran algunos de estos derivados sintéticos de la artemisinina.

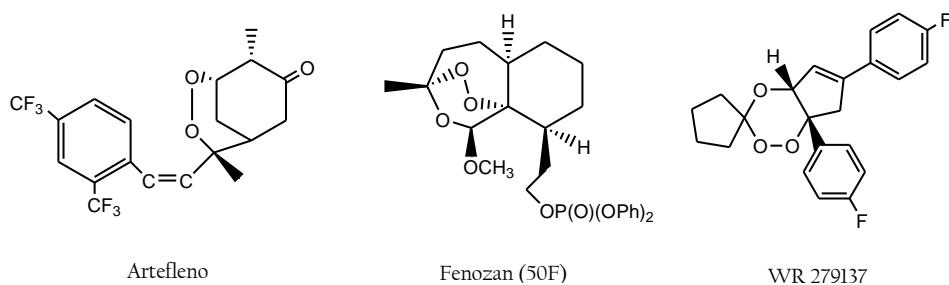


Figura 1.8 – Derivados de la artemisinina de segunda generación

El mecanismo de acción de la artemisinina y sus derivados ha sido motivo de debate en el mundo de la investigación desde hace décadas y su comprensión es uno de los objetivos de la Tesis Doctoral que aquí se presenta. La eficacia de la artemisinina, y de algunos de sus derivados, contra la malaria es incuestionable, de modo que el estudio de los mecanismos de acción de estos fármacos es de vital importancia.

Antes de explicar las bases de la actividad terapéutica de la artemisinina, cabría avanzar que el hierro presente en el cuerpo humano tiene una gran importancia en este mecanismo. En los organismos vivos, el hierro se encuentra entre los metales esenciales, y en los humanos adultos es el más abundante (sobre 4g por persona). Los iones férricos están unidos con gran afinidad y selectividad a transferrinas y ferritinas, las proteínas responsables de su transporte y almacenamiento, respectivamente. El hierro es protagonista en muchas reacciones redox que se producen en la célula y es requerido por enzimas esenciales. El hemo, que contiene hierro, es un grupo prostético de un gran número de proteínas o enzimas, implicadas en procesos como el transporte de oxígeno o de electrones, así

como en el metabolismo de moléculas pequeñas. Entre éstas proteínas se encuentran la hemoglobina, que contiene el 55% del hierro existente en seres humanos, citocromos, peroxidasa, etc. La capacidad del hierro del grupo hemo para aceptar y ceder electrones es una característica clave que, por un lado le permite desarrollar determinadas funciones, pero por otro lado puede dar lugar a metabolitos tóxicos *in vivo*. Sin embargo, todos los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas reguladores sofisticados para mantener la mínima concentración posible de especies reactivas.^[33] En la Figura 1.9 se muestra la estructura química del grupo hemo, que consiste en un átomo de Fe(II) cuya esfera de coordinación es un ligando cuadridentado heterocíclico orgánico con propiedades aromáticas, denominado protoporfirina IX, que se coordina al Fe(II) via cuatro átomos de nitrógeno. Las unidades constituyentes de la protoporfirina IX son cuatro cadenas de pirrol enlazadas a un anillo, es decir, se trata de un tetrapirrol cíclico. El grupo hemo es una estructura plana que tiene propiedades apolares, aunque presenta extremos polares. El átomo de hierro, puesto que es un metal de transición, puede formar hasta seis enlaces. Cuando éste está conformando la hemoglobina, forma cuatro enlaces con los nitrógenos de los pirroles, otro enlace con el nitrógeno de una histidina y un sexto enlace con el oxígeno.

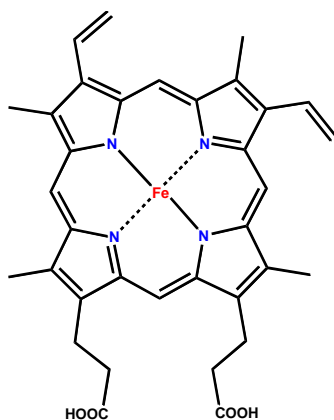


Figura 1.9 – Estructura química del grupo hemo

Se ha postulado que el mecanismo de acción de la artemisinina tiene lugar en dos pasos. El primer paso comprende la formación de radicales centrados en átomos de oxígeno por escisión reductiva del enlace endoperóxido de la artemisinina (o sus derivados), que supuestamente tiene lugar por transferencia electrónica desde el Fe(II) presente en el grupo hemo o en otros compuestos ferrosos. Estos radicales, siguiendo diferentes mecanismos de reacción, generan radicales centrados en átomos de carbono. En el segundo paso, los C-radicales formados ejercen la acción antimalaria por reacción con proteínas específicas del parásito o por alquilación del grupo hemo.^[34, 35] En la Figura 1.10 se muestra un esquema del mecanismo de acción propuesto.

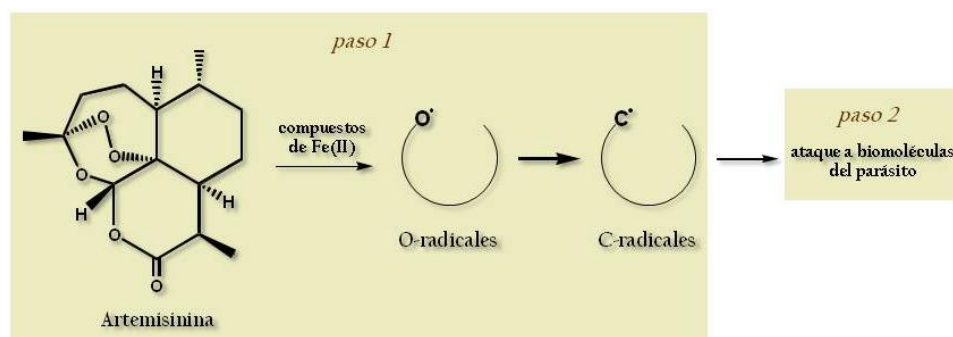


Figura 1.10 – Pasos del mecanismo de acción de la artemisinina

Observaciones como las que se enumeran a continuación apoyan esta propuesta de mecanismo de acción:

a) Análogos de la artemisinina que no contienen el enlace endoperóxido en su estructura química son inactivos contra la malaria, por lo que el grupo endoperóxido parece tener una función indispensable en el mecanismo de reacción.^[30]

b) Algunos radicales libres han sido detectados por resonancia electrónica paramagnética (*EPR*, *Electron Paramagnetic Resonance*) cuando la artemisinina se incubaba en presencia de compuestos de Fe(II).^[36-38] Estudios de marcaje isotópico en membranas de eritrocitos aisladas también sostienen la hipótesis de la formación de estos radicales.^[39]

c) Ha quedado experimentalmente probada la formación (*in vitro*) de algunos productos neutros derivados de las reacciones que tienen lugar tras la formación de los C-radicales.^[40-42]

d) Cuando parásitos de la malaria se incuban en presencia de artemisinina, o sus derivados, marcados isotópicamente (concretamente [¹⁴C]-artemisinina, [³H]-dihidroartemisinina, [³H]-dihidroarteéter y [¹⁴C]-arteфло), la radioactividad se asocia tanto con el hemo como con otras proteínas específicas del parásito.

La detección de aductos hemo-artemisinina^[19, 43-45] indica que el hemo, además de actuar como catalizador del proceso de descomposición de la artemisinina actúa como “*target*” o diana de los fármacos antimalaria. En cuanto a la alquilación de proteínas por parte de los C-radicales derivados de la artemisinina,^[46] se trata de un proceso selectivo ya que, para todos los derivados de la artemisinina, solamente son alquiladas unas pocas proteínas. Una de las proteínas que se alquila en mayor proporción es la *TCTP* (*Translationally Controlled Tumor Protein*), cuyo rol fisiológico es poco conocido, pero cuya alquilación se detecta tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, por lo que debe tratarse de un proceso biológicamente relevante. Otra proteína inhibida selectivamente es la PfATP6, que es una Ca²⁺-ATPasa localizada en el retículo sarcoplásmico del parásito, de manera que el metabolismo del calcio en el parásito se vería afectado y por tanto esta proteína sería otro “*target*”. Las

cisteína proteasas localizadas en la vacuola ácida del *Plasmodium* también se ven inhibidas cuando se exponen a una concentración de artemisinina elevada. Además, se ha observado que algunas hemoproteínas, como la hemoglobina, catalasa y citocromo C, también reaccionan con la artemisinina. En estos casos, la radioactividad se asocia con la parte proteica de la enzima, pero no con el grupo hemo, así que el hemo cataliza la alquilación de la hemoproteína. Cabe destacar que ninguna de estas proteínas del parásito son alquiladas por la deoxiartemisinina, análogo inactivo de la artemisinina y que, en todos los casos, el producto de alquilación tiene lugar por formación de un enlace entre el “*target*” y radicales derivados de la artemisinina centrados en la posición C4.^[47] Debe mencionarse que la formación de aductos hemo-artemisinina no es únicamente un producto de laboratorio, ya que éstos han sido también detectados en ratones infectados, mientras que no se forman en animales no infectados.^[48] El hecho de que la artemisinina tenga diferentes “*targets*” a la hora de interrumpir los procesos biológicos del parásito, hace que el parásito no haya desarrollado mucha resistencia a este tipo de medicamentos, por lo que resulta un factor clave de su eficacia.

Una problemática común a los medicamentos antimalaria es que los parásitos del género *Plasmodium* pueden mutar fácilmente, de modo que desarrollan resistencia a estos fármacos con el paso del tiempo. La cloroquina, muy utilizada en la medicina tradicional contra la malaria, tiene la habilidad de bloquear la digestión de los glóbulos rojos por parte del parásito. Sin embargo, su capacidad bloqueante se ha reducido gradualmente debido a las mutaciones experimentadas por el parásito. Otros antimaláricos, las aminoquinolinas, han perdido su eficacia tras 15 años de administración terapéutica, mientras que la quinina todavía es bastante eficaz en algunas zonas a pesar de que se ha estado utilizando durante más de 350 años. La mefloquina también ha dejado de ser

efectiva en la última década. El fenómeno de resistencia depende del tipo de parásito, algunos tienen mayor capacidad de mutar para volverse resistentes, y también la variable geográfica influye, ya que en cada zona se da más resistencia a un tipo de antimalárico u otro.^[49, 50] El hecho de que el parásito no haya desarrollado prácticamente resistencia a la artemisinina, se debe probablemente a que actúa sobre múltiples “*targets*”, lo que hace que el parásito tenga más dificultades a la hora de crear resistencia que en aquellos casos en que el medicamento ataca a un único “*target*”.^[51] Aún así, para evitar el desarrollo de resistencia, la Organización Mundial de la Salud recomienda no utilizar monoterapias (terapias basadas en la artemisinina o derivados únicamente), sino que aconseja el uso de la artemisinina combinada con otros medicamentos antimalaria, lo que se denomina ACT's (Artemisinin-Combined Therapy)^[52-54]

La eficiencia de un medicamento no implica necesariamente una baja toxicidad, pero en el caso de la artemisinina estas dos premisas se cumplen simultáneamente si se suministra en dosis terapéuticas, y este comportamiento se debe a su mecanismo de acción. Existen diferentes argumentos que explican la toxicidad selectiva de la artemisinina hacia los eritrocitos infectados por el parásito respecto a los que están sanos:

1) Se podría pensar que la descomposición de la artemisinina por reacción con el grupo hemo puede resultar dañina para los glóbulos rojos sanos del huésped, resultando una droga perjudicial. Sin embargo, la hemoglobina en la sangre se encuentra normalmente en forma de oxi-hemoglobina (una molécula de oxígeno se encuentra coordinada al átomo de Fe(II)), cuya reacción con la artemisinina es muy lenta, por lo que no resulta tóxica. Cuando un organismo está infectado por el parásito de la malaria, el grupo prostético de la hemoglobina (en forma de oxi-hemo libre) se introduce en la vacuola digestiva de dicho parásito

donde, debido a las condiciones de pH ácido, sufre la disociación de la molécula de oxígeno. La molécula de hemo resultante, a diferencia de la oxi-hemoglobina, sí reacciona con la artemisinina eficientemente. El hecho de que la activación del grupo hemo se produzca en unas condiciones específicas hace que este tipo de medicamento tenga una toxicidad relativamente baja para el ser humano y al mismo tiempo sea muy potente contra el parásito.^[55]

2) Otro argumento a favor de la baja toxicidad de la artemisinina está basado en la gran tendencia que presentan los radicales derivados de la artemisinina a reaccionar intramolecularmente, de modo que no tienden a dar lugar a reacciones intermoleculares que provocan daños celulares como lo hacen los radicales alquilo simples.^[56]

Para finalizar este capítulo de introducción, cabe comentar que cuando la artemisinina reacciona con el grupo hemo puede presentar otras propiedades como la inducción de muerte celular por apoptosis. Es decir, se presume que los C-radicales formados tras la activación de la artemisinina, provocan la ruptura de células cancerosas humanas, de modo que esta molécula podría formar parte de nuevas terapias contra el cáncer.^[57, 58]


Referencias

- [1] B. Greenwood, T. Mutabingwa, *Nature* 2002, 415, 670.
- [2] M. Ridley, *Nature* 2002, 417, 223.
- [3] J. Sachs, P. Malaney, *Nature* 2002, 415, 680.
- [4] J. G. Breman, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, 64, I.
- [5] D. Chaturvedi, A. Goswami, P. P. Saikia, N. C. Barua, P. G. Rao, *Chemical Society Reviews* 2010, 39, 435.
- [6] B. M. Greenwood, D. A. Fidock, D. E. Kyle, S. H. I. Kappe, P. L. Alonso, F. H. Collins, P. E. Duffy, *Journal of Clinical Investigation* 2008, 118, 1266.
- [7] L. Aravind, L. M. Iyer, T. E. Wellems, L. H. Miller, *Cell* 2003, 115, 771.
- [8] M. Krugliak, J. M. Zhang, H. Ginsburg, *Molecular and Biochemical Parasitology* 2002, 119, 249.
- [9] P. J. Rosenthal, P. S. Sijwali, A. Singh, B. R. Shenai, *Current Pharmaceutical Design* 2002, 8, 1659.
- [10] K. K. Eggleston, K. L. Duffin, D. E. Goldberg, *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274, 32411.
- [11] R. Banerjee, J. Liu, W. Beatty, L. Pelosof, M. Klemba, D. E. Goldberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99, 990.
- [12] H. Atamna, H. Ginsburg, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1993, 61, 231.
- [13] T. J. Egan, J. M. Combrinck, J. Egan, G. R. Hearne, H. M. Marques, S. Ntenti, B. T. Sewell, P. J. Smith, D. Taylor, D. A. van Schalkwyk, J. C. Walden, *Biochemical Journal* 2002, 365, 343.
- [14] S. Pagola, P. W. Stephens, D. S. Bohle, A. D. Kosar, S. K. Madsen, *Nature* 2000, 404, 307.
- [15] A. B. Korolkovas, J.H., *Química Farmacéutica*, Ed. Reverté, Barcelona, 1983.
- [16] S. J. Foote, A. F. Cowman, *Acta Tropica* 1994, 56, 157.
- [17] M. Foley, L. Tilley, *International Journal for Parasitology* 1997, 27, 231.
- [18] C. Wongsrichanalai, A. L. Pickard, W. H. Wernsdorfer, S. R. Meshnick, *Lancet Infectious Diseases* 2002, 2, 209.

- [19] A. Robert, O. Dechy-Cabaret, J. Cazelles, B. Meunier, *Accounts of Chemical Research* 2002, 35, 167.
- [20] D. L. Klayman, *Science* 1985, 228, 1049.
- [21] A. R. Butler, Y. L. Wu, *Chemical Society Reviews* 1992, 21, 85.
- [22] E. VanGeldre, A. Vergauwe, E. VandenEeckhout, *Plant Molecular Biology* 1997, 33, 199.
- [23] A. Q. A. C. R. Group, *Chinese Medical Journal* 1979, 92, 811.
- [24] H. N. Elsohly, E. M. Croom, F. S. Elferaly, M. M. Elsherei, *Journal of Natural Products* 1990, 53, 1560.
- [25] S. C. Vonwiller, R. K. Haynes, G. King, H. J. Wang, *Planta Medica* 1993, 59, 562.
- [26] G. Schmid, W. Hofheinz, *Journal of the American Chemical Society* 1983, 105, 624.
- [27] T. Ravindranathan, M. A. Kumar, R. B. Menon, S. V. Hiremath, *Tetrahedron Letters* 1990, 31, 755.
- [28] M. A. Avery, W. K. M. Chong, C. Jenningswhite, *Journal of the American Chemical Society* 1992, 114, 974.
- [29] N. Acton, R. J. Roth, *Journal of Organic Chemistry* 1992, 57, 3610.
- [30] A. Brossi, B. Venugopalan, L. D. Gerpe, H. J. C. Yeh, J. L. Flippenanderson, P. Buchs, X. D. Luo, W. Milhous, W. Peters, *Journal of Medicinal Chemistry* 1988, 31, 645.
- [31] S. R. Meshnick, T. E. Taylor, S. Kamchonwongpaisan, *Microbiological Reviews* 1996, 60, 301.
- [32] P. M. O'Neill, G. H. Posner, *Journal of Medicinal Chemistry* 2004, 47, 2945.
- [33] A. Robert, F. Benoit-Vical, B. Meunier, *Coordination Chemistry Reviews* 2005, 249, 1927.
- [34] S. R. Meshnick, A. Thomas, A. Ranz, C. M. Xu, H. Z. Pan, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1991, 49, 181.
- [35] P. L. Olliaro, R. K. Haynes, B. Meunier, Y. Yuthavong, *Trends in Parasitology* 2001, 17, 122.
- [36] S. R. Meshnick, Y. Z. Yang, V. Lima, F. Kuypers, S. Kamchonwongpaisan, Y. Yuthavong, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993, 37, 1108.

- [37] W. M. Wu, Z. J. Yao, Y. L. Wu, J. A. Kun, Y. F. Wang, H. B. Chen, F. Shan, Y. Li, *Chemical Communications* 1996, 2213.
- [38] A. R. Butler, B. C. Gilbert, P. Hulme, L. R. Irvine, L. Renton, A. C. Whitwood, *Free Radical Research* 1998, 28, 471.
- [39] N. M. Wei, S. M. H. Sadrzadeh, *Biochemical Pharmacology* 1994, 48, 737.
- [40] G. H. Posner, J. N. Cumming, P. Ploypradith, H. O. Chang, *Journal of the American Chemical Society* 1995, 117, 5885.
- [41] M. A. Avery, P. C. Fan, J. M. Karle, J. D. Bonk, R. Miller, D. K. Goins, *Journal of Medicinal Chemistry* 1996, 39, 1885.
- [42] W. M. Wu, Y. L. Wu, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 2000, 4279.
- [43] Y. L. Hong, Y. Z. Yang, S. R. Meshnick, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1994, 63, 121.
- [44] A. Robert, B. Meunier, *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 5968.
- [45] A. Robert, J. Cazelles, B. Meunier, *Angewandte Chemie-International Edition* 2001, 40, 1954.
- [46] W. Asawamasakda, I. Ittarat, Y. M. Pu, H. Ziffer, S. R. Meshnick, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994, 38, 1854.
- [47] Y. Q. Tang, Y. X. Dong, X. F. Wang, K. Sriraghavan, J. K. Wood, J. L. Vennerstrom, *Journal of Organic Chemistry* 2005, 70, 5103.
- [48] A. Robert, F. Benoit-Vical, C. Claparols, B. Meunier, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 3943.
- [49] F. Nosten, F. Terkuile, T. Chongsuphajaisiddhi, C. Luxemburger, H. K. Webster, M. Edstein, L. Phaipun, K. L. Thew, N. J. White, *Lancet* 1991, 337, 1140.
- [50] P. K. Rathod, T. McErlean, P. C. Lee, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, 94, 9389.
- [51] S. Krishna, C. J. Woodrow, H. M. Staines, R. K. Haynes, O. Mercereau-Puijalon, *Trends in Molecular Medicine* 2006, 12, 200.
- [52] N. J. White, *Drug Resistance Updates* 1998, 1, 3.
- [53] N. White, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 1999, 354, 739.
- [54] N. J. White, *Parassitologia (Rome)* 1999, 41, 301.

-
- [55] S. M. Zhang, G. S. Gerhard, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008, 16, 7853.
- [56] Y. K. Wu, H. H. Liu, *Chemical Research in Toxicology* 2003, 16, 1202.
- [57] A. E. Mercer, J. L. Maggs, X. M. Sun, G. M. Cohen, J. Chadwick, P. M. O'Neill, B. K. Park, *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282, 9372.
- [58] W. Nam, J. Tak, J. K. Ryu, M. Jung, J. I. Yook, H. J. Kim, I. H. Cha, *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 2007, 29, 335.



Capítulo 2. Objetivos

*El mayor de los peligros para la mayoría de nosotros,
no es que nuestro objetivo sea demasiado alto y no lo
alcancemos, sino que sea demasiado bajo y lo logremos.*
Michelangelo

A grandes rasgos, el objetivo principal de la Tesis Doctoral que aquí se presenta es el estudio de un sistema biológico de gran complejidad: la acción de una familia de medicamentos (la artemisinina y sus derivados) contra la malaria. Este estudio, llevado a cabo en el ámbito de la Química Teórica y Computacional, resulta de gran interés, ya que permite descifrar muchos aspectos del mecanismo de reacción de estos medicamentos que, hasta el día de hoy, no se conocían o presentaban controversia. El punto de vista teórico desde el cual se lleva a cabo el estudio queda justificado por la dificultad de analizar estos mecanismos de reacción desde un punto de vista experimental, ya que se trata en gran medida de reacciones homolíticas, en las que participan especies radicalarias, cuyas características son tiempos de vida muy bajos y gran inestabilidad. Las características del sistema objeto de estudio han condicionado las metodologías y modelos químicos utilizados, de modo que el grado de complejidad de éstos ha aumentado de manera progresiva con el avance de la investigación, cosa que ha comportado el aprendizaje de nuevas técnicas y la familiarización con nuevos programas de cálculo.

De manera más precisa, los objetivos planteados se pueden sintetizar en los siguientes apartados:

✓ Validar un modelo molecular sencillo representativo de la reactividad de la artemisinina, de manera que se faciliten estudios posteriores relacionados con dicha especie química.

✓ Estudiar diferentes mecanismos para la reacción de descomposición de la artemisinina. Éstos han sido propuestos a partir de diferentes estudios experimentales. Así, se pretende dar explicación al mecanismo de acción antimalaria de la artemisinina. En este sentido, se ha empezado por el estudio del sistema en vacío utilizando metodologías sencillas y, paulatinamente se ha aumentado el grado de complejidad del sistema hasta la introducción del solvente con metodologías discretas.

Más concretamente, este objetivo conlleva el análisis de las superficies de energía potencial para todas las reacciones estudiadas. A partir de las energías de las configuraciones nucleares estables para un sistema molecular, así como de las estructuras de transición que las conectan, se realiza un análisis cinético y termodinámico de los mecanismos, de manera que se obtienen y estudian los posibles caminos de reacción. Así, se persigue establecer el camino de reacción más favorable entre los diversos caminos estudiados. También se pretende catalogar las especies más estables para determinar cuáles son las responsables directas del proceso antimalaria.

✓ Caracterizar todos los puntos estacionarios de la superficie de energía potencial: mínimos y estructuras de transición. Así, se pretende establecer las relaciones entre geometría y reactividad.

✓ Localizar los posibles puntos de cruce entre superficies de energía potencial en las reacciones que transcurren a través de dos estados electrónicos diferentes.

✓ Realizar un análisis topológico de la densidad electrónica mediante las metodologías ELF y AIM. La primera de ellas permite la clasificación de todos los tipos de pares electrónicos, así como una cuantificación de la densidad electrónica; y la segunda permite el estudio de las propiedades de los átomos dentro de la entidad molecular o los enlaces entre éstos.

✓ Puesto que los estudios realizados para alcanzar los citados objetivos han sido realizados con diferentes métodos de cálculo y con modelos moleculares que, a medida que se avanza en el estudio, se asemejan progresivamente más al sistema real; se pretende realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos con los diferentes modelos y métodos de cálculo empleados. Con ello se pretende establecer aquellas metodologías más adecuadas para tratar estos tipos de sistemas, así como demostrar la validez de los diferentes modelos moleculares empleados. Tras las sucesivas ampliaciones del sistema molecular estudiado, se plantea el estudio de los diferentes mecanismos de reacción en fase condensada, utilizando tanto métodos continuos como discretos para llevarlo a cabo.

✓ Analizar en qué punto del proceso de detoxificación del hemo actúa la artemisinina, así como estudiar la competitividad entre la artemisinina y el oxígeno molecular a la hora de reaccionar con el átomo de hierro de la hemoglobina.

✓ Explorar la especie o las especies a las cuales se puede atribuir el efecto antimalaria.



Capítulo 3. Fundamentos Teóricos

A theory is something nobody believes, except the person who made it. An experiment is something everybody believes, except the person who made it.
Albert Einstein

Fundamentos teóricos

3.1. Superficies de energía potencial.....	35
3.2. Método de Hartree-Fock.....	40
3.2.1. Sistemas de capa cerrada.....	46
3.2.2. Sistemas de capa abierta.....	47
Método Hartree-Fock no restringido (Unrestricted Hartree-Fock, UHF).....	47
3.2.3. Limitaciones del método de Hartree-Fock.....	50
3.3. Métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT)...	52
3.4. Conjuntos de funciones de base.....	66
3.5. Reacciones en dos estados electrónicos.....	72
3.5.1. Métodos para evaluar el punto de cruce.....	78
3.6. Análisis topológico de la densidad electrónica.....	80
3.6.1. Teoría cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM).....	82
3.6.2. Función de localización electrónica (ELF).....	88
3.7. Métodos teóricos de representación del solvente.....	91
3.7.1. PCM.....	92
3.7.2. Método QM/MM.....	93
3.7.2.1. Definición de las diferentes regiones.....	93
3.7.2.2. Distancias de corte.....	102
Referencias.....	106

Desde mediados del siglo XX, la química computacional ha estado presente y en un estado de continua evolución. En un principio, las técnicas de química computacional existentes eran utilizadas únicamente por especialistas, ya que exigían un elevado nivel de comprensión y aplicación. Actualmente, los avances en software han permitido la creación de programas fácilmente utilizables por cualquier químico.

Conviene diferenciar ciertos términos que a veces son usados indistintamente, como por ejemplo química teórica y química computacional. El término química teórica se refiere a la descripción matemática de la química. Dentro de esta disciplina, los químicos y los físicos desarrollan algoritmos y teorías que permiten el estudio teórico de los diversos aspectos de la estructura y reactividad de los compuestos químicos. En cambio, el término química computacional es generalmente utilizado cuando un método matemático está suficientemente desarrollado para ser implementado en un ordenador. Es decir, los químicos computacionales desarrollan y utilizan programas informáticos para aplicarlos a problemas químicos específicos, utilizando las

metodologías existentes. Un químico computacional debe conocer las aproximaciones que utiliza y el grado de precisión que se espera de las mismas. Las teorías, modelos y aproximaciones son poderosas herramientas para comprender y solucionar problemas de interés químico reales, aunque estas herramientas no sean del todo perfectas.

Los estudios computacionales pueden ser llevados a cabo con distintas finalidades. Por ejemplo, con el fin de encontrar un punto de partida para la síntesis en laboratorio, para obtener las propiedades de un compuesto, para explorar mecanismos de reacción y explicar observaciones en reacciones ya llevadas a cabo en el laboratorio, etc.

Hoy en día, la química computacional proporciona una alternativa para conocer datos que en un laboratorio convencional serían imposibles o muy complicados de medir. Incluso se especula que no está lejos el día en que se obtenga un laboratorio “seco”, dotado únicamente de ordenadores. En consecuencia, todo químico del siglo XXI debería conocer los aspectos computacionales de la química.

En este capítulo se detallan todos aquellos conceptos de la Química Teórica y Computacional necesarios para entender el trabajo de investigación llevado a cabo en esta Tesis Doctoral.

3.1. Superficies de energía potencial

El concepto de superficie de energía potencial (SEP) deriva de la aproximación de Born-Oppenheimer,^[1] en la cual se asume que los movimientos de los núcleos y los electrones están desacoplados debido a la gran diferencia de masa entre ambos tipos de partículas. De este modo, en una primera etapa, se considera el movimiento de los electrones alrededor de los núcleos para una determinada posición de éstos, es decir, se obtiene la ecuación de Schrödinger electrónica para cada configuración nuclear fija $U_i(\mathbf{R})$. En una segunda etapa, se procede al estudio del movimiento nuclear, a la resolución de la ecuación nuclear que, de hecho, constituye la ecuación de Schrödinger completa, puesto que incluye la descripción electrónica previamente calculada.

Esta aproximación permite expresar la función de onda total como producto de la función electrónica y la función nuclear:

$$\Psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = \Psi^n(\mathbf{R}) \Psi^e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \quad (3.1.1)$$

donde \mathbf{r} y \mathbf{R} representan las coordenadas de todos los electrones y núcleos, respectivamente.

Como se observa, la función de onda electrónica depende de las coordenadas electrónicas y también de las nucleares.

La ecuación de Schrödinger electrónica independiente del tiempo vendría dada por la siguiente expresión:

$$\hat{H}_e(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \Psi_i^e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = E_i(\mathbf{R}) \Psi_i^e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \quad (3.1.2)$$

La resolución de esta ecuación requiere la aplicación de métodos aproximados, como el teorema variacional o la teoría de perturbaciones.

Se obtiene una superficie de energía potencial por resolución de la ecuación electrónica para cada una de las configuraciones nucleares posibles. Dicha energía consta de dos términos, la repulsión electrostática entre los núcleos (V_R) y el efecto atrayente de los electrones que se mueven en torno a los núcleos ($E_i(R)$), que es el valor propio del hamiltoniano electrónico.

$$U(R) = V_R + E_i(R) \quad (3.1.3)$$

El interés de las SEP radica en que, además de constituir un paso previo a la resolución de la ecuación de Schrödinger nuclear, contienen una gran cantidad de información sobre la estructura molecular, ya que representan la energía potencial para cada configuración nuclear, y por tanto, variando las posiciones nucleares se puede describir una reacción química, es decir, se puede ir desde la geometría de los reactivos hasta la de los productos.

El principal problema para obtener una SEP es que un sistema de N átomos requiere $3N$ dimensiones si se define en coordenadas cartesianas o, en caso de definirse en coordenadas internas, puesto que se eliminan las traslaciones y rotaciones, su dimensión sería $3N-6$ en general, o $3N-5$ para un sistema molecular lineal. La representación de la energía frente a este elevado número de coordenadas es imposible de visualizar. Además, para obtener la hipersuperficie completa se precisaría un número de cálculos electrónicos muy elevado.

Este problema se resuelve diseñando estrategias que permitan evitar el cálculo completo, limitándose a analizar las zonas de interés químico. En el caso de sistemas diatómicos la obtención de la hipersuperficie de potencial completa es factible, ya que es necesaria una sola coordenada interna para definir el sistema, la distancia interatómica, con lo cual la SEP se reduce a una curva. Pero en casos de más de dos átomos, es

necesario restringir el sistema a dos coordenadas internas. Así pues, se eligen aquellas dos coordenadas que caracterizan bien el avance de la reacción, y son éstas las que se representan frente a la energía. En estos casos, el resto de coordenadas no representadas son aquéllas que hacen que el sistema sea lo más estable posible, es decir, que tenga la mínima energía.

En estas hipersuperficies existen dos tipos de puntos especialmente relevantes y, aunque el perfil de la SEP depende de las coordenadas elegidas, estos dos tipos de puntos son independientes de esta elección. El primer tipo corresponde a pozos de energía potencial, es decir, *mínimos de superficie*. Si el sistema se halla en uno de estos puntos, se encontrará en una posición de equilibrio, y solamente podrá salir de este mínimo si se le suministra suficiente energía. En una SEP puede haber más de un mínimo local, y cada uno de ellos corresponde a una estructura en equilibrio. Diferentes conformaciones de una molécula, distintos isómeros estructurales o reactivos, intermedios y productos de una reacción química ocupan estos puntos de mínima energía. En una SEP los mínimos están separados por zonas de mayor energía, que corresponden a los máximos locales. En general, los máximos locales no tienen interés químico. Sin embargo es posible encontrar un camino de mínima energía entre dos mínimos locales, que evite pasar por los máximos locales. Este punto es un mínimo en todas las direcciones, excepto en la dirección del camino de reacción, y se denomina *punto de silla*, correspondiente a un estado de transición. Los puntos de silla son, junto a los mínimos, los puntos de mayor relevancia en una SEP. En la Figura 3.1.1 se muestran los distintos tipos de puntos estacionarios.

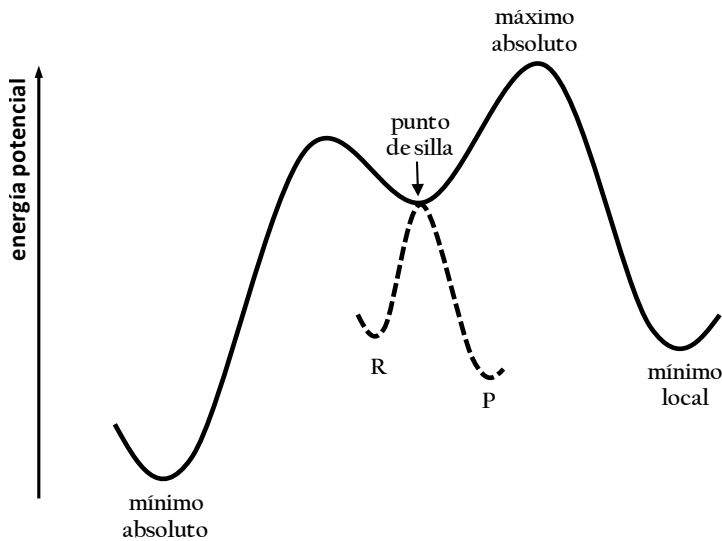


Figura 3.1.1 – Tipos de puntos estacionarios en una SEP

Para realizar el estudio de las SEP es necesario conocer algunas definiciones matemáticas provenientes del análisis topológico de superficies:

· *Gradiente de energía potencial (g)*: vector o matriz columna que tiene por elementos g_i las derivadas de la energía potencial respecto a cada coordenada:

$$g_i = \frac{\partial U}{\partial q_i} \quad (3.1.4)$$

donde q_i indica una coordenada genérica.

· *Hessiano o matriz de derivadas segundas (H)*: matriz constituida por las derivadas segundas de la energía respecto a dos coordenadas. Sus elementos vienen dados por:

$$H_{ij} = \frac{\partial^2 U}{\partial q_i \partial q_j} \quad (3.1.5)$$

· *Punto estacionario sobre la hipersuperficie de potencial*: punto tal que las derivadas primeras de la energía respecto a las coordenadas son todas nulas. Es decir, un punto estacionario es aquel que tiene gradiente nulo. Las definiciones matemáticas de estos puntos son:

-*Mínimos*: son puntos estacionarios tales que al diagonalizar la matriz de derivadas segundas de la energía se obtienen todos los valores propios positivos.

-*Puntos de silla*: en estos puntos la diagonalización de la matriz de derivadas segundas de la energía da lugar a un solo valor propio negativo. A veces se usa el nombre de punto de silla de primer orden para referirse a estos puntos. Según esta nomenclatura, un punto de silla de orden dos tendría dos valores propios negativos y el resto positivos. Genéricamente se definirían puntos de silla de orden n . Desde el punto de vista de interés químico real, solamente son relevantes los puntos de silla de orden uno.

Si sólo se pretende un estudio de las configuraciones nucleares estables de un sistema molecular, es suficiente con hallar los mínimos de la SEP. Si además se quiere realizar un estudio cinético sencillo usando la teoría del estado de transición, se deben localizar también los puntos de silla para conocer el estado de transición de la reacción a estudiar. Por último, para la realización de un estudio dinámico de la reacción, esto es, analizar el movimiento de los núcleos a lo largo de una reacción química, se deberán obtener y estudiar los posibles caminos de reacción.^[2-6]

3.2. Método de Hartree-Fock

La resolución de la ecuación de Schrödinger para sistemas polielectrónicos no es factible, por lo que requiere la realización de aproximaciones. La mayoría de los tratamientos teóricos en Química Computacional se basan en la teoría *ab initio* de orbitales moleculares. El término *ab initio* proviene del latín y significa ‘desde el principio’, lo que significa que este tipo de cálculos deriva directamente de principios teóricos, sin incluir datos experimentales. Existen diversos tipos de métodos *ab initio*, pero el de Hartree-Fock (HF) merece especial atención, puesto que constituye la base de otros métodos más sofisticados y exactos.

Para un sistema de N electrones, la función de onda viene dada por un único determinante de Slater normalizado, donde cada electrón contribuye con una integral monoeléctronica:

$$\Psi(1,2,\dots,N) = \frac{1}{\sqrt{2^N}} | \chi_1 1(1) \chi_2 2(2) \dots \chi_N N(N) | \quad (3.2.1)$$

Una función de este tipo describirá mejor o peor un estado N-electrónico determinado, según el conjunto de espín-orbitales elegido. El método de Hartree-Fock proporciona una vía sistemática para determinar los N espín-orbitales que mejor describen la función de onda exacta para el sistema.

Dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer, el hamiltoniano electrónico de una molécula con N electrones y M núcleos viene dado por:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N \hat{h}(i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.2.2)$$

donde

$$\hat{h}(i) = -\frac{1}{2} \nabla^2(i) - \sum_{\alpha=1}^M \frac{Z_{\alpha}}{r_{\alpha i}} \quad (3.2.3)$$

es el hamiltoniano monoeléctrico correspondiente al electrón i , que contiene la energía cinética del electrón y la energía potencial de atracción por parte de todos los núcleos de la molécula. Este hamiltoniano recibe el nombre de *hamiltoniano de core*. El segundo término del hamiltoniano electrónico corresponde a la repulsión interelectrónica.

El término de energía potencial de repulsión internuclear ha sido omitido, puesto que, debido a la aproximación de Born-Oppenheimer, corresponde a una constante que se debe añadir a la energía electrónica al final del cálculo para obtener la energía total del sistema. Su expresión es la siguiente:

$$V_{nm}^{\wedge} = \sum_{\alpha=1}^M \sum_{\beta \neq \alpha}^M \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta}}{r_{\alpha\beta}} \quad (3.2.4)$$

El valor esperado de la energía viene dado por:

$$E = \langle H | \Psi | H \rangle = \sum_{i=1}^N h_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.5)$$

El primer miembro es el sumatorio de los hamiltonianos de cada electrón del sistema, representa la energía de cada electrón sin considerar su interacción con el resto de electrones. El segundo miembro representa la energía de repulsión media entre un electrón cualquiera del sistema y el resto. El primer término de este segundo miembro se conoce como integral de Coulomb (J_{ij}), ya que representa la repulsión coulombiana entre pares de electrones; mientras que el segundo término es la integral de intercambio (K_{ij}), éste no tiene una interpretación clásica como la

integral de Coulomb, y aparece como consecuencia de la antisimetría de la función de prueba usada.

Tras una serie de deducciones se llega a las *ecuaciones de Hartree-Fock*:

$$\hat{f}(1)\chi_i(1) = \sum_{j=1}^N \varepsilon_{ij}\chi_j(1) \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (3.2.6)$$

En principio, para resolver la ecuación para el electrón 1 se necesita saber con antelación las soluciones para los (n-1) electrones restantes. Esto se soluciona resolviendo las ecuaciones iterativamente, de forma que, partiendo de una solución de orden cero, se calculan los operadores de Fock, obteniendo así un conjunto de espín-orbitales mejorados con los cuales se repite el proceso el número de veces necesario hasta que las soluciones no cambian significativamente. Entonces se dice que se ha alcanzado la autoconsistencia y que se han obtenido unos espín-orbitales que son consistentes con el potencial creado por ellos mismos. De ahí que el método de Hartree-Fock sea un método de campo autoconsistente o SCF (*Self Consistent Field*).

Una vez obtenidos los mejores espín-orbitales posibles, se ordenan por orden creciente de energía y se ubican los electrones de la molécula para calcular las magnitudes energéticas de interés. Los espín-orbitales no ocupados son los llamados orbitales virtuales.

A cada espín-orbital, χ_i , se le puede asociar una energía ε_i . El significado de esta energía se puede ver partiendo de la ecuación de Hartree-Fock correspondiente al espín-orbital χ_i :

$$\hat{f}(1)\chi_i(1) = \varepsilon_i\chi_i(1) \quad (3.2.7)$$

Multiplicando por la izquierda los dos miembros de esta ecuación por $\chi_i^*(\mathbf{1})$, integrando a todo el espacio electrónico y teniendo en cuenta que el espín-orbital χ_i está normalizado, se obtiene:

$$\varepsilon_i = \left\langle \chi_i(\mathbf{1}) \left| \hat{f}(\mathbf{1}) \right| \chi_i(\mathbf{1}) \right\rangle \quad (3.2.8)$$

A partir de la definición del operador de Fock, esta expresión se transforma en:

$$\varepsilon_i = h_{ii} + \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.9)$$

Así pues, para el electrón descrito por el orbital χ_i , ε_i incluye su energía cinética, la energía potencial de atracción por parte de todos los núcleos y la energía de repulsión media con el resto de electrones. Dentro del sumatorio que aparece en esta ecuación se incluye el término correspondiente al propio espín-orbital χ_i , pero este término de autorepulsión se cancela, dado que $K_{ii} = J_{ii}$.

De este planteamiento se deduce que la expresión de la energía electrónica también puede expresarse como:

$$E = \sum_{i=1}^N \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.10)$$

Obsérvese que la suma de las energías de los orbitales no equivale a la energía electrónica porque se estaría contando la repulsión entre cada par de electrones dos veces.

El método de Hartree-Fock implica la resolución iterativa de un sistema de ecuaciones integro-diferenciales, lo cual implica gran dificultad práctica, por lo que para que el método sea aplicable a sistemas no muy pequeños, Roothan y Hall, independientemente, en 1951, introdujeron una nueva aproximación. Ésta consiste en expresar los orbitales moleculares como combinación lineal de un conjunto de funciones de base. Estas funciones suelen estar centradas en los átomos de la molécula y suelen denominarse orbitales atómicos.

De este modo, el orbital molecular ψ_i se puede expresar como combinación lineal de un conjunto de K funciones de base $\{\phi_\nu\}$

$$\psi_i = \sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \phi_\nu \quad (3.2.11)$$

Sustituyendo (3.2.11) en la ecuación de Hartree-Fock correspondiente al espín-orbital χ_i (3.2.7), y teniendo en cuenta que \hat{f} es un operador lineal se obtiene:

$$\sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \hat{f}(1)\phi_\nu(1) = \sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \varepsilon_i \phi_\nu(1) \quad (3.2.12)$$

Multiplicando a ambos miembros de esta ecuación por ϕ_μ^* e integrando en todo el espacio de coordenadas electrónicas, se obtiene:

$$\sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \langle \phi_\mu(1) | \hat{f}(1) | \phi_\nu(1) \rangle = \sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \varepsilon_i \langle \phi_\mu(1) | \phi_\nu(1) \rangle \quad (3.2.13)$$

$$\sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \int \phi_\mu^*(1) \hat{f}(1) \phi_\nu(1) d\tau_1 = \sum_{\nu=1}^K c_{\nu i} \varepsilon_i \int \phi_\mu^*(1) \phi_\nu(1) d\tau_1 \quad \mu = 1, 2, \dots, K \quad (3.2.14)$$

Así pues, la ecuación (3.2.14) puede escribirse como el siguiente sistema de ecuaciones algebraicas, conocidas como *ecuaciones de Roothaan-Hall*.

$$\sum_{\nu=1}^K [F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}] c_{\nu i} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, K \quad (3.2.15)$$

Teniendo en cuenta la definición de producto de matrices, estas ecuaciones pueden escribirse de manera más compacta como

$$FC = SCE \quad (3.2.16)$$

donde S es la matriz de solapamiento, que tiene como elementos las integrales $\langle \phi_{\mu}(1) | \phi_{\nu}(1) \rangle$, E es una matriz diagonal cuyos elementos son las energías de los orbitales ε_i , C es la matriz que tiene por columnas los coeficientes $c_{\nu i}$ que definen los orbitales moleculares, y F es la matriz que tiene como elementos las integrales $\langle \phi_{\mu}(1) | \hat{f}(1) | \phi_{\nu}(1) \rangle$.

Para resolver la ecuación matricial (3.2.16) es conveniente realizar una transformación de las funciones atómicas de base de manera que éstas sean ortonormales y la matriz S sea la matriz unidad. Una vez ortogonalizadas las funciones de base, las ecuaciones de Roothaan-Hall se convierten en

$$F'C = C'E \quad (3.2.17)$$

Dado que los coeficientes que definen los orbitales moleculares también aparecen en los elementos de la matriz F , la resolución de las ecuaciones de Roothaan-Hall debe realizarse de manera iterativa.

3.2.1. Sistemas de capa cerrada

En el caso de sistemas de capa cerrada se suele usar un mismo orbital molecular para describir dos electrones con funciones de espín distintas. Esto da lugar a lo que se conoce como el método de Hartree-Fock restringido o RHF (*Restricted-Hartree-Fock*).

Para un sistema de $2N$ electrones en N orbitales moleculares, el determinante de Slater correspondiente es:

$$\Psi(1,2,\dots,2N) = |\psi_1(1)\bar{\psi}_1(2)\psi_2(3)\bar{\psi}_2(4)\dots\psi_N(2N-1)\bar{\psi}_N(2N)| \quad (3.2.18)$$

Y la energía electrónica pasa a ser:

$$E = 2 \sum_{i=1}^N h_{ii} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.2.19)$$

A diferencia de la expresión obtenida a partir de espín-orbitales, en esta expresión de la energía, cada término monoeléctrico aparece dos veces, ya que cada orbital molecular está ocupado por dos electrones. Además, cada integral de Coulomb J_{ij} aparece multiplicada por dos, mientras que esto no ocurre para las integrales de intercambio. Esto se debe a que entre dos orbitales doblemente ocupados, el número de interacciones que implican electrones del mismo espín es la mitad del número de interacciones entre pares de electrones.

Así, el operador de Hartree-Fock se convierte en

$$\hat{f}(1) = \hat{h}(1) + \sum_{j=1}^N (2J_j(1) - K_j(1)) \quad (3.2.20)$$

Donde los operadores de Coulomb y de intercambio se expresan en función de orbitales moleculares:

$$\hat{J}_j(1)\psi_i(1) = \left(\int \psi_j^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_j(2) d\vec{r}_2 \right) \psi_i(1) \quad (3.2.21)$$

$$\hat{K}_j(1)\psi_i(1) = \left(\int \psi_j^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(2) d\vec{r}_2 \right) \psi_j(1) \quad (3.2.22)$$

Finalmente, las ecuaciones de Hartree-Fock se convierten en:

$$\hat{f}(1)\psi_i(1) = \varepsilon_i \psi_i \quad (3.2.23)$$

3.2.2. Sistemas de capa abierta

Cuando un sistema tiene electrones desapareados, no es válido utilizar el método RHF. En estos casos se puede recurrir a dos tratamientos distintos.

▪ Método Hartree-Fock no restringido (Unrestricted Hartree-Fock, UHF)

Este método utiliza dos conjuntos de orbitales diferentes, uno para los electrones alfa y otro para los beta. Estos dos conjuntos se definen con el mismo conjunto de funciones de base, pero con distintos coeficientes.

Así, por ejemplo, para el caso de un sistema de seis electrones, una de las componentes del primer triplete se describiría mediante el determinante de Slater

$$\Psi_{UHF} = \left| \Psi_1^\alpha(1) \Psi_1^\beta(2) \Psi_2^\alpha(3) \Psi_2^\beta(4) \Psi_3^\alpha(5) \Psi_4^\alpha(6) \right| \quad (3.2.24)$$

En la Figura 3.2.1.a se presenta de manera esquemática el diagrama de orbitales moleculares correspondiente a este sistema de seis electrones.

La ventaja del método es que el cálculo se lleva a cabo con eficiencia. Sin embargo, el hecho de que los orbitales alfa y beta sean ligeramente diferentes, provoca un efecto llamado polarización de espín. La desventaja resultante de este efecto es que la función de onda no es función propia del espín total $\langle S^2 \rangle$, y no describe estados de espín puros, por lo que se está añadiendo un error en el cálculo, llamado contaminación de espín, que equivale a que se considera una polarización excesiva.

Una elevada contaminación de espín puede afectar a la geometría del sistema, así como al análisis de población y, más significativamente a la densidad de espín. Los estados de transición y los compuestos con metales de transición de alto espín son bastante susceptibles a este tipo de error.

Los cálculos no restringidos a menudo incorporan un paso de aniquilación de espín que elimina gran parte de la contaminación de espín de la función de onda. El valor $\langle S^2 \rangle$ da una buena idea del grado de contaminación de espín. Así, no hay contaminación cuando este es igual a $s(s+1)$, donde s equivale a $1/2$ de veces el número de electrones desapareados.

El método UHF también es aplicable a sistemas de capa cerrada. En la mayoría de los casos el resultado es el mismo que el obtenido mediante el método RHF anteriormente descrito. Ahora bien, en determinados casos se puede obtener una solución UHF de menor energía que la solución RHF.

▪ **Método de Hartree-Fock restringido de capa abierta (Restricted Open-Shell Hartree-Fock, ROHF)**

El método ROHF considera, por una parte, orbitales moleculares doblemente ocupados y, por otra, las capas abiertas formadas por orbitales monoocupados. Para el caso de seis electrones, el determinante de Slater correspondiente a una de las componentes del primer triplete sería

$$\Psi_{ROHF} = \left| \Psi_1(1) \overline{\Psi}_1(2) \Psi_2(3) \overline{\Psi}_2(4) \Psi_3(5) \Psi_4(6) \right| \quad (3.2.25)$$

En la Figura 3.2.1.b se muestra de manera esquemática el diagrama de orbitales moleculares que correspondería a este sistema.

La ventaja de este método es que las funciones de onda ROHF son funciones propias de S^2 y, por tanto, describen estados de espín puros, de manera que no introducen contaminación de espín. A consecuencia de esto, en los casos en que se obtiene mucha contaminación de espín, los cálculos ROHF suelen ser la mejor forma de obtener buenas funciones de onda.

El inconveniente que presenta es que requiere más tiempo de cálculo para tratar correctamente los orbitales mono y doblemente ocupados, así como la interacción entre ellos. Además, puesto que no se considera la polarización de espín, una función ROHF es menos flexible que una UHF, y no es útil para ciertos propósitos, como por ejemplo para predecir espectros EPR o densidades de espín.

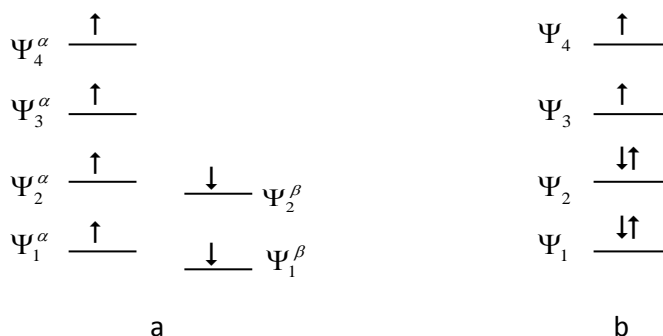


Figura 3.2.1 - Diagrama de orbitales moleculares para un sistema de seis electrones: UHF (a) y ROHF (b)

3.2.3. Limitaciones del método de Hartree-Fock

Este método utiliza la aproximación de que los electrones se mueven en el campo de potencial promedio creado por los electrones restantes. Sin embargo, el movimiento de los electrones está correlacionado, es decir, su movimiento depende de la posición instantánea de los otros electrones y este método no considera las interacciones electrón-electrón.

Además de no considerar la correlación electrónica, existen tres fuentes de error en los cálculos HF: la aproximación de Born-Oppenheimer, el uso de un conjunto de funciones de base incompleto y la omisión de efectos relativistas.

Con el método de Hartree-Fock, existe una probabilidad finita de que dos electrones de espín contrario se encuentren en el mismo punto del espacio. En cambio, si dos electrones tienen el mismo espín, la probabilidad de que los dos estén en el mismo punto del espacio es nula. Así pues, el movimiento de los electrones de espín paralelo está correlacionado, pero el movimiento de los electrones de espín contrario no lo está. Por ello, se dice que la función de onda de Hartree-Fock es una función no correlacionada.

Se define la energía de correlación como la diferencia entre la energía exacta no relativista y la energía límite de Hartree-Fock. Esta última correspondería a la obtenida con el método de Hartree-Fock, utilizando un conjunto de funciones de base infinito.

A menudo, se llama correlación de Coulomb a la correlación entre electrones de espín contrario y correlación de Fermi a la de electrones de igual espín. Asimismo, la región del espacio alrededor de un electrón en la que la probabilidad de encontrar un electrón de espín contrario o igual es muy pequeña, se denomina agujero de Coulomb o de Fermi, respectivamente.

Existen diversos métodos que introducen la correlación electrónica. Por un lado, los métodos convencionales, llamados post-Hartree-Fock, parten de la función de Hartree-Fock y le aplican algunas correcciones para incluir la correlación. Algunos de estos métodos son el método variacional de interacción de configuraciones (Configuration Interaction, CI), el método perturbacional de Møller-Plesset (MP_n , donde n es el orden de corrección) y el método Coupled Cluster (CC). Otros métodos no convencionales que incluyen la correlación electrónica de forma alternativa son los basados en la teoría del funcional de la densidad (Density Functional Theory, DFT), los cuales han adquirido un gran auge debido a su bajo coste computacional comparado con los métodos convencionales. En el siguiente apartado se hace una descripción de estos métodos DFT. ^[3, 7-10]

3.3. Métodos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT)

La teoría del funcional de la densidad (DFT) se basa en el teorema de Hohenberg-Kohn, quienes en 1964 demostraron que la energía electrónica del estado fundamental de un sistema, cuando dicho estado no está degenerado, está completa y unívocamente determinada por la densidad de probabilidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ del mismo. Se puede decir entonces que la energía electrónica del estado fundamental es un funcional de $\rho(\mathbf{r})$ ($E=E[\rho]$). En este punto hay que destacar que, mientras que las teorías *ab initio* de orbitales moleculares para el cálculo de la energía necesitan una función de onda que depende de $3N$ coordenadas, siendo N el número de electrones, en la teoría DFT es suficiente con conocer $\rho(\mathbf{r})$, que es función de tres variables únicamente.

Por analogía con los métodos de la Química Cuántica convencional, el funcional de la energía se escribe como la suma de tres términos: la energía cinética, la atracción entre núcleos y electrones, y la repulsión interelectrónica.

$$E(\rho) = T(\rho) + V_{ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) \quad (3.3.1)$$

El funcional $V_{ne}(\rho)$ es conocido, puesto que $\hat{V}_{ne}(\rho) = \sum_{i=1}^n v(r_i)$, donde

$v(r_i) = -\sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{i\alpha}}$ es la función de energía potencial de atracción nuclear

para un determinado electrón i localizado en el punto r , de modo que

$$V_{ne} = \left\langle \psi_o \left| \sum_{i=1}^n v(r_i) \right| \psi_o \right\rangle = \int \rho(r) v(r) dr \quad (3.3.2)$$

Se tiene entonces

$$E(\rho) = T(\rho) + V_{ne}(\rho) + V_{ee}(\rho) = \int \rho(r)r(r)dr + F(\rho) \quad (3.3.3)$$

donde el funcional $F(\rho)$, definido como $F(\rho) = T(\rho) + V_{ee}(\rho)$, es desconocido e independiente del potencial externo, por lo que la ecuación (3.3.3) no proporciona una vía práctica para calcular la energía ($E(\rho)$) a partir de la densidad de probabilidad electrónica.

Además, el término $V_{ee}(\rho)$ se divide en dos contribuciones: una debida a la interacción de Coulomb clásica, $V_H(\rho)$, y otra debida a la correlación e intercambio, $V_{xc}(\rho)$. Uno de los principales problemas de la teoría DFT es que, aunque es posible demostrar que el funcional de correlación e intercambio es único, su forma explícita no ha sido encontrada hasta el día de hoy. La diferencia entre los distintos métodos DFT radica, precisamente, en la elección del funcional de correlación e intercambio. La aplicabilidad de la teoría DFT a sistemas de interés químico se vio facilitada por un segundo teorema, el teorema variacional de Hohenberg y Kohn, y por una aproximación desarrollada por Kohn y Sham. Según el teorema variacional de Hohenberg y Kohn, para toda función densidad de prueba ρ_{pr} que satisface $\int \rho_{pr}(r) = n$ y $\rho_{pr}(r) \geq 0$ para todo r , es válido: $E_o = E_v(\rho)$, donde ρ es la verdadera densidad electrónica del estado fundamental. Entonces, se puede afirmar que la verdadera densidad electrónica del estado fundamental minimiza el funcional energía $E_v(\rho_{pr})$.

Usando la función de onda ψ_{pr} , determinada por la densidad ρ_{pr} , como función de prueba variacional para la molécula con Hamiltoniano \hat{H} , el teorema de variaciones da

$$\left\langle \psi_{pr} \left| \hat{H} \right| \psi_{pr} \right\rangle = \left\langle \psi_{pr} \left| \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \sum_{i=1}^n v(r_i) \right| \psi_{pr} \right\rangle \geq E = E_v(\rho) \quad (3.3.4)$$

Por el hecho de que las energías medias cinética y potencial son funcionales de la densidad electrónica, y usando la ecuación (3.3.2) con ψ_o reemplazada por ψ_{pr} , se tiene

$$T(\rho_{pr}) + V_{ee}(\rho_{pr}) + \int \rho_{pr} v(r) dr \geq E_v(\rho) \quad (3.3.5)$$

Los funcionales T y $V_{ee}(\rho)$ son los mismos en las ecuaciones (3.3.5) y (3.3.3). El primer miembro de (3.3.5) difiere de (3.3.3), solamente en que ρ ha sido reemplazada por ρ_{pr} , lo cual lleva a que $E_v(\rho_{pr}) \geq E_v(\rho)$, lo que demuestra que no cualquier densidad electrónica de prueba puede dar una energía del estado fundamental mayor que la verdadera densidad electrónica del estado fundamental.

Hohenberg y Kohn probaron sus teoremas únicamente para estados fundamentales no degenerados. Posteriormente Levy demostró estos teoremas para estados fundamentales degenerados.

Tal como nos dice el teorema de Hohenberg-Kohn, es posible calcular todas las propiedades moleculares del estado fundamental a partir de ρ sin haber tenido que obtener la función de onda molecular. Sin embargo, este teorema no nos dice cómo calcular la energía a partir de

ρ , puesto que el funcional F es desconocido, ni tampoco explica cómo obtener ρ sin obtener previamente la función de onda. En 1965, Kohn y Sham idearon un método práctico para obtener ρ y también la energía a partir de ésta. Este método utiliza un sistema de referencia ficticio (indicado con el subíndice s) que tiene el mismo número de electrones (n) que la molécula objeto de estudio. En el sistema de referencia se considera que los electrones no interactúan entre sí; y cada electrón i ($i=1, 2, \dots, n$) siente la misma energía potencial $v_s(r_i)$, que es tal que hace que la densidad de probabilidad electrónica en el sistema de referencia (ρ_s) sea exactamente igual a la densidad ρ en el sistema real: $\rho = \rho_s$.

El hecho de que los electrones del sistema de referencia no ejerzan fuerzas entre ellos permite escribir el hamiltoniano del sistema \hat{H}_s como suma de los hamiltonianos de cada electrón individual:

$$\hat{H}_s = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 \sum_{i=1}^n v_s(r_i) \equiv \sum_{i=1}^n \hat{h}_i^{KS} \quad (3.3.6)$$

$$\hat{h}_i^{KS} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \nabla_i^2 + v_s(x_i) \quad (3.3.7)$$

\hat{h}_i^{KS} es el hamiltoniano Kohn-Sham de un electrón. En el caso de que se desprecie el principio de Pauli y el espín, la función de onda del sistema de referencia s es el producto de las funciones de onda espaciales de un electrón, ya que las partículas no interactúan. Si se tiene en cuenta el requisito de antisimetría del principio de Pauli y el espín, la función de onda del estado fundamental del sistema de referencia es un determinante espín-orbital de Slater para cada electrón, que es producto

de un orbital espacial θ_i^{KS} y una función de espín (α ó β). Los orbitales Kohn-Sam θ_i^{KS} son funciones propias del operador unielectrónico \hat{h}_i^{KS} :

$$\hat{h}_i^{KS} \theta_i^{KS} = \varepsilon_i^{KS} \theta_i^{KS} \quad (3.3.8)$$

donde ε_i^{KS} es la energía orbital Kohn-Sham de θ_i^{KS} .

La introducción de los orbitales de Kohn-Sham, permite expresar la densidad electrónica en términos de orbitales monoelectrónicos, ya que ésta es la suma de la densidad de probabilidad $|\theta_i^{KS}|^2$ de los orbitales individuales. Además, por definición, el sistema de referencia tiene la misma ρ que la molécula.

$$\rho(r) = \rho_s = \sum_{i=1}^n |\theta_i^{KS}|^2 \quad (3.3.9)$$

La energía en el estado fundamental de Hohenberg-Kohn (3.3.3), siguiendo este formalismo de Kohn y Sham, viene dada por la siguiente expresión.

$$E(\rho) = \int \rho(r) r(r) dr + T_s(\rho) + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1) \rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + \Delta T(\rho) + \Delta V_{ee}(\rho) \quad (3.3.10)$$

donde se ha considerado que ΔT es la diferencia de energía cinética media del estado fundamental entre la molécula y el sistema de referencia de electrones no interactuantes con igual densidad electrónica que la molécula: $\Delta T = T(\rho) - T_s(\rho)$; y ΔV_{ee} es la diferencia entre la energía potencial media de repulsión interelectrónica V_{ee} en la molécula y la

energía clásica de autorrepulsión de la nube de carga con densidad electrónica ρ : $\Delta V_{ee} = V_{ee} - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 = V_{ee} - J$

Los funcionales ΔT y ΔV_{ee} son desconocidos, su suma se denomina **funcional de energía de correlación-intercambio**. Éste es también funcional de ρ y se define como

$$E_{XC}(\rho) \equiv \Delta T(\rho) + \Delta V_{ee}(\rho) \quad (3.3.11)$$

Es de esperar que $\Delta T(\rho)$ y ΔV_{ee} sean cantidades relativamente pequeñas, pero no son cero por la exigencia del principio de Pauli de que la función de onda sea antisimétrica con respecto al intercambio, lo que produce efecto de *intercambio* en la energía, y porque la correlación instantánea entre los movimientos de los electrones produce efectos de *correlación* en la energía.

Así pues, la expresión de la **energía de Kohn-Sham** es la siguiente:

$$E(\rho) = V_{Ne} + T_s(\rho) + J + V_{NN} + E_{XC}(\rho) \quad (3.3.12)$$

La ecuación (3.3.12) es una expresión exacta para la energía molecular electrónica. Sin embargo, no se conoce cuál es la expresión matemática verdadera para el funcional E_{XC} , de modo que se deben utilizar aproximaciones para E_{XC} . La clave para efectuar un cálculo con precisión KS DFT de propiedades moleculares es que la aproximación de E_{XC} sea buena. El término $E_{XC}(\rho)$ se puede calcular si se conoce ρ y si se conoce cuál es el funcional de E_{XC} .

Los términos de la ecuación (3.3.12), T_s , V_{Ne} , J y E_{xc} se pueden calcular si se conocen los orbitales Kohn-Sham (θ_i^{KS}); y V_{NN} se puede obtener fácilmente a partir de la ubicación de los núcleos. Por tanto, la energía molecular electrónica en el estado fundamental $E(\rho)$, se puede calcular si se conocen los orbitales Kohn-Sham.

Hohenberg y Kohn demostraron que la verdadera densidad de probabilidad electrónica, ρ , minimiza el funcional para la energía, $E(\rho)$. Puesto que ρ se determina a partir de los orbitales KS, θ_i^{KS} , la solución del problema se reduce, al igual que en la teoría HF, a determinar el conjunto de orbitales ortonormales que hacen mínima la energía en (3.3.12). Los orbitales de Kohn-Sham tienen que ser obtenidos de modo iterativo, de forma similar a como se hace en los métodos HF.

Los orbitales KS que minimizan la energía satisfacen la ecuación de Kohn-Sham (3.3.8):

$$\hat{h}_i^{KS} \theta_i^{KS} = \epsilon_i^{KS} \theta_i^{KS}$$

donde el hamiltoniano unielectrónico KS \hat{h}_i^{KS} es suma de cuatro términos: (a) el operador energía cinética de un electrón, (b) la energía potencial de atracción entre el electrón 1 y los núcleos, (c) la energía potencial de repulsión entre el electrón 1 y una hipotética nube cargada de densidad electrónica ρ debida a los electrones esparcidos y (d) un potencial de correlación-intercambio $v_{xc}(r_1)$. Estos tres primeros términos de \hat{h}_i^{KS} son idénticos a tres de los del operador de Fock (\hat{F}) de las ecuaciones de Hartree-Fock. La diferencia entre las ecuaciones Hartree-Fock y las ecuaciones Kohn-Sham es que en el cuarto término

(d) de las ecuaciones HF se reemplaza por el potencial correlación-intercambio v_{XC} .

$$\text{La expresión de } v_{XC} \text{ es: } v_{XC}(r) = \frac{\delta E_{XC}(\rho)}{\delta \rho} \quad (3.3.13)$$

El funcional derivado $\delta E_{XC}(\rho)/\delta \rho$ para r depende de cuánto cambie el funcional $E_{XC}(\rho)$ cuando la función ρ cambia una pequeña cantidad en una pequeña región centrada en r .

El cuarto término del operador de Fock tiene en cuenta los efectos de intercambio de electrones (el principio de Pauli), pero no de la correlación electrónica, efecto que, además del de intercambio, es tenido en cuenta en el término v_{XC} en el operador KS \hat{h}_i^{KS} .

La realización de cálculos del funcional de la densidad, partiendo del supuesto de que se tiene una aproximación razonable para el funcional $E_{XC}(\rho)$, empieza realizando una estimación inicial de la densidad electrónica $\rho(r)$ de la molécula. Para ello se superponen las densidades electrónicas de los átomos individuales considerando la geometría nuclear elegida para el cálculo. Con el valor inicial de ρ se calcula $E_{XC}(\rho)$ y se obtiene su funcional derivado, teniendo así una primera estimación de v_{XC} . Este v_{XC} se utiliza en las ecuaciones de KS

$$(\hat{h}_i^{KS} \theta_i^{KS} = \varepsilon_i^{KS} \theta_i^{KS}) \text{ para estimar inicialmente los orbitales KS } \theta_i^{KS}.$$

Igual que con el método de HF, usualmente se expanden los orbitales desconocidos utilizando un conjunto de base. Con los orbitales θ_i^{KS} se mejora la densidad de probabilidad ρ a partir de la ecuación (3.3.9). Con ρ mejorada se calcula una $E_{XC}(\rho)$ mejorada, a partir de la cual se calcula

v_{XC} . Este v_{XC} mejorado, a su vez se utiliza en las ecuaciones KS para calcular unos orbitales también mejores; etc. Se continúa la iteración hasta que no se observan cambios significativos de un ciclo al siguiente. Finalmente se calcula la energía molecular a partir de (3.3.12) utilizando los últimos orbitales y ρ .

Se han usado varios funcionales aproximados $E_{XC}(\rho)$ en cálculos DFT. Entre ellos se encuentra el sugerido por Kohn y Sham, denominado *aproximación de densidad local* (LDA, Local Density Approximation). La $E_{XC}(\rho)$ obtenida con este método es exacta cuando la densidad electrónica ρ varía lentamente con la posición, cosa que no ocurre en una molécula.

$E_{XC}(\rho)$ se puede escribir como suma de una parte de correlación y otra de intercambio:

$$E_{XC}(\rho) = E_X(\rho) + E_C(\rho) \quad (3.3.14)$$

$E_X(\rho)$ se define igual que se hacía en la energía de intercambio en la teoría Hartree-Fock (HF), excepto que en este caso los orbitales HF se reemplazan por los de KS:

$$E_X(\rho) = -\frac{1}{4} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \theta_i^{KS}(1) \theta_i^{KS}(2) | 1/r_{12} | \theta_j^{KS}(1) \theta_j^{KS}(2) \rangle \quad (3.3.15)$$

donde el factor 1/4 proviene de que el sumatorio es sobre electrones y no sobre orbitales. Teniendo $E_X(\rho)$, $E_C(\rho)$ se define como la diferencia entre $E_{XC}(\rho)$ y $E_X(\rho)$:

$$E_C(\rho) = E_{XC}(\rho) - E_X(\rho) \quad (3.3.16)$$

Para moléculas de capa abierta y geometrías moleculares próximas a la disociación, la *aproximación de densidad de spin local* (LSDA, Local Spin Density Approximation) da mejores resultados que la LDA, ya que permite que los electrones tengan diferentes orbitales espaciales KS, $\theta_{i\alpha}^{KS}$ y $\theta_{i\beta}^{KS}$, de modo análogo al método UHF.

En general, los cálculos LSDA KS DFT dan buenos resultados para geometrías moleculares, momentos dipolares y frecuencias vibracionales, pero un resultado más bien pobre para la energía de atomización. Las energías de disociación precisas requieren funcionales que vayan más allá del LSDA.

Otra aproximación para la $E_{xc}(\rho)$ viene dada por el *método X_α* , donde no se considera la correlación y la contribución al intercambio viene dada por:

$$E_{xc} \approx E_x^{X_\alpha} = -\frac{9}{8} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \alpha \int [\rho(r)]^{4/3} dr \quad (3.3.17)$$

donde α es un parámetro ajustable para el cual se han usado valores de 2/3 (corresponde a la expresión de intercambio de la expresión LDA de E_{xc}). Este método, desarrollado por Slater anteriormente al de Kohn y Sham, da resultados más bien erráticos para los cálculos moleculares, por lo que no se suele utilizar en la actualidad.

Para estudiar la precisión de los funcionales aproximados $E_{xc}(\rho)$, éstos se utilizan en los cálculos DFT y se comparan las propiedades moleculares calculadas con las experimentales. La falta de un procedimiento sistemático para mejorar E_{xc} y, por tanto, para mejorar

las propiedades moleculares calculadas, es el principal inconveniente del método DFT.

Hacia finales de 1980, Becke demostró que tomando E_{xc} como una integral de una cierta función de ρ y el gradiente de ρ (las derivadas de esta respecto a la posición), se puede obtener una mejora importante en los resultados de la energía molecular de atomización. Este funcional se llama *funcional de gradiente-correctado*, dentro de la *aproximación de gradiente-generalizado* (*GGA*, *Generalised Gradient Approximation*). E_{xc}^{GGA} se desdobra en partes de intercambio y correlación, que se modelan por separado:

$$E_{xc}^{GGA} = E_x^{GGA} + E_c^{GGA} \quad (3.3.18)$$

Se desarrollan funcionales aproximados de energía de intercambio y de correlación de gradiente correctado usando consideraciones teóricas tales como el comportamiento de los funcionales verdaderos $E_x(\rho)$ y $E_c(\rho)$ en varias situaciones límite con, a veces, la inclusión de algún empirismo.

Algunos funcionales de intercambio de gradiente correctado $E_x(\rho)$ comúnmente empleados son el de Perdew y Wang de 1986 (PWx86), que no contiene parámetros empíricos; el de Becke de 1988 (B88) y el de Perdew y Wang de 1991 ((PWx91).

Los funcionales de correlación de gradiente correctado $E_c(\rho)$ más usados son, entre otros, el de Lee-Yang-Parr (LYP), el de correlación de Perdew 1986 (Pc86) o el de correlación libre de parámetros Perdew-Wang (PWc91) y el de Becke (Bc95).

Cualquier funcional de intercambio se puede combinar con cualquier funcional de correlación. Por ejemplo, la notación BLYP/6-31G* indica un cálculo DFT realizado con el funcional de intercambio de Becke 1988 y el de correlación Lee-Yang-Parr, con los orbitales KS expandidos en la base 6-31G*. Se usan mucho los funcionales de correlación de intercambio *híbridos*. Éste mezcla la fórmula (3.3.15) para E_x con las fórmulas para E_x y E_c del gradiente corregido. Por ejemplo, el popular funcional híbrido B3LYP, donde el 3 indica un funcional de tres parámetros, viene definido por

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_i)E_i^{LSDA} + a_0E_i^{exacto} + a_iE_i^{B88} + (1 - a_c)E_c^{VWN} + a_cE_c^{LYP} \quad (3.3.19)$$

donde $E_x(\rho)$ viene dado por (3.3.15), y donde los valores del parámetro $a_0 = 0.20$, $a_i = 0.72$ y $a_c = 0.81$ fueron elegidos de modo que se obtuviera un buen ajuste a las energías de atomización molecular experimental.

Los funcionales de gradiente corregido y los funcionales híbridos no sólo dan buenas geometrías de equilibrio, frecuencias vibracionales y momentos dipolares, sino también, energías de atomización molecular generalmente precisas. Globalmente, los funcionales híbridos parecen dar la mejor calidad. Cabe puntualizar que el funcional híbrido B3LYP es el más utilizado hasta la fecha, debido a la bondad en los resultados de sistemas químicos muy diversos. De hecho, gran parte de los cálculos teóricos realizados en la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo mediante el uso de este funcional.

Los cálculos DFT utilizan funciones de base, en muchos casos orbitales de tipo Gaussiano (GTO, *Gaussian-type Orbital*); pero curiosamente, al utilizar bases mayores, la precisión de los resultados no aumenta

demasiado, esto se debe a que el funcional de densidad limita más la precisión que el conjunto de funciones de base. Además, puesto que los cálculos DFT utilizan integrales numéricas, el hecho de utilizar bases GTO no hace que el cálculo sea más rápido que si se utiliza otros tipos de conjuntos de bases, como los orbitales de tipo Slater (STO, *Slater-type Orbital*), que son conjuntos de bases numéricas y, como es razonable, son más precisas, puesto que representan mejor los vértices nucleares y la caída exponencial a distancias grandes. Así, la precisión de los resultados de cálculos DFT depende, además del conjunto de funciones de base, del funcional de densidad, cuya elección no es fácil, puesto que no es sistemática. En la Tabla 3.3.1 se muestra un resumen de varios funcionales de densidad.

Tabla 3.3.1 – Funcionales de densidad

Acrónimos	Nombre	Tipo
X_α	X alfa	sólo intercambio
HFS	Hartree-Fock Slater	HF con intercambio LDA
VWN	Vosko, Wilks y Nusair	LDA
BLYP	Funcional de intercambio de Becke con correlación de Lee, Yang y Parr	gradiente corregido
B3LYP (Becke3LYP)	3 términos de Becke con intercambio de B88 y correlación de Lee, Yang y Parr	método híbrido

Acrónimos	Nombre	Tipo
PW91	Perdew y Wang 1991	gradiente corregido
G96	Gill 1996	intercambio
P86	Perdew 1986	gradiente corregido
B86	Becke 1986	gradiente corregido
B3P86	intercambio de Becke, correlación de Perdew	método híbrido
B3PW91	intercambio de Becke, correlación de Perdew y Wang	método híbrido

La mayor ventaja de los métodos DFT es su coste computacional, que es del orden del que requieren los métodos HF, pero incluyen una buena estimación de la correlación electrónica. Además, tal como se ha dicho anteriormente, no se necesitan tantas coordenadas como con el resto de métodos *ab initio*; conociendo $\rho(r)$, que depende solamente de tres coordenadas, es suficiente. Para sistemas con metales de transición, los resultados con este método son más cercanos a los experimentales que los obtenidos con el método de Hartree-Fock.

Sin embargo, una de sus principales deficiencias es que no pueden ser sistemáticamente mejorados y, además no es fácil saber de antemano qué funcional es el más adecuado para cada problema.

El método presenta ciertas limitaciones ya que la teoría de Hohenberg-Kohn es básicamente una teoría del estado fundamental y, aunque se han desarrollado versiones DFT KS aplicables a estados excitados, éstas no dan resultados precisos. Además, pese a que el método es válido para explicar la mayor parte de las propiedades moleculares con los funcionales que actualmente existen, a menudo no da buenos resultados

para las energías de activación de las reacciones. Los funcionales conocidos hasta la fecha también fallan para las fuerzas de van der Waals.

Este método no es variacional, puesto que utiliza funcionales aproximados, por lo que puede dar energías más bajas que la del estado fundamental verdadera.

Así pues, vistas las deficiencias del método, en la actualidad se está trabajando en el desarrollo de funcionales mejorados. Recientemente han sido desarrollados los denominados funcionales híbridos meta-GGA, que además de incluir la densidad y la primera derivada, también incluyen términos de mayor orden. Ejemplos de estos funcionales son BIB95, TPPSh, M05, M06, etc. ^[6, 8-12]

3.4. Conjuntos de funciones de base

En la realización de cálculos *ab initio* o basados en la teoría del funcional de la densidad, se debe especificar el conjunto de funciones de base para describir la función de onda del sistema. La combinación de estas funciones de base da lugar a los orbitales moleculares que configuran la estructura electrónica del sistema. Así pues, cuanto mayor sea el número de funciones de base, mejor será la definición de dichos orbitales, pero mayor será también el coste computacional.

En principio, utilizando un conjunto de infinitas funciones de base, se conseguiría la energía más precisa que se podría obtener dentro del formalismo SCF-HF, llamada *límite Hartree-Fock*. Ahora bien, puesto que utilizar una base infinita es imposible, al error inherente al método SCF-HF debe sumarse el error debido al uso de una base truncada.

Así, es importante decidir el tipo y número de funciones de base que conviene utilizar. Desde el punto de vista computacional interesa una base pequeña para evitar calcular y/o almacenar muchas integrales bieletrónicas, aunque es necesario alcanzar un equilibrio entre el coste computacional y la bondad de los resultados.

Debido a la dificultad que implica su resolución, el único tipo de funciones atómicas consideradas son los orbitales hidrogenoides, pero se suele recurrir a otro tipo de orbitales, como los orbitales de Slater (STO) y los orbitales gaussianos (GTO). Ambos incluyen los armónicos esféricos para describir la función angular y difieren de los orbitales hidrogenoides únicamente en la función radial.

Las funciones de Slater se definen como

$$\phi_{nlm}^{STO}(r, \theta, \varphi) = N_{\xi} r^{n-1} \exp(-\xi r) Y_{lm}(\theta, \varphi)$$

donde ξ es un parámetro que se puede determinar variacionalmente, N_{ξ} es la constante de normalización y Y_{lm} es un armónico esférico.

Estas funciones solamente se diferencian de los orbitales hidrogenoides en el polinomio en r , que ha sido truncado reteniendo sólo su potencia más alta, lo que hace que los STO no sean ortogonales, pero mantienen el término exponencial, que hace que tenga buenas propiedades asintóticas.

Las funciones gaussianas se definen como

$$\phi_{nlm}^{GTO}(r, \theta, \varphi) = N_{\alpha} r^{n-1} \exp(-\alpha r^2) Y_{lm}(\theta, \varphi)$$

donde α es un parámetro variacional y N_α es la constante de normalización.

Al igual que los orbitales de Slater, los orbitales gaussianos no son ortogonales. La ventaja de utilizar orbitales gaussianos es que la resolución de las integrales bielectrónicas es mucho más sencilla que con los orbitales de Slater. Sin embargo, los GTOs se alejan mucho más que los STOs del comportamiento hidrogenoide. En la Figura 3.4.1 se muestra una comparación entre ambos tipos de funciones.

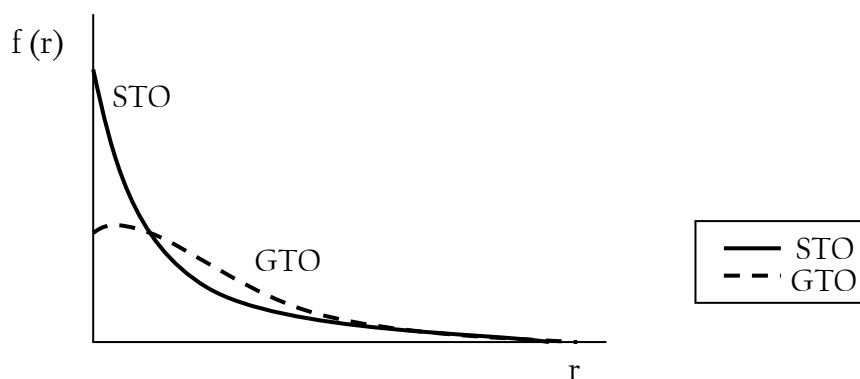


Figura 3.4.1 – Comparación entre una función de Slater (1s) y una gaussiana

Así pues, una sola función gaussiana da una representación muy pobre de un orbital atómico. No obstante, este inconveniente se puede eliminar utilizando *orbitales gaussianos contractos* (CGTO), es decir, combinaciones lineales de GTO primitivas (g_p^{GTO}).

$$\phi^{CGTO} = \sum_{p=1}^L d_p g_p^{GTO}$$

Los coeficientes de esta combinación lineal o contracción se determinan para cálculos atómicos y sus valores se mantienen fijos en los cálculos moleculares. En la Figura 3.4.2 se muestran las representaciones gráficas

de un CGTO obtenido a partir de tres funciones primitivas, y se compara con un STO y un GTO.

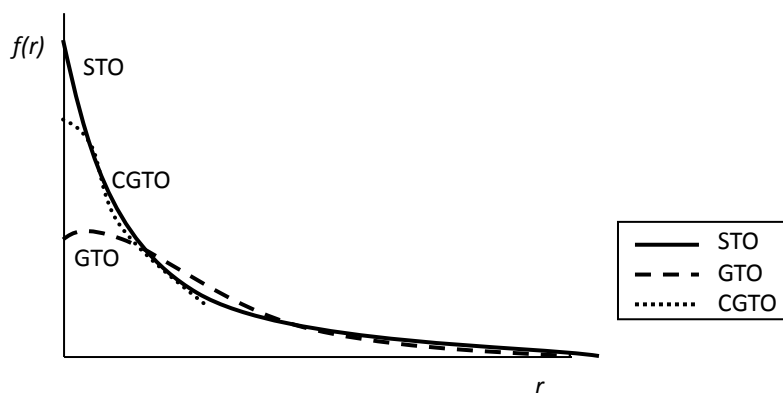


Figura 3.4.2 – Representación de un orbital 1s para un átomo de H mediante una función de Slater, una gaussiana y una gaussiana contracta

La principal ventaja de utilizar GTOs frente a STOs es que, aunque las primeras requieran más primitivas para describir la función de onda, éstas se resuelven analíticamente, que es mucho más rápido que la resolución de integrales numéricas como se hace con las STOs. Además, las funciones gaussianas permiten evaluar muchos tipos de integrales moleculares debido a que cumplen la propiedad de que el producto de dos gaussianas centradas en puntos diferentes es igual a otra gaussiana centrada en un punto intermedio.

La mayoría de cálculos suelen realizarse usando gaussianas como conjunto de funciones de base aunque, a veces, para trabajos que requieren mucha precisión se utilizan funciones de Slater.

En esta tesis doctoral, para los cálculos realizados con el programa gaussian las funciones utilizadas son de tipo gaussiano. Además, para describir metales de transición, es muy común el uso de pseudopotenciales (*Effective Core Potentials, ECP*), que consisten en que un potencial efectivo describe todos los electrones localizados en el core,

mientras que el resto de electrones quedan descritos mediante funciones de base. De este modo se aumenta la velocidad de cálculo y además se mejora la descripción del comportamiento de estos electrones al incluir efectos relativistas. En gran parte de los cálculos donde un átomo de hierro está presente, se han utilizado pseudopotenciales para describirlo, concretamente el LANL2DZ.^[13]

Considerada la cuestión del tipo de funciones de base atómica que pueden utilizarse en los cálculos moleculares, debe tratarse el problema de cuántas funciones deben tenerse en cuenta. La aproximación más simple es la de utilizar bases mínimas, en las que se incluye una función de base para cada orbital atómico perteneciente a las capas ocupadas en el estado fundamental del átomo en cuestión. Por ejemplo, para el caso de la molécula de agua, esto implicaría usar cinco funciones para el oxígeno y una para cada hidrógeno, es decir, los orbitales moleculares se expresarían como combinación lineal de siete funciones atómicas de base. Este tipo de base suele dar resultados poco satisfactorios, que se pueden mejorar ampliando el número de funciones de base, utilizando lo que se denomina bases extendidas. Una base mínima puede extenderse de varias formas. En primer lugar, se puede aumentar el número de funciones que se utilizan para representar cada orbital atómico. Así, si por ejemplo se incluyen dos funciones por orbital se habla de una base doble- ζ (DZ), que implica duplicar el número de funciones de base respecto a una base mínima. En el ejemplo del agua, el número de funciones de base pasaría a ser 14. De forma similar pueden definirse bases triple- ζ (TZ), cuádruple- ζ , etc., en las que se va añadiendo cada vez una función adicional para representar cada orbital atómico ocupado en el estado fundamental. A veces esta extensión de las bases incrementa mucho el tiempo de cálculo, y entonces se puede recurrir a una solución intermedia, que consiste en desdoblar sólo las funciones adscritas a los electrones de valencia, mientras que se mantiene una única función para

describir los orbitales internos. Estas bases reciben el nombre de bases extendidas de valencia o, en inglés, bases split-valence (SV). En el caso del agua, una de estas bases tendría trece funciones, ya que el orbital $1s$ del átomo de oxígeno se representa por una base mínima, mientras que los orbitales $2s$ y $2p$ del oxígeno y los $1s$ de los hidrógenos se representan por una base doble- ζ .

Otro criterio para extender una base consiste en introducir funciones que representen orbitales que no estén ocupados en el estado fundamental del átomo correspondiente, lo que permite describir los efectos de polarización. Estas funciones representan orbitales atómicos con un número cuántico l superior al de los orbitales de valencia del átomo, es decir, son las de carácter p para el hidrógeno y las de carácter d para los elementos del segundo período. Así pues, una base doble- ζ con polarización (DZP) para el agua implicaría incluir 25 funciones de base.

La notación para indicar el tamaño de la base, para el caso de utilizar bases con gaussianas contraídas que se ajustan a STOs viene dada por STO-NG, donde N indica el número de gaussianas utilizadas.

En el caso de split-valence se utiliza otra notación. Por ejemplo, una base 3-21G indica que cada orbital interno está representado por una contracción de tres gaussianas primitivas, y que cada orbital de la capa de valencia lo está por dos funciones, una que es contracción de dos gaussianas primitivas y la otra una gaussiana primitiva. Además, a esta notación se le puede añadir una o dos estrellas, 6-31G* ó 6-31G**, indicando que se han añadido funciones de polarización para los átomos que no sean hidrógeno o para todos, respectivamente. Las funciones de polarización dan más flexibilidad a la función de onda y suelen usarse para cálculos precisos de geometrías y frecuencias vibracionales.

También se puede añadir uno o dos signos suma ($6-3I+G$ ó $6-3I++G$), lo que indica la inclusión de funciones difusas para todos los átomos excepto para el hidrógeno en el primer caso, o para todos los átomos en el segundo caso. Las funciones difusas son primitivas con exponentes pequeños, por lo que describen bien la función de onda lejos del núcleo. Éstas suelen usarse para aniones, que presentan mayores distribuciones de densidad electrónica, así como para interacciones a grandes distancias, como las de Van der Waals.

El uso de una base mayor conduce a una energía menor y a unos mejores orbitales moleculares. Sin embargo, sólo considerando el espacio de Hilbert completo, es decir, una base de dimensión infinita, se obtendría la energía exacta del sistema, cosa no factible. De todos modos, es posible extrapolar cuál será el resultado correspondiente a una base completa. Esta energía, llamada límite de Hartree-Fock, corresponde a la mínima que puede obtenerse dentro del método de Hartree-Fock, pero su valor es superior a la energía exacta. La discrepancia entre el límite de Hartree-Fock y la energía exacta se debe a una deficiencia intrínseca del método, ya que éste tiene en cuenta la repulsión entre electrones, pero no considera las interacciones electrostáticas instantáneas que existen entre ellos. Es decir, el método Hartree-Fock no tiene en cuenta la correlación electrónica, como se ha dicho anteriormente.^[3, 4, 9-11]

3.5. Reacciones en dos estados electrónicos

Los metales de transición a menudo presentan estados electrónicos con electrones desapareados y, de hecho, muchos tienen en el estado fundamental un espín electrónico elevado.

Cuando los reactivos y productos de un paso de una reacción están conectados por más de una superficie de energía potencial con diferente estado de espín, se habla de reacciones prohibidas por el espín, y constituyen el grupo más amplio de los procesos adiabáticos.^[14] En la Figura 3.5.1 se muestra un esquema de una reacción prohibida por el espín, dónde se observa que conociendo la energía en una superficie de energía potencial y calculando la energía en puntos seleccionados de la otra superficie se obtiene información de la localización del cruce de superficies.

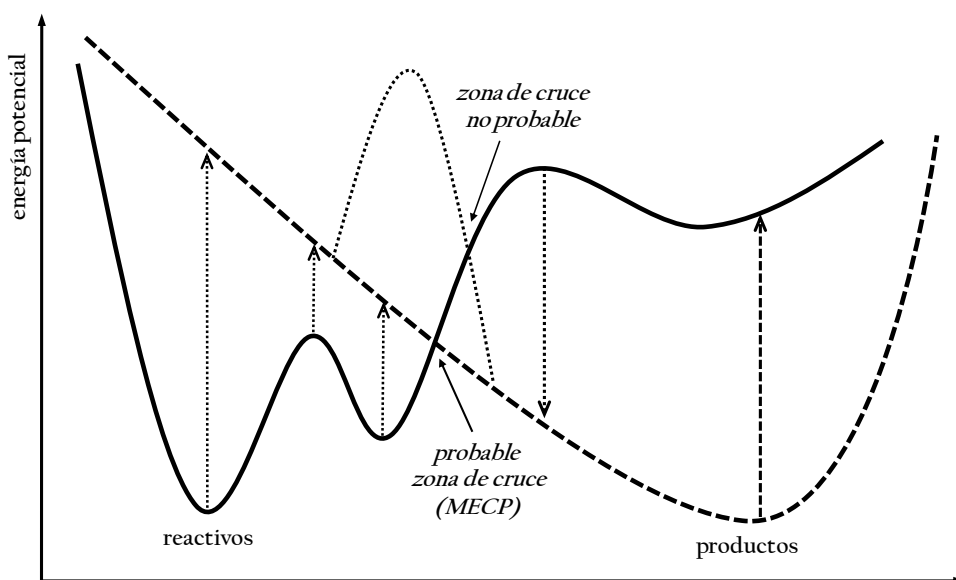


Figura 3.5.1 – Representación esquemática de una reacción prohibida por el espín

Para que tenga lugar el cambio de espín, deben cumplirse los tres requisitos siguientes:

- Que el sistema alcance una configuración en la que la energía potencial de los dos estados de espín sea casi igual.

b. Que la interacción entre las dos SEPs sea la adecuada para que la inversión de espín tenga lugar.

En este punto cabe distinguir entre las siguientes situaciones:

- El mecanismo y entalpía de la reacción es igual para los dos estados de espín. En este caso, según el postulado de Hammond, la superficie del estado excitado permanece por encima de la del estado fundamental durante todo el camino de reacción (ver Figura 3.5.2.a).
- Los mecanismos de la reacción para los dos estados de espín son parecidos, pero la entalpía de reacción del estado excitado es más favorable que para el estado fundamental, y el cruce entre superficies tiene lugar después de que el camino de reacción haya pasado por el estado de transición (Transition State, TS), como puede verse en la Figura 3.5.2.b.
- Los mecanismos para los dos estados de espín difieren, siendo la superficie del estado excitado mucho más plana en la zona de reactivos que la del estado fundamental. Así, el cruce tiene lugar en el camino de reactivos a TS, como se muestra en la Figura 3.5.2.c.
- Los mecanismos son también diferentes para cada espín, pero tanto reactivos como productos proceden de la misma superficie, es decir, tienen el mismo espín, aunque el TS de menor energía procede de otra superficie, y por tanto posee una multiplicidad diferente y se producen dos cruces. La Figura 3.5.2.d muestra este esquema de reacción.

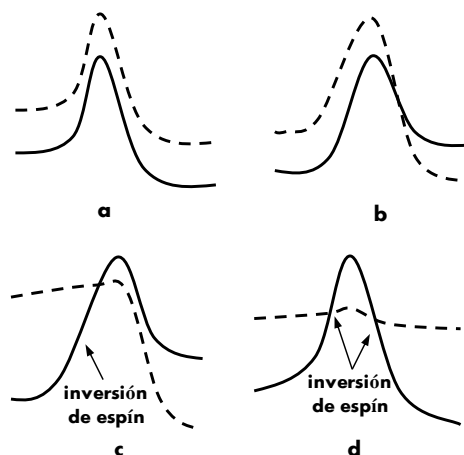


Figura 3.5.2 – Superficies de energía potencial para distintas posibilidades de cruce entre el estado fundamental y excitado

c. El acoplamiento espín-órbita debe ser el adecuado. Cuando este acoplamiento es aproximadamente nulo, la probabilidad de inversión de espín es insignificante, por lo que predomina la reactividad en un solo estado. En casos con acoplamiento muy fuerte, suele evitarse el cruce entre superficies de diferente espín. Solamente cuando la forma de las SEPs coincide con la Figura 3.5.2.c y 3.5.2.d y además el acoplamiento espín-órbita es intermedio tienen lugar reacciones en dos estados de espín distintos (TSR). En metales de transición no excesivamente pesados, que son sobre todo los de la primera serie de transición, se espera reactividad TSR. ^[15]

El problema principal que plantean las reacciones en que intervienen dos estados de espín diferentes es la localización de las regiones donde las SEPs se cruzan, debido a que si se considera cada SEP individualmente, esta región no tiene ninguna característica especial. Además, realmente estas SEPs se cruzan en varias configuraciones nucleares, pero la única que tiene significado químico es la de menor energía, que es la que interesa localizar.

Es frecuente que las reacciones en que ocurre una inversión de espín no sigan una cinética tipo Arrhenius, puesto que la dependencia de la temperatura y el paso a través de una barrera pueden ir en direcciones opuestas. También pueden darse efectos isotópico-cinéticos inusuales.

Landau-Zener hacen una descripción semiclásica del proceso considerando que el sistema se mueve desde la SEP de reactivos hasta el punto donde la SEP de productos tiene la misma energía que la de reactivos. La ecuación propuesta para calcular la probabilidad de que se produzca un salto entre ambas SEP^[16]:

$$p_{LZ} = 1 - \exp\left(\frac{-4\pi^2 H_{rp}^2}{h\nu\Delta F}\right)$$

donde H_{rp} es el acoplamiento entre las SEP de reactivo y producto en cada punto, ν es la velocidad para pasar entre una SEP y otra en el punto de cruce, y ΔF es la diferencia de pendientes entre las dos superficies. Puede observarse que cuanto mayor es el acoplamiento, menor es el exponencial, de manera que la probabilidad de salto entre SEPs tiende a uno. Esto constituye el límite adiabático, que significa que el sistema se encuentra en una SEP adiabática, ver Figura 3.5.3. Contrariamente, cuando H_{rp} tiende a cero, la probabilidad de salto tiende a cero también, conduciendo al límite diabático. En los metales de transición más pesados, el acoplamiento espín-órbita puede ser muy grande, entonces los procesos prohibidos por el espín pueden ocurrir en el límite adiabático. En casos donde el acoplamiento es más débil, el proceso tiende a un comportamiento diabático, y la probabilidad de cruce es baja.

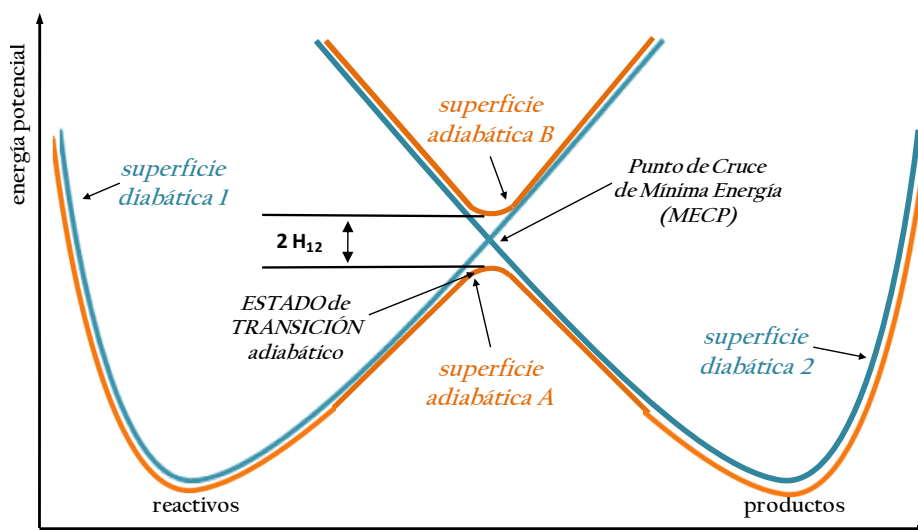


Figura 3.5.3 – Superficies de energía potencial diabáticas y adiabáticas para reacciones prohibidas por el espín

Existen dos factores que determinan la reactividad de los sistemas prohibidos por el espín: el factor electrónico y el nuclear. El primero de éstos repercute en el grado de acoplamiento entre estados de espín. Cuando este acoplamiento es muy débil, el proceso puede ser muy lento, siendo entonces el factor nuclear el determinante. En caso de acoplamientos grandes, no siempre los procesos prohibidos por el espín transcurren a velocidades grandes, sino que normalmente el factor nuclear es más importante y por tanto el que determina la velocidad de la reacción. Este segundo factor, el nuclear, se refiere a la cantidad de energía necesaria para mover los núcleos desde el mínimo de los reactivos hasta la región donde las SEP de los dos estados espín se cruzan. Cuando esta diferencia de energías es muy grande, la reacción puede ser muy lenta, incluso cuando el acoplamiento electrónico es tan grande que está en el límite adiabático, ya que es posible que entonces el cruce entre las dos superficies se produzca a energías elevadas, lo que supone altas energías de activación. Así pues, habitualmente el factor nuclear es decisivo en la velocidad de este tipo de reacciones.

Aunque este modelo semiclásico es cualitativamente correcto, hay que considerar la posibilidad de que, a bajas temperaturas, tenga lugar el efecto túnel, es decir, que el sistema no alcance la región de cruce entre SEPs, pero igualmente pase de un estado electrónico al otro mientras, simultáneamente, también cambia la configuración nuclear. Sin embargo, puesto que se trata de núcleos pesados, el cambio de las posiciones nucleares queda limitado a las cercanías del punto de cruce entre SEPs, así que el modelo semiclásico no entraría en seria discrepancia con la mecánica cuántica. [17]

3.5.1. Métodos para evaluar el punto de cruce

Métodos cualitativos

La información cualitativa del punto de cruce entre SEPs con diferente espín suele dar una idea bastante buena de la importancia del factor nuclear en la cinética de los procesos prohibidos por el espín.

Pueden utilizarse distintas aproximaciones, como por ejemplo calcular para cada mínimo u otros puntos críticos que constituyen una SEP, la energía para esas mismas geometrías con otra multiplicidad (single-points). De esta forma se puede hacer una estimación de la posición del cruce entre superficies.

Método cuantitativo de la Optimización Parcial

Esta aproximación consiste en definir una coordenada geométrica sencilla que tenga valores óptimos muy diferentes para cada uno de los dos estados de espín. A continuación, manteniendo esta coordenada fija, se realizan varias optimizaciones de la geometría del sistema para

distintos valores de dicha coordenada. Esta operación se realiza para los dos estados de espín en cuestión, de manera que al representar la energía se obtienen dos secciones unidimensionales a través de las SEPs, que se cruzan en un punto.

La ventaja de este método es que localiza un punto de cruce de manera más precisa que los métodos meramente cualitativos antes mencionados. Sin embargo, la principal desventaja es que computacionalmente es un método caro, ya que requiere múltiples optimizaciones de geometrías en ambas SEPs. Además, tampoco pueden extraerse resultados cuantitativos muy fiables, puesto que el punto de cruce obtenido son realmente dos puntos, ya que describe energías de dos estados con configuraciones optimizadas por separado en dos SEPs, dónde sólo se puede garantizar que una coordenada es igual.

Localización del Punto de Cruce de mínima Energía

Cuando se desea un resultado preciso, es posible localizar directa y exactamente el punto de mínima energía donde dos SEPs de diferente espín se cruzan. Este punto se conoce como punto de cruce de mínima energía (*Minimum-Energy Crossing Point, MECP*).

Diversos grupos han descrito métodos para encontrar MECPs, todos ellos se basan en la minimización de un gradiente generalizado, derivado de las energías y gradientes de las dos SEPs, como por ejemplo el siguiente:

$$g = \alpha(V_1 - V_2)(g_1 - g_2) + g_1 - h(g_1 \cdot h)$$

donde α es una constante arbitraria, V_1 y V_2 son los potenciales de cada SEP, g_1 y g_2 los gradientes correspondientes, y h es un vector unidad paralelo a $(g_1 - g_2)$.

Además de proporcionar la energía del punto de cruce, con este método se obtiene una cantidad de información estructural considerable, incluyendo por supuesto la geometría más favorable en que se da el cambio de espín. Los gradientes en las dos SEPs son paralelos en el MECP, y definen una única dirección que es análoga al vector de transición de las reacciones adiabáticas. ^[17-20]

3.6. Análisis topológico de la densidad electrónica

Las metodologías antes descritas están basadas, bien en la teoría de orbitales moleculares (métodos *ab initio*), o bien en la teoría del funcional de la densidad (DFT), y nos permiten obtener soluciones de la ecuación de Schrödinger bastante precisas, a partir de las cuales podemos obtener la función de onda y por tanto conocer la distribución de la densidad electrónica. Así pues, estos métodos facilitan el estudio de las reacciones químicas, es decir, de las geometrías de los puntos estacionarios y la estabilidad de las moléculas implicadas en las mismas. Sin embargo, aspectos tan importantes como las propiedades de los átomos dentro de la entidad molecular o los enlaces entre éstos, no quedan reflejados en la información aportada por los métodos descritos hasta ahora. El análisis de la función de onda o de la densidad electrónica serían las herramientas necesarias para resolver esta limitación. El hecho de que la función de onda carezca de sentido físico y no pueda medirse experimentalmente, pone de manifiesto la importancia del concepto de densidad electrónica, que es una función que se puede medir, tiene una interpretación muy clara y existe en el espacio real. La obtención de la densidad electrónica parte de la integración del cuadrado de la función de onda sobre todas las coordenadas espaciales y de espín de los electrones, de modo que se obtiene una función llamada *densidad de probabilidad* $P(r)$, que tiene el significado físico de informar sobre la probabilidad de encontrar un

electrón. Si seguidamente esta densidad se multiplica por el número de electrones N que la componen, se obtiene la densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$. Esta función proporciona las bases fundamentales para entender el enlace, ya que los electrones son los responsables de que los núcleos se mantengan unidos en una molécula. La *Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas* (*Quantum Theory of Atoms in Molecules, QTAIM*) y la *Función de Localización Electrónica* (*Electron Localization Function, ELF*) permiten el análisis de la distribución de la densidad electrónica.

Existen distintas maneras de representar la densidad electrónica: mapas de contorno de dos dimensiones, mapas de relieve y representaciones en 3D. La representación más extendida de la densidad electrónica es el mapa de contorno, donde se muestra la densidad electrónica en uno de los planos que intersectan la molécula mediante líneas que unen aquellos puntos que poseen la misma densidad. Aunque este mapa puede proporcionar información muy detallada, está restringido a la elección del plano que intersecta. Un ejemplo de mapa de contorno es el que se muestra en la Figura 3.6.1., perteneciente a la molécula de formaldehído en el plano que contiene todos los átomos.

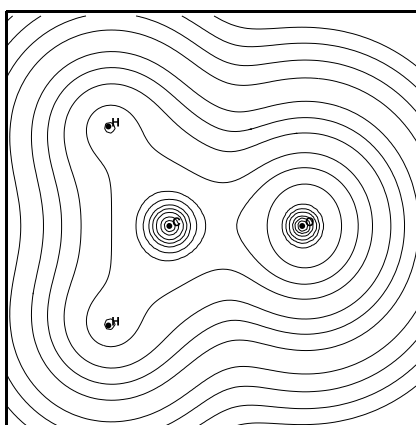


Figura 3.6.1 - Mapa de contorno de la densidad electrónica en el plano molecular del formaldehído

3.6.1. Teoría cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM)

En principio no es obvio marcar los límites que separan unos átomos de otros en el espacio molecular, pero una separación topológica basada en $\rho(\mathbf{r})$ posibilita esta delimitación. La atracción electrostática entre núcleos y electrones hace que $\rho(\mathbf{r})$ presente máximos en las posiciones cercanas a los núcleos. Estos puntos máximos se denominan atractores. Cada punto del espacio conecta con un único atractor si se trazan los caminos de máxima pendiente, de manera que, a través de las líneas del vector gradiente, se pueden agrupar todos los puntos entre sí en función del atractor con el cual estén conectados. El vector gradiente es un vector que muestra el camino de máxima variación del campo escalar analizado, en este caso de la densidad electrónica. Si se trazan los caminos de gradiente de modo que se dirijan en la dirección creciente de $\rho(\mathbf{r})$, éstos se originarán en el infinito y terminarán en los átomos. Estos caminos únicamente se cruzan en el núcleo y son siempre perpendiculares a la isosuperficie del campo escalar en cuestión. Cada núcleo actúa como atractor para una serie de caminos de gradiente, que constituyen lo que se denomina la cuenca del atractor. Las cuencas no se solapan y el vector gradiente divide la molécula en regiones atómicas separadas, es decir, define la frontera de cada átomo distribuyendo la densidad electrónica de la molécula, tal como se muestra en la Figura 3.6.2.

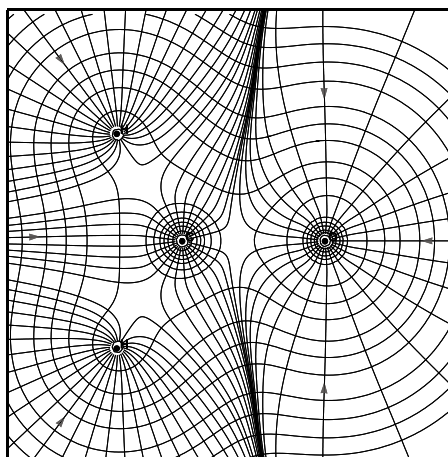


Figura 3.6.2 - Mapa de gradiente de $\rho(\mathbf{r})$ para el formaldehído. Las líneas se originan en el infinito y se dirigen hacia las regiones de alta densidad, de modo que terminan en los núcleos. La acumulación de estas líneas manifiesta donde se encuentran las fronteras interatómicas

Las fronteras entre dos regiones poseen la característica de que el vector gradiente no la cruza, por lo que se denominan superficies de flujo cero. En las superficies de flujo cero hay puntos especiales en los que el gradiente se anula, denominados puntos críticos (PC). Estos puntos críticos se caracterizan por su matriz Hessiana de segundas derivadas espaciales.

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial y^2} & \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial z \partial x} & \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial z \partial y} & \frac{\partial^2 \rho(\mathbf{r})}{\partial z^2} \end{pmatrix}$$

Si se procede a la diagonalización de esta matriz, de los elementos de la diagonal resultantes se extraen los valores propios, que reciben el

nombre de curvaturas. Cada valor propio corresponde a un vector propio, que representa la dirección de la curvatura. La nomenclatura más utilizada para clasificar los puntos críticos consiste en utilizar dos índices enteros para cada punto, escritos en la notación (r,s) . El rango, r , se define como el número de curvaturas o valores propios no nulos, y la firma, s , como la diferencia entre el número de curvaturas o valores propios positivos y negativos. Una clasificación de los puntos críticos que se pueden encontrar para una función de tres dimensiones es:

- $(3, -3)$: presenta un máximo en tres direcciones, y se corresponde con un máximo local de los atractores, es decir, representa a los *núcleos*.
- $(3, -1)$: presenta un máximo en un plano y un mínimo en la dirección perpendicular a éste. Es un punto localizado entre átomos enlazados, y se denomina *punto crítico de enlace* (*Bond Critical Point, BCP*).
- $(3, +1)$: presenta un máximo y dos mínimos. Representa los *puntos críticos de anillo*.
- $(3, +3)$: presenta un mínimo local en las tres direcciones. Es un *punto crítico de caja*.

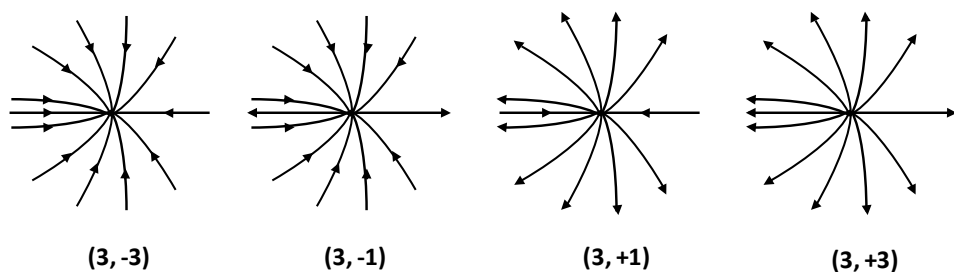


Figura 3.6.3 – Clasificación de los puntos críticos para funciones de tres dimensiones: máximos $(3, -3)$, mínimos $(3, +3)$ y dos tipos de puntos de silla ($(3, -1)$ y $(3, +1)$). Las flechas representan los caminos de gradiente y su dirección. En un máximo todos los caminos de gradiente se dirigen hacia el máximo, mientras que en un mínimo todos los caminos de gradiente se dirigen hacia afuera del mínimo. En un punto de silla un conjunto de caminos de gradiente se dirigen hacia el punto de silla, mientras que otro conjunto se dirigen hacia fuera del punto de silla

Los puntos críticos en los que nos vamos a centrar son principalmente los máximos, (3, -3), y los puntos críticos de enlace, (3, -1). Así, en cada punto (3, -1) el gradiente genera un par de trayectorias que acaban en dos atractores o núcleos (3, -3). Estas trayectorias marcan un camino que une dos núcleos, correspondiente a un enlace y que se llama *línea de interacción atómica*. En esta línea, el punto (3, -1) constituye el mínimo de $\rho(r)$. El conjunto de líneas de enlace, atractores y puntos críticos forman el llamado *grafo molecular*. Todo grafo molecular cumple la ecuación de Poincaré-Hopf:

$$n - b + r - c = 1 \quad (3.6.1)$$

donde n es el número de núcleos, b el número de puntos críticos de enlace, r el número de puntos críticos de anillo y c el número de puntos críticos de caja.

Una vez localizados los enlaces existentes en una molécula, se puede extraer información sobre un enlace en una molécula a partir del análisis topológico de la densidad electrónica. Tomando un punto perfectamente definido en la superficie interatómica entre dos átomos como es el punto crítico de enlace, se puede obtener información, tanto cualitativa como cuantitativa, muy útil acerca de la naturaleza del enlace. Estos son los parámetros que han sido considerados en este trabajo para ese fin:

· *Densidad del punto crítico de enlace (ρ_b)*: es la medida de la cantidad de carga electrónica acumulada en el punto crítico de enlace. Cuanto mayor es este parámetro, mayor es la fuerza de un enlace y menor es su longitud, de modo que permite discernir el orden de enlace. Aunque cabe puntualizar que otros factores, como por ejemplo las cargas atómicas, también pueden influir.

· *Energía de la densidad electrónica (E_d)*: es la media de energía de un único electrón (E_e) multiplicada por el número de electrones y se define como

$$\begin{aligned} E_e(r) &= -K(r) \\ E_d(r) &= NE_e \end{aligned} \quad (3.6.2)$$

donde $K(r)$ es la energía cinética electrónica.

Los enlaces estables se caracterizan por valores negativos de este parámetro.

Además de la información que se puede obtener sobre un enlace en una molécula, derivada del análisis topológico de la densidad electrónica, un estudio completo del enlace requiere la descripción de los pares electrónicos, tanto los enlazantes como los no enlazantes. Con esta finalidad se han estudiado otros parámetros:

· *Laplaciana*: es una función de la densidad electrónica, llamada *laplaciana* ($\nabla^2\rho(r)$) y que se construye a partir de derivadas parciales segundas:

$$\nabla^2\rho = \frac{\partial^2\rho}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\rho}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\rho}{\partial z^2} \quad (3.6.3)$$

En esencia, la laplaciana proporciona la medida de la curvatura de la función en tres dimensiones, indicando la concavidad o convexidad a través de valores negativos o positivos respectivamente. La laplaciana de cualquier campo escalar muestra las regiones donde dicho campo está localmente concentrado o disperso. Si se asume que la densidad electrónica es el campo escalar en cuestión, la laplaciana presenta un valor negativo en las zonas donde se concentra la carga, estas zonas se

conocen como *valence shell charge concentration región* (VSCC), y en ellas la carga ejerce un efecto estabilizante, característico de interacciones covalentes. En cambio, un valor positivo de la laplaciana significa que se trata de una zona de dispersión de carga, llamada *valence shell charge depletion region* (VSCD), lo que implica una desestabilización del sistema, fenómeno propio de interacciones de carácter iónico.

En la Figura 3.6.4 se aprecian las zonas de concentración de carga caracterizadas con línea continua, mientras que las zonas de dispersión de carga se representan con línea discontinua. También quedan plasmados los caminos de enlace que pasan por los BCP y las líneas correspondientes a las superficies interatómicas. En torno al átomo de oxígeno, se aprecian dos zonas de concentración de carga correspondientes a los pares de electrones no compartidos.

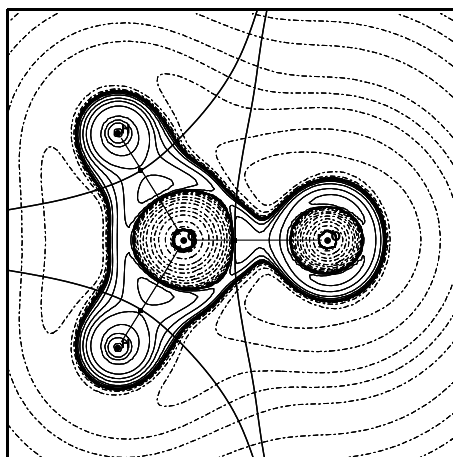


Figura 3.6.4 – Mapa de contorno de $\nabla^2\rho(r)$ para el formaldehído. Las zonas de concentración de carga están caracterizadas con línea continua, mientras que las zonas de dispersión de carga quedan dibujadas con línea discontinua. También se representan los caminos de enlace que pasan por los BCE y las líneas correspondientes a las superficies interatómicas. En torno al oxígeno se aprecian dos zonas de concentración de carga correspondientes a los pares de electrones no compartidos

Los modelos de Lewis y VSEPR (valence shell electron pair repulsion) asumen que los pares electrónicos están totalmente localizados con los espines antiparalelos en una molécula. Sin embargo, la laplaciana muestra que los electrones se localizan en capas esféricas, donde existe una región esférica de concentración de carga y una región esférica de dispersión de carga. El dominio de cada electrón es esférico y está completamente deslocalizado en las capas. Así pues, el concepto de laplaciana de la densidad electrónica revela las limitaciones de estos modelos más antiguos y permite explicar ciertas propiedades de las moléculas no consistentes con dichos modelos, mejorando nuestro conocimiento sobre geometría molecular.

3.6.2. Función de localización electrónica (ELF)

Becke y Edgecombe^[21] introducen la función de localización electrónica (ELF), descrita como la eficiencia de repulsión de Pauli en un punto dado del espacio molecular. Es decir, describen la localización electrónica por comparación de la movilidad del hueco de Fermi en un sistema de capa cerrada con la movilidad de un gas de electrones homogéneo que se toma como referencia. De este modo, la diferencia entre ambas movilidades en un punto determinado indica la posibilidad de encontrar o no un par de electrones apareados. Posteriormente surgen interpretaciones alternativas para describir la localización electrónica, así pues Savin et al^[22, 23] describen esta función en términos de energía cinética local en exceso debida a la repulsión entre electrones de spin paralelos, de manera que la función ELF queda generalizada para cualquier función de onda y, en particular, para la exacta. De este modo, la función ELF proporciona bases rigurosas para el análisis de la función de onda y del enlace en moléculas y cristales. En 1994, Silvi y Savin^[24] propusieron usar el gradiente de la función ELF para representar el análisis topológico en el

espacio molecular, siguiendo con el espíritu de la teoría de Bader de Átomos en Moléculas (AIM). Así pues, se creó un modelo matemático que describe el enlace y permite estudiar su evolución a través de un proceso reactivo.^[25]

La función ELF se interpreta como una medida de la probabilidad de encontrar en un punto del espacio dos electrones con espín antiparalelo y mismos números cuánticos, o lo que es lo mismo, apareados. Su expresión formal es la siguiente:

$$\eta(r) = \frac{1}{1 + \left(\frac{D(r)}{D_h(r)} \right)^2} \quad (3.6.4)$$

Según la interpretación de Becke y Edgecombe, $D(r)$ y $D_h(r)$ representan la curvatura de la densidad de pares electrónicos de igual espín para el sistema en cuestión y para un gas de electrones homogéneo de la misma densidad, respectivamente. Según Savin, $D(r)$ representa el exceso local de energía cinética debido a la repulsión de Pauli y $D_h(r)$ es la energía cinética de un gas de electrones homogéneo de densidad $\rho(r)$.

Dicha función está acotada entre 0 y 1, tomando valores próximos a 1 cuando el apareamiento es máximo. Los puntos en los que la función presenta máximos locales se denominan atractores que, siguiendo con la interpretación de Silvi et al, se localizan en los puntos donde el gradiente de la función ELF es máximo. Este modelo resulta análogo al QTAIM en el sentido de que si se sigue el camino marcado por el gradiente, se alcanzan los atractores y se establece una división del espacio molecular. Así pues, las trayectorias del gradiente de la función ELF dividen el espacio molecular en cuencas. Atendiendo al tipo de carga (electrones de

capas internas o de valencia) que contienen las cuencas ELF, se puede establecer una clasificación. Es decir, dichas cuencas se pueden dividir en dos grupos: las de **core** (o nucleares) y las de **valencia**. Las cuencas de valencia se dividen a su vez en otros dos grupos: las no enlazantes (o **monosinápticas**) y las enlazantes (o **disinápticas**). Cabe puntualizar que existe un convenio de colores a la hora de representar gráficamente las cuencas, véase la Figura 3.6.5.

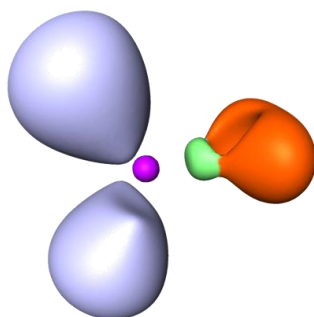


Figura 3.6.5 – Representación de ELF para el formaldehído. El color magenta se utiliza para los electrones internos (core), el rojo para las cuencas monosinápticas (electrones no compartidos), el verde para las cuencas disinápticas (electrones enlazantes), y por último las cuencas hidrogenadas se representan en color gris.

Esta clasificación de los atractores o cuencas, permite distinguir entre los electrones que participan en interacciones y aquellos que son de valencia (que se corresponden con los pares solitarios del esquema clásico de Lewis). La definición de dominios de localización de los atractores asociados a una función $\eta(r) = f$, constituye una herramienta de visualización muy eficiente, de manera que permite la representación de las cuencas que cumplen la condición $ELF \succ f$.

Desde un punto de vista cuantitativo, una cuenca, cualquiera que sea su naturaleza (de core o de valencia), se caracteriza por su población electrónica, que se define como la integral de la densidad de carga en el

volumen de la cuenca. Llamando Ω_i al volumen de una cuenca y $\rho(r)$ a la densidad electrónica de un electrón en un punto r , la población media de la cuenca viene dada por

$$\bar{N}(\Omega_i) = \int_{\Omega_i} \rho(r) dr \quad (3.6.5)$$

La población de una cuenca nos proporciona una información muy valiosa a la hora de estudiar un sistema, y es un dato muy significativo en los procesos reactivos, ya que permite hacer un seguimiento de la densidad electrónica en el transcurso de la reacción.

3.7. Métodos teóricos de representación del solvente

El estudio de las reacciones químicas mediante la aplicación de métodos computacionales precisos es una herramienta complementaria a la experimentación química que puede dar respuesta a un elevado número de cuestiones con un nivel apropiado de detalle.

El estudio de sistemas que contienen metales de transición ha supuesto todo un reto incluso para los métodos *ab initio*, ya que dichos sistemas son estructural y electrónicamente mucho más complejos y diversos que los sistemas orgánicos, y por lo tanto su descripción es difícil si sólo se dispone de un conjunto de parámetros universales. Como se ha dicho anteriormente, en la última década ha habido avances computacionales significativos en esta dirección. Se ha logrado que los resultados obtenidos con la metodología DFT para sistemas con metales de transición sean precisos y con un coste computacional comparable al de los métodos *ab initio*, gracias al desarrollo de funcionales híbridos, así

como a la obtención de una función de onda de partida mejorada. [26-28] Estos avances hacen posible modelar con éxito sistemas con un número de átomos en torno a 200 con esta metodología.

Pero un factor adicional que cabe tener en cuenta en el estudio de reacciones químicas de interés biológico, es la inclusión de los efectos del medio en los cálculos computacionales. El medio en que transcurre una reacción, bien sea un disolvente (agua, disolventes orgánicos, líquidos iónicos, etc.) o un entorno proteico, puede modificar la estructura y reactividad de los compuestos.

En esta tesis doctoral se ha realizado un estudio de la reactividad de un sistema que contiene un metal de transición, el hierro, y además, en una fase de la investigación se han tenido en cuenta los efectos del solvente, en este caso agua, sobre dicha reactividad. Para llevar a cabo este estudio, se han utilizado dos métodos diferentes: el PCM (*Polarizable Continuum Model*) o Modelo de Continuo Polarizable y la metodología híbrida QM/MM (*Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*). Ambas metodologías tienen en común que centran la atención en la descripción de la molécula de soluto, representada por su función de estado cuántica, y en cómo ésta se ve afectada por el disolvente, que se trata de manera clásica, como una perturbación en el hamiltoniano molecular del soluto.

3.7.1. PCM

La metodología PCM pertenece a la clase de modelos de solvatación del continuo polarizable. Ésta utiliza la *aproximación del campo medio*, es decir, asume que el promedio de las propiedades obtenidas en los distintos cálculos cuánticos (uno por cada configuración del disolvente) puede sustituirse por el resultado de un único cálculo en el que se introduce la

“perturbación promedio” del disolvente. De esta manera se reduce de forma considerable el número de cálculos cuánticos a realizar.

En este método, la molécula del soluto se sitúa en una cavidad formada por una serie de esferas solapadas, centradas en los núcleos del soluto y con radios proporcionales a los correspondientes radios de Van der Waals. La presencia del soluto en la cavidad induce una polarización en el medio circundante, que se traduce en una densidad de carga aparente.

El hamiltoniano molecular se modifica por la presencia del solvente del modo:

$$\hat{H}_{disolución} = \hat{H}_{vacío} + V_{soluto-solvente}$$

donde $\hat{H}_{vacío}$ es el hamiltoniano del soluto aislado y el operador $V_{soluto-solvente}$ depende linealmente de la función de onda del soluto y se expresa en términos de las cargas de polarización aparentes distribuidas sobre la superficie de la cavidad del soluto.^[29-32]

3.7.2. Método QM/MM

3.7.2.1. Definición de las diferentes regiones

La metodología híbrida QM/MM se puede clasificar dentro de los métodos discretos de representación del solvente, ya que éste se representa de manera discreta, como un conjunto de moléculas con una determinada disposición espacial en torno a la molécula de soluto.

La mecánica molecular no está adaptada al estudio de las reacciones químicas, ya que la creación o ruptura de los enlaces químicos es difícil de reproducir por un potencial efectivo. Por otro lado, la mecánica

cuántica no puede estudiar en la práctica sistemas de cierto tamaño en su totalidad, como proteínas, ácidos nucleicos o sistemas en solución. Afortunadamente, los efectos cuánticos (formación/ruptura de enlaces, transferencia de carga, polarización, etc.) son habitualmente locales y es posible estudiar el problema de reactividad en entornos complejos mediante una aproximación mixta que combina la mecánica cuántica (QM) y la mecánica molecular (MM). De este modo, las moléculas de disolvente se consideran como entidades clásicas individuales y el efecto de cada una de ellas se introduce en el hamiltoniano molecular del soluto, es decir, se usan potenciales de diferente precisión para tratar diferentes regiones del sistema. [33-40]

El uso de esta metodología requiere, en primer lugar, establecer la división del sistema objeto de estudio en tres partes, tal como se observa a continuación en la Figura 3.7.1.:

- región QM: tratada mediante métodos de la mecánica cuántica.
- región MM: tratada mediante campos de fuerza de la mecánica molecular clásica.
- condiciones de contorno.

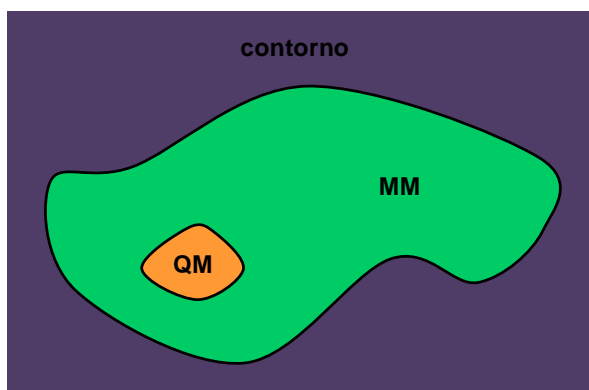


Figura 3.7.1 – Representación esquemática de la división de un sistema en la región QM, región MM y condiciones de contorno

La **región QM** debe incluir todos los átomos que intervienen directamente en la reacción química, es decir, los átomos implicados en la formación y ruptura de enlaces. En el caso del sistema analizado en esta tesis doctoral, la parte QM está constituida por todos los átomos que no forman parte del solvente. Los átomos de esta región se representan como electrones y núcleos, y las superficies de energía potencial asociadas a éstos se rigen por la aproximación de Born-Oppenheimer,^[1] de modo que la energía es función de la posición de los núcleos.

La **región MM** contiene el resto de los átomos del sistema. Éstos se describen mediante la mecánica clásica, y sus interacciones se determinan mediante funciones de energía potencial empírica, de modo que dichos átomos no pueden estar implicados en la formación o ruptura de enlaces químicos. Los átomos MM interactúan con los átomos QM participantes del proceso reactivo, así que sus movimientos e interacciones influyen sobre los átomos QM, y viceversa.

Como consecuencia de la imposibilidad de llevar a cabo el estudio de un sistema infinito, es necesario aplicar una serie de restricciones que constituyen las denominadas **condiciones de contorno**.

El cálculo de las energías y fuerzas del sistema se obtiene por resolución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. Teniendo en cuenta la partición del sistema en tres regiones distintas, se construye un Hamiltoniano efectivo (H_{ef}) que está compuesto por la suma de cuatro términos: uno para los átomos de la región QM, otro para los átomos de la región MM, un tercer término para describir las interacciones entre estas dos regiones (QM/MM) y un último término para las condiciones de contorno.

$$\hat{H}_{\text{ef}} = \hat{H}_{\text{QM}} + \hat{H}_{\text{MM}} + \hat{H}_{\text{QM/MM}} + \hat{H}_{\text{CC}} \quad (3.7.1)$$

Cabe matizar también que la función de onda del sistema depende, por un lado, de las coordenadas de los electrones y núcleos QM (r y R_α , respectivamente) y, por otro, de las posiciones de los átomos MM (R_M). Esta función de onda proporciona la descripción de la densidad electrónica de la región cuántica, considerando el efecto que sobre ésta ejercen los átomos del entorno.

De este modo, la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo, teniendo en cuenta las particularidades del sistema, quedaría así:

$$\hat{H}_{\text{ef}} \Psi(r, R_\alpha, R_M) = E(R_\alpha, R_M) \Psi(r, R_\alpha, R_M) \quad (3.7.2)$$

La energía se calcula para cada posición de los núcleos QM y de los átomos MM, mediante un proceso autoconsistente (SCF, self consistent field), con la ecuación:

$$E = \frac{\langle \Psi | \hat{H}_{\text{ef}} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} \quad (3.7.3)$$

Profundizando en los diferentes componentes del Hamiltoniano efectivo tenemos:

- **Hamiltoniano de la región cuántica (\hat{H}_{QM}):** su expresión equivale a la que tendría el subsistema de la parte cuántica (la parte implicada en el proceso químico) en vacío. Este hamiltoniano viene determinado por la metodología computacional elegida, bien se trate de un método semi-empírico (AM1, PM3, etc.), un método *ab initio* (HF, MP2, etc.) o un método basado en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), explicados en apartados anteriores.

El tratamiento de la parte cuántica se ha venido realizando durante mucho tiempo con métodos semiempíricos (el más común AM1);^[37, 41-46] aunque debido a las limitaciones de esta metodología, actualmente se han empezado a desarrollar programas que permiten hacer estudios QM/MM en los que la parte cuántica queda descrita mediante métodos *ab initio*^[34, 47, 48] o DFT.^[48-51] La metodología utilizada en esta tesis doctoral para la realización de los cálculos QM/MM, en la que la parte cuántica se describe a nivel DFT, ha sido implementada por nuestro grupo de investigación, y se basa en una separación de las coordenadas totales del sistema en dos partes: el espacio de control y el espacio complementario. Los átomos implicados en el proceso reactivo se incluyen en el espacio de control, mientras el resto de átomos definen el espacio complementario. La optimización de las estructuras se lleva a cabo acoplando las iteraciones sobre estos dos subespacios: a cada paso de optimización (mediante el cálculo de la Hessiana) del espacio de control, se relaja el resto del sistema siguiendo el vector gradiente. En la Figura 3.7.2 se muestra una representación esquemática de cómo funciona esta metodología. Esta estrategia ‘a dos niveles de cálculo’ ha sido implementada en la librería de DYNAMO en Fortran90.^[52] El cálculo en que está implicada la parte del espacio de control hace uso del programa Gaussian03, y las iteraciones de optimización de dicho subsistema siguen el algoritmo de BAKER.^[53, 54] La parte del espacio complementario utiliza el programa DYNAMO, que tiene incorporada la rutina de minimización L-BFGS-B.^[55]

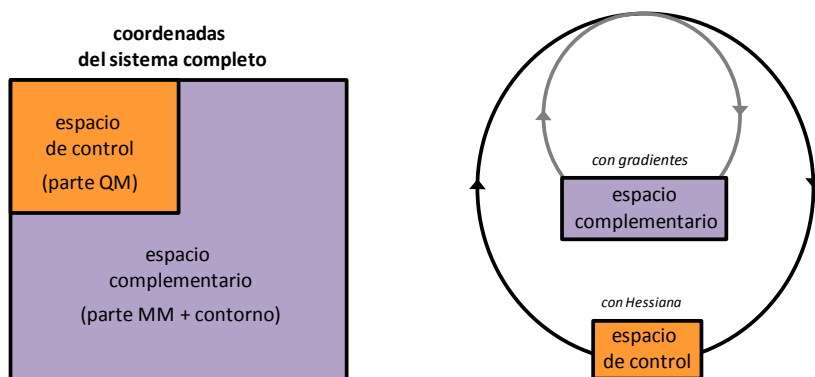


Figura 3.7.2 – Representación esquemática del acoplamiento de las iteraciones de las coordenadas del espacio de control y del espacio complementario

• **Hamiltoniano de la región tratada con mecánica clásica (\hat{H}_{MM}):** viene determinado por las posiciones de los átomos que constituyen esta región, mientras que no depende explícitamente de las coordenadas de los electrones y los núcleos de los átomos QM, de manera que este término puede ir fuera de la integral (ecuación 3.7.3). Este hamiltoniano da lugar a la energía de la región tratada clásicamente, que tiene las siguientes contribuciones:

$$E_{MM} = E_{enlace} + E_{no\ enlace} \quad (3.7.4)$$

$$E_{enlace} = E_{enlaces} + E_{ángulos} + E_{diedros} \quad (3.7.5)$$

$$E_{no\ enlace} = E_{electrostática} + E_{Van\ der\ Waals}$$

Para determinar la energía MM, se utiliza un campo de fuerzas mecánico-molecular donde, cuando las interacciones son a corta distancia (término *enlazante*), los átomos se representan por unión con enlaces, ángulos y diedros, parametrizados con constantes de fuerza que determinan la conectividad de las moléculas. En cambio, cuando los átomos interactúan a larga distancia (término *no enlazante*), éstos se

representan como cargas parciales y esferas de Van de Waals centradas en los átomos. Los términos no enlazantes no se calculan para todos los pares de átomos, sino que se calculan únicamente entre átomos pertenecientes a distintas moléculas, o en el caso de estar en una misma molécula, para átomos separados por al menos tres enlaces.

La forma genérica de los enlaces y ángulos suele ser de tipo cuadrático (correspondiente a un potencial armónico), mientras que la de los diedros es de tipo periódico. Para los términos electrostáticos y de Van der Waals se suelen utilizar las expresiones de Coulomb y Lennard-Jones, respectivamente. Al conjunto de estas funciones y parámetros se le denomina campo de fuerza. El campo de fuerza y la parametrización que se utiliza en los cálculos realizados en esta tesis doctoral están basados en los campos de fuerza TIP3P^[56] y OPLS-AA^[57, 58].

- **Hamiltoniano de interacción QM/MM ($\hat{H}_{QM/MM}$):** corresponde al hamiltoniano que describe las interacciones entre los átomos tratados cuánticamente (QM) y los átomos tratados clásicamente (MM).

En aquellos casos en que no hay enlaces covalentes entre los átomos de las regiones QM y MM, este hamiltoniano está compuesto por la suma de un término electrostático y de otro término de Lennard-Jones, y puede escribirse así:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{QM/MM} = & -\sum_i \sum_m Q_m \hat{O}_{electron}(r_i, r_m) + \sum_q \sum_m Z_q Q_m \hat{O}_{core}(r_q, r_m) \\ & + 4\sqrt{\epsilon_{qq}\epsilon_{mm}} \left\{ \left(\frac{\sqrt{\sigma_{qq}\sigma_{mm}}}{r_{qm}} \right)^{12} - \left(\frac{\sqrt{\sigma_{qq}\sigma_{mm}}}{r_{qm}} \right)^6 \right\} \end{aligned} \quad (3.7.6)$$

En esta ecuación, los subíndices i y q se refieren a los electrones y los núcleos de la región QM, respectivamente, y m a los átomos de la región MM. Z_q es la carga del core de los átomos QM, Q_m es la carga de los átomos MM, r es un vector de la coordenada de posición, ϵ y σ son parámetros de las interacciones Lennard-Jones, y r_{qm} es la distancia entre los átomos cuánticos (q) y clásicos (m). Los operadores $\hat{o}_{\text{electron}}$ y \hat{o}_{core} determinan las interacciones electrostáticas entre los electrones y los núcleos de los átomos QM y las cargas de los átomos MM.

- **Hamiltoniano de las condiciones de contorno (\hat{H}_{CC}):** este término se introduce para compensar la aproximación realizada al truncar el sistema. Los sistemas en fases condensadas tienen una extensión infinita, lo que hace que su simulación resulte impracticable, de modo que es necesario seleccionar una parte pequeña del sistema para ser estudiada en detalle (un pequeño volumen de un líquido o un cristal, una molécula de una proteína solvatada, etc.) y, posteriormente, se utilizan metodologías que permitan imitar el resto del sistema o del medio.

Existen diferentes aproximaciones para simular la continuidad de las fases condensadas, entre las más comunes se encuentra la aplicación de *Condiciones periódicas (Periodic Boundary Conditions, PBC)*. Esta metodología consiste en tomar una pequeña parte del sistema (que contenga la parte QM y MM) y ubicarla en una celda unidad, de modo que la fase condensada se modela por infinitas repeticiones periódicas de la celda unidad en las tres dimensiones del espacio. Lo más común es que la celda unidad, para el caso tridimensional, sea cúbica. En la Figura 3.7.3.a se representa una celda unidad, y en la Figura 3.7.3.b se muestra un diagrama de la aplicación de condiciones periódicas.

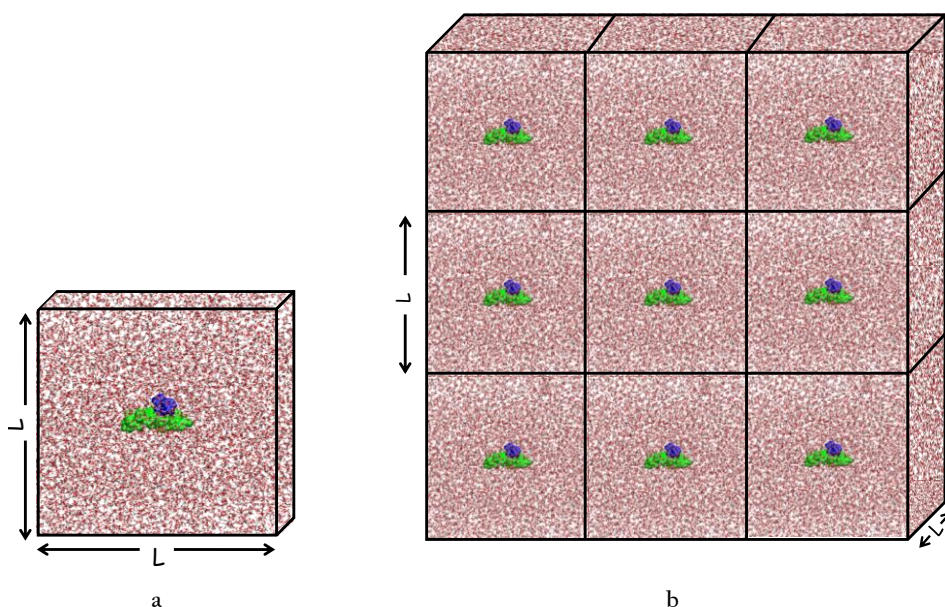


Figura 3.7.3 – Aplicación de condiciones periódicas en tres dimensiones. La celda central, con una longitud de arista L , se replica en ambas direcciones

Los inconvenientes que presenta esta técnica son, por un lado, que se está asumiendo que el sistema es periódico, aunque en sistemas reales ese orden no está presente. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en la simulación se estará invirtiendo mucho tiempo en el solvente.

Otra aproximación utilizada para tratar fases condensadas es utilizar **condiciones de contorno deformables**,^[59] que consiste en aplicar un potencial de tipo radial a determinados átomos de las moléculas del disolvente (por ejemplo al oxígeno en el caso del agua), de manera que dichas moléculas pueden seguir reorientándose, pero su traslación está restringida. Este potencial aumenta drásticamente con la distancia respecto al origen al cual se aplica, garantizando así que sean las moléculas de las capas más externas las que sufran una fuerza mayor, llegando incluso a congelar la posición de los átomos afectados. Con ello se intenta evitar la aparición de efectos colaterales no deseados, que

modificarían la densidad del medio y, por tanto, la representatividad del modelo. Entre estos fenómenos están la evaporación (cuando las moléculas externas se alejan, “escapando” del resto) o tensión superficial (si por el contrario colapsan sobre las capas de moléculas internas, disminuyendo el volumen final del sistema).

Conocidos los detalles de las diferentes componentes del Hamiltoniano efectivo para el sistema total, la energía total puede expresarse como la suma de los valores de cada término en el Hamiltoniano:

$$E = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} + E_{CC} \quad (3.7.7)$$

Aplicando la integral de la ecuación 3.7.3, y teniendo en cuenta que las partes QM y MM se pueden expresar separadamente en las condiciones de contorno, la energía queda así:

$$E = \frac{\langle \Psi | \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{CC(QM)} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle} + E_{MM} + E_{CC(MM)} \quad (3.7.8)$$

3.7.2.2. Distancias de corte

En el seno de un sistema en fase condensada el número de interacciones no enlazantes es muy elevado si se estudia la contribución de todos los pares de átomos, lo que ha conducido a que numerosas líneas de investigación se centren en el desarrollo de algoritmos que evalúen estos términos de una manera eficiente, tanto para sistemas periódicos como no periódicos. El uso de estos algoritmos puede resultar difícil de implementar y computacionalmente muy costoso, sobre todo en sistemas periódicos, de modo que normalmente se aplican métodos alternativos,

como el uso de *distancias de corte o truncamiento (cutoff)*. Es muy común el uso de *cutoff esféricos*, de manera que únicamente se consideran las interacciones entre los átomos que quedan dentro del volumen de la esfera considerada, donde el radio de la esfera (r_c) es la distancia de corte o *cutoff*. Una particularidad de estos métodos es el modo en que el corte se efectúa, para ello existen diversos modelos:

▪ Modelo truncado

Consiste en despreciar toda interacción que esté a distancias superiores que la de corte. Este es un modelo muy sencillo, pero el truncamiento se efectúa de manera muy abrupta, lo que puede conllevar problemas de discontinuidad de la función de la energía y sus derivadas, ya que los movimientos de los átomos situados en la frontera del *cutoff* pueden hacer que el número de interacciones varíe.

▪ Modelo suavizado

Disminuye progresivamente el valor de la energía de interacción al ir aumentando la distancia, hasta una distancia a partir de la cual no se consideran las interacciones.

Dentro de este modelo hay diferentes tipos de funciones:

La *función de conmutación (switch function)*, que utiliza dos radios de corte, uno interno (r_{on}) y otro externo (r_{off}). A distancias menores del radio de corte interno la energía de interacción es constante, mientras que ésta va decayendo a las distancias comprendidas entre ambos radios de corte. Las interacciones a distancias superiores al radio externo no se tienen en cuenta. Su expresión es la que se muestra a continuación:

$$f_{\text{SWITCH}}(r) = \begin{cases} 1 & r \leq r_{\text{on}} \\ \frac{(r_{\text{off}}^2 - r^2)^2 (r_{\text{off}}^2 + 2r^2 - 3r_{\text{on}}^2)}{(r_{\text{off}}^2 - r_{\text{on}}^2)^3} & r_{\text{on}} < r \leq r_{\text{off}} \\ 0 & r > r_{\text{off}} \end{cases}$$

La función de desplazamiento (*shift function*) es otro ejemplo de funciones suavizadas. Ésta únicamente está definida por un radio de corte y, la energía de interacción varía (disminuye) al ir aproximándose la distancia al radio de corte, siendo despreciable a partir de este radio de corte. La expresión de esta función es:

$$f_{\text{SHIFT}}(r) = \begin{cases} \left[1 - \left(\frac{r}{r_c} \right)^2 \right]^2 & r \leq r_c \\ 0 & r > r_c \end{cases}$$

En la Figura 3.7.4 se muestra la representación gráfica de estas funciones.

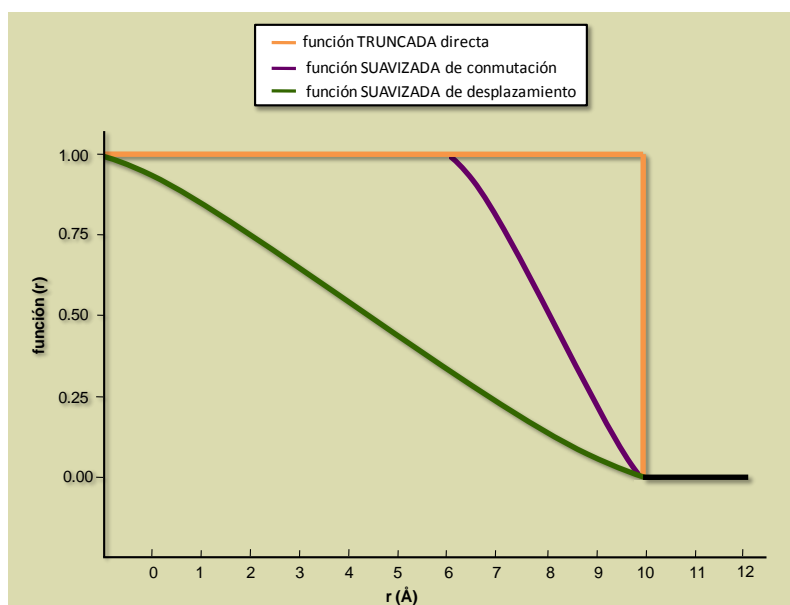


Figura 3.7.4 – Representación de funciones truncadas en función de la distancia

La estrategia óptima a la hora de realizar los cálculos es usar distancias de corte tan pequeñas como sea posible, ya que el cálculo será menos costoso cuanto menor sea el tamaño de esta distancia, y que a su vez proporcionen un tratamiento adecuado de las interacciones no enlazantes.

Las ventajas de usar distancias de corte son el bajo coste computacional y la facilidad de implementación. Como inconveniente cabe decir que una mala elección del tamaño de la celda unidad, así como de las distancias a partir de las cuales se obvian las interacciones del tipo no enlazante, pueden introducir errores en los cálculos. La condición que se debe cumplir para que la aproximación sea válida es que la distancia de corte de las interacciones no enlazantes sea menor o igual a la mitad de la longitud de la arista de la celda unidad. En caso contrario, se pueden producir efectos de anisotropía en el sistema.

Referencias

- [1] M. Born, R. Oppenheimer, *Annalen Der Physik* **1927**, *84*, 0457.
- [2] P. Atkins, Paula, J., *Physical Chemistry for Life Science*, Ed. Oxford, New York, **2005**.
- [3] J. Bertran, Branchadell, V., Moreno, M., Sodupe, M., *Química Cuántica*, Editorial Síntesis, Madrid, **2000**.
- [4] J. Bertran, Núñez, J., *Química Física I, Vol. I*, Barcelona, **2002**.
- [5] J. Espinosa, *Superficies de energía potencial y reactividad química*, Ed. Asturprint, Oviedo, **2001**.
- [6] I. N. Levine, *Química Cuántica*, Ed. Prentice Hall, Madrid, **2001**.
- [7] A. Szabo, Ostlund, N.S., *Modern Quantum Chemistry*, Ed. Dover, New York, **1996**.
- [8] D. Young, *Computational Chemistry*, Ed. J.W. Sons, Canada, **2001**.
- [9] C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry*, Ed. Wiley, West Sussex (England), **2002**.
- [10] P. Atkins, Friedman, R., *Molecular Quantum Mechanics*, Ed. Oxford, New York, **2005**.
- [11] J. M. Seminario, Politzer, P., *Modern Density Functional Theory: A Tool for Chemistry, Vol. II*, Ed. Elsevier, New Orleans, **1995**.
- [12] I. N. Levine, *Físicoquímica*, Ed. Mc Graw-Hill, Madrid, **2004**.
- [13] P. J. Hay, W. R. Wadt, *Journal of Chemical Physics* **1985**, *82*, 270.
- [14] J. N. Harvey, R. Poli, K. M. Smith, *Coordination Chemistry Reviews* **2003**, *238*, 347.
- [15] D. Schroder, S. Shaik, H. Schwarz, *Accounts of Chemical Research* **2000**, *33*, 139.
- [16] C. Zener, *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **1932**, *137*, 696.
- [17] J. L. Carreon-Macedo, J. N. Harvey, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5789.
- [18] J. N. Harvey, M. Aschi, H. Schwarz, W. Koch, *Theoretical Chemistry Accounts* **1998**, *99*, 95.

- [19] T. R. Cundari, *Computational organometallic chemistry*, Ed. Marcel Dekker, Inc. ed., New York, 2001.
- [20] J. N. Harvey, *Physical Chemistry Chemical Physics* 2007, 9, 331.
- [21] A. D. Becke, K. E. Edgecombe, *Journal of Chemical Physics* 1990, 92, 5397.
- [22] A. Savin, A. D. Becke, J. Flad, R. Nesper, H. Preuss, H. G. Vonschnering, *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1991, 30, 409.
- [23] A. Savin, O. Jepsen, J. Flad, O. K. Andersen, H. Preuss, H. G. Vonschnering, *Angewandte Chemie-International Edition in English* 1992, 31, 187.
- [24] B. Silvi, A. Savin, *Nature* 1994, 371, 683.
- [25] X. Krokidis, V. Goncalves, A. Savin, B. Silvi, *Journal of Physical Chemistry A* 1998, 102, 5065.
- [26] R. G. P. W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, 1989.
- [27] T. Ziegler, *Chemical Reviews* 1991, 91, 651.
- [28] G. Vacek, J. K. Perry, J. M. Langlois, *Chemical Physics Letters* 1999, 310, 189.
- [29] B. Mennuci, Tomasi, J., , *Chemical Physics* 1996, 106, 5151.
- [30] S. Miertus, Scrocco, E., Tomasi, J., *Chemical Physics* 1981, 55, 117.
- [31] S. Miertus, Tomasi, J., *Chemical Physics* 1982, 65, 239.
- [32] F. J. Olivares del Valle, Tomasi, J., *Chemical Physics* 1991, 150, 139.
- [33] A. Warshel, M. Levitt, *Journal of Molecular Biology* 1976, 103, 227.
- [34] U. C. Singh, P. A. Kollman, *Journal of Computational Chemistry* 1986, 7, 718.
- [35] P. A. Bash, M. J. Field, M. Karplus, *Journal of the American Chemical Society* 1987, 109, 8092.
- [36] M. J. Field, P. A. Bash, M. Karplus, *Journal of Computational Chemistry* 1990, 11, 700.
- [37] J. L. Gao, *Journal of Physical Chemistry* 1992, 96, 537.
- [38] M. J. Field, *A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
- [39] M. J. Field, M. Albe, C. Bret, F. Proust-De Martin, A. Thomas, *Journal of Computational Chemistry* 2000, 21, 1088.

- [40] M. Eichinger, P. Tavan, J. Hutter, M. Parrinello, *Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 10452.
- [41] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 3902.
- [42] J. L. Gao, X. F. Xia, *Science* **1992**, *258*, 631.
- [43] M. Oliva, O. Dideberg, M. J. Field, *Proteins-Structure Function and Genetics* **2003**, *53*, 88.
- [44] M. Roca, S. Marti, J. Andres, V. Moliner, M. Tunon, J. Bertran, A. H. Williams, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 7726.
- [45] S. Ferrer, J. J. Ruiz-Pernia, I. Tunon, V. Moliner, M. Garcia-Viloca, A. Gonzalez-Lafont, J. M. Lluch, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2005**, *1*, 750.
- [46] N. Kanaan, S. Marti, V. Moliner, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3704.
- [47] F. Maseras, K. Morokuma, *Journal of Computational Chemistry* **1995**, *16*, 1170.
- [48] R. V. Stanton, L. R. Little, K. M. Merz, *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 17344.
- [49] D. Q. Wei, D. R. Salahub, *Chemical Physics Letters* **1994**, *224*, 291.
- [50] I. Tunon, M. T. C. MartinsCosta, C. Millot, M. F. RuizLopez, J. L. Rivail, *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17*, 19.
- [51] R. A. Friesner, M. H. Baik, B. F. Gherman, V. Guallar, M. Wirstam, R. B. Murphy, S. J. Lippard, *Coordination Chemistry Reviews* **2003**, *238*, 267.
- [52] S. Marti, V. Moliner, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2005**, *1*, 1008.
- [53] J. Baker, A. Kessi, B. Delley, *Journal of Chemical Physics* **1996**, *105*, 192.
- [54] J. Baker, *Journal of Computational Chemistry* **1997**, *18*, 1079.
- [55] R. H. Byrd, P. H. Lu, J. Nocedal, C. Y. Zhu, *Siam Journal on Scientific Computing* **1995**, *16*, 1190.
- [56] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926.
- [57] W. L. Jorgensen, J. Tiradorives, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 1657.
- [58] J. Pranata, S. G. Wierschke, W. L. Jorgensen, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 2810.

-
- [59] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *Journal of Computational Chemistry* **1983**, *4*, 187.

Capítulo 4. Resultados y discusión

Existe un principio que se resiste a toda información, que se resiste a toda investigación, que nunca deja de mantener al hombre en una ignorancia perenne. . . Es el principio de desestimar lo que no se ha investigado.

Herbert Spencer

Resultados y discusión

4.1. Estudio de la descomposición de la artemisinina utilizando el radical hidrógeno como agente reductor	118
4.1.1. Reacción de reducción del enlace endoperóxido	122
4.1.2. Reacción de formación de 3 α -hidrodeoxi-artemisinina (6).....	134
4.1.3. Reacción de formación de la deoxiartemisinina (8).....	140
4.1.4. Reacción de formación del tetrahidrofurano 12.....	151
4.1.5. Reacción de formación del O-radical 14	155
4.1.5. Reacción de formación del dioxodecanodial 15.....	162
4.1.6. Perfiles globales de reacción.....	170
Conclusiones.....	175
4.2. Estudio topológico con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(OH)₂ dihidratado como agente reductor	178
4.2.1. Formación de los C-radicales y estudio de la competitividad entre la artemisinina y el O ₂	182
4.2.2. Análisis topológico de las reacciones de obtención de los C-radicales	186
4.2.3. Análisis topológico de las reacciones de obtención de los productos finales.....	201
4.3. Estudio de la descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(II)-hemo como agente reductor	223
4.3.1. Estados electrónicos de los modelos del grupo hemo	226
4.3.2. Estudio de la reactividad entre la artemisinina y el Fe(II)-hemo ...	231
4.3.3. Estudio comparativo de la descomposición de la artemisinina utilizando diferentes modelos del grupo hemo	240
Conclusiones.....	243
4.4. Introducción del solvente en el estudio de la descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(II)-hemo-H₂O como agente reductor.....	245
4.4.1. Estudio con el método PCM	246
4.4.2. Estudio con el método QM/MM	249
Conclusiones.....	260
Referencias.....	262

Como se ha comentado en los capítulos anteriores, existe cierto debate en torno al mecanismo de acción de la artemisinina contra la malaria. Se ha demostrado que el puente endoperóxido que esta molécula posee es esencial para la actividad contra el parásito de la malaria, puesto que los derivados de la artemisinina que no contienen este grupo son inactivos.^[1, 2] Diversos estudios han sugerido que su modo de acción tiene lugar en dos pasos. En primer lugar se produce la ruptura homolítica del puente endoperóxido, catalizada por hierro intraparásítico o por el grupo hemo, de modo que se generan radicales libres inestables. En un segundo paso, los radicales libres generados impiden la polimerización del grupo hemo y la consecuente formación del pigmento de la malaria, o bien alquilan proteínas específicas del parásito de la malaria, produciendo su muerte.^[3, 4]

En la Tesis Doctoral que aquí se presenta se ha llevado a cabo el estudio de los mecanismos de las reacciones implicadas en estos procesos desde un punto de vista teórico. Para ello, se han utilizado diversos modelos moleculares y se han aplicado aquellas metodologías más apropiadas para el tratamiento de dichos modelos.

El mecanismo de reacción de la descomposición de la artemisinina, inducida por un compuesto de Fe(II), propuesto a partir de datos experimentales, se muestra en la Figura 4.1. Hay bastante consenso respecto a este mecanismo, que resulta de unificar diferentes procesos que explican la formación de los productos finales detectados experimentalmente.^[5] La detección de diferentes productos, radicalarios o no, cuando la artemisinina se hace reaccionar con compuestos de Fe(II) aporta información sobre el mecanismo.

El primer paso es la ruptura del enlace endoperóxido de la artemisinina (molécula 1 en la Figura 4.1) por reacción con especies que contienen Fe(II). Esta ruptura inicial puede darse mediante dos mecanismos paralelos, dando lugar bien al radical centrado en el oxígeno 1 (especie 2), o bien al radical centrado en el oxígeno 2 (especie 3).^[6] Seguidamente, el O-radical 2, por transferencia intramolecular de un radical hidrógeno, da lugar al radical secundario 4 centrado en el átomo C4. Por otra parte, el O-radical 3 puede experimentar una ruptura del enlace C3-C4, dando lugar al radical primario II, centrado también en el átomo C4.^[7] Mediante diferentes etapas de reacción, el C-radical 4 da lugar a productos neutros como el hidroxí-dioxolano (6) y el dioxolano (8); mientras que el C-radical II es precursor del acetal tetrahidrofurano 12. A partir del O-radical 3 se proponen otras rutas alternativas que dan lugar a otros intermedios de reacción, como el O-radical 14 o el producto 15.

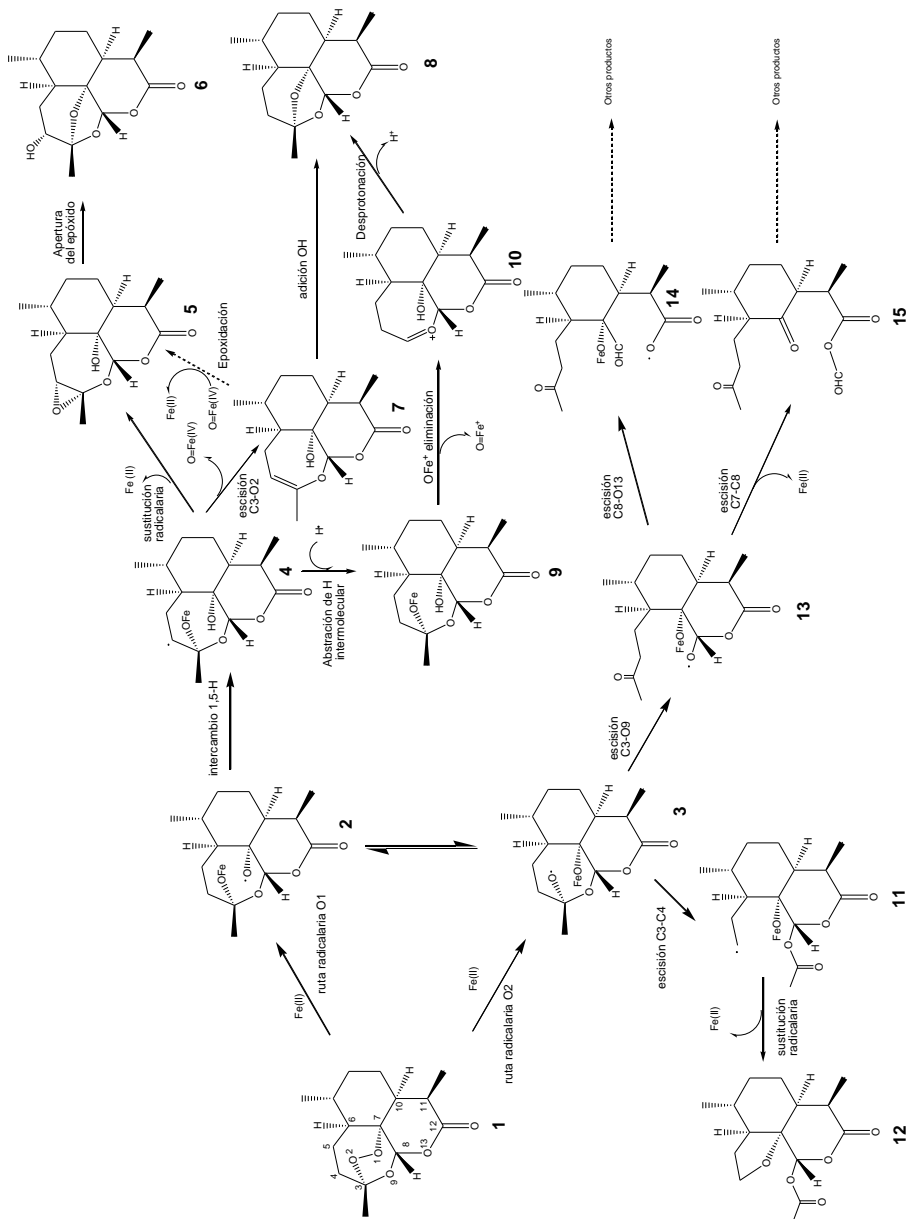


Figura 4.1 – Mecanismo propuesto para la descomposición de la artemisinina

Los resultados obtenidos en los diferentes apartados de este capítulo se pueden relacionar con resultados experimentales relevantes, de los cuales se tiene conocimiento. Éstos se pueden sintetizar en los siguientes puntos:

- En estudios donde se intenta la reducción electroquímica de la artemisinina en ausencia de aditivos o con NaI (en disolución de THF-ácido acético), ésta no tiene lugar; mientras que si se utilizan agentes reductores que contienen Fe(II) se dan las reacciones que llevan a la obtención de los productos 6, 8 y 12.^[8] De estos resultados se deduce que en presencia de una cantidad catalítica de un compuesto ferroso la reducción de la artemisinina tiene lugar de un modo relativamente rápido.
- Los experimentos de Resonancia Electrónica Paramagnética (EPR, *Electron Paramagnetic Resonance*) constituyen una prueba experimental de la formación de radicales centrados en átomos de carbono cuando se hace reaccionar la artemisinina (y otros derivados de ésta) con compuestos de Fe(II). Por un lado ha sido detectado el C-radical primario 11, que posteriormente da lugar al producto 12. Por otro lado, se ha detectado el C-radical secundario 4, que es precursor del epóxido 5 y los productos finales 6 y 8. En cambio, los ensayos realizados para tratar de detectar los radicales centrados en átomos de oxígeno han resultado infructuosos, ya que sólo se han obtenido señales correspondientes a C-radicales. Esto sugiere que la conversión de los intermedios O-radicales en C-radicales, por fragmentación o por reorganización de sus átomos, transcurre de manera extremadamente rápida, con una constante de velocidad mayor de 10^7 s^{-1} .^[9]
- La descomposición del enlace endoperóxido activada por FeBr₂ (en disolvente THF y a temperatura ambiente), da lugar a la formación de los

productos **6**, **8** y **12** en la proporción 1:6:1. Así mismo estos ensayos reflejan la inestabilidad intrínseca del epóxido **5**, ya que su formación es difícil de demostrar. Sin embargo, el hecho de que la molécula **6**, de la cual **5** es precursora, sea detectada se ha considerado una prueba de que **5** es un intermedio de reacción.^[10,11]

- El mecanismo que da lugar al intermedio **7** implica la formación de una especie en la que el hierro presenta una valencia elevada, Fe(IV)=O, cuya formación ha sido justificada *in vitro*. Sin embargo, el alqueno **7** no ha sido detectado experimentalmente.^[11]

- Llevando a cabo la reacción de reducción con FeSO₄ en disolución acuosa de CH₃CN (CH₃CN/H₂O 1:1, pH=4), se detectan dos productos principalmente (**6** y **12**) obtenidos en proporciones del 67% y 25%, respectivamente; mientras que el epóxido **5** se identifica como componente minoritario (1-2%), demostrándose de nuevo su inestabilidad.^[5]

- Se ha demostrado la alquilación del grupo hemo por parte de C-radicales derivados de la descomposición de la artemisinina mediante estudios de marcaje isotópico. Experimentalmente se han detectado aductos hemo-artemisinina, los cuales podrían aniquilar al parásito por la interrupción de la polimerización del grupo hemo en hemozoína. El C-radical **II** es la especie que se presenta como agente alquilante del grupo hemo en mayor medida.^[12-15]

- En glóbulos rojos infectados por *Plasmodium falciparum* incubados con artemisinina se ha observado la alquilación de proteínas específicas del parásito, lo que se explica mediante la formación de C-radicales.^[16-18]

4.1. Estudio de la descomposición de la artemisinina utilizando el radical hidrógeno como agente reductor

Se ha realizado un estudio teórico para describir todos los pasos del mecanismo propuesto para la descomposición de la artemisinina, con la finalidad de revelar detalles de las estructuras, estabilidad y procesos implicados en el mecanismo postulado.

En un primer momento el mecanismo se ha analizado utilizando, en lugar de iones hierro, el radical hidrógeno ($\cdot\text{H}$) como agente activante del enlace endoperóxido de la artemisinina. Con el radical hidrógeno se representa la transferencia de un electrón en el medio fuertemente ácido de la vacuola del parásito.^[19, 20]

En esta parte de la investigación se ha procedido utilizando en primer lugar un sistema modelo de la artemisinina relativamente simple, un biciclo 1,2,4-trioxano llamado 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano, mostrado en la Figura 4.1.1.

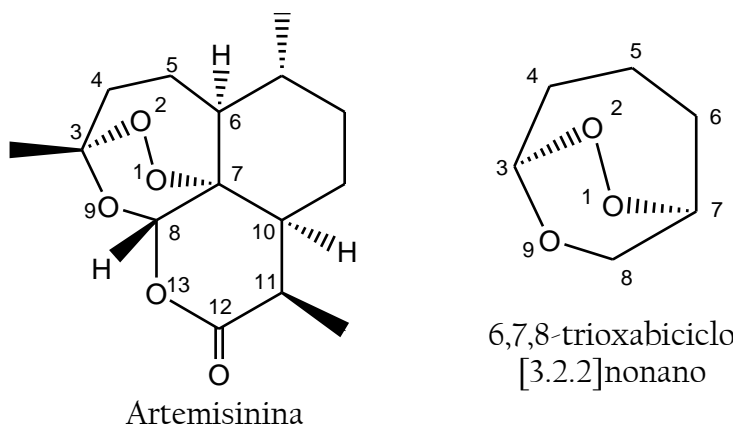


Figura 4.1.1 – Modelos moleculares con la numeración de los átomos

En base a este modelo y utilizando un método bastante simple, el de Hartree-Fock (HF) con una base 3-21G (HF/3-21G), se han localizado y caracterizado (mediante un análisis vibracional), todos los puntos estacionarios (mínimos y estructuras de transición) implicados en el mecanismo de reacción planteado. Se ha mejorado después la metodología de cálculo, empleándose la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) con tres parámetros de Becke (B3)^[21] y el funcional de intercambio con correlación no local de Lee-Yang-Parr (B3LYP)^[22, 23] con la base 6-31G(d,p). Con esta metodología, las geometrías de los puntos estacionarios y el análisis de las superficies de energía potencial resultan más precisos. Cabe mencionar que, en un principio, la simplificación del modelo está basada en estudios anteriores donde se postula que la actividad de la artemisinina se atribuye al biciclo 6,7,8-trioxabicyclo [3.2.2]nonano.^[3, 24] Además, la efectividad de endoperóxidos de segunda generación, que son moléculas más simples constituidas por el anillo de seis miembros que contiene al grupo endoperóxido, es comparable a la de los derivados de la artemisinina.^[2, 25]

En la Figura 4.1.2 se muestra el esquema del mecanismo de la artemisinina adaptado al modelo del trioxano, empleando un radical hidrógeno como agente iniciador de la reacción. En determinados casos, para explicar algunas etapas del mecanismo de reacción, es necesario ampliar el modelo con un ciclo más (mostrado en color rojo en esta figura), ya que los átomos implicados en esos procesos pertenecen a este nuevo ciclo.

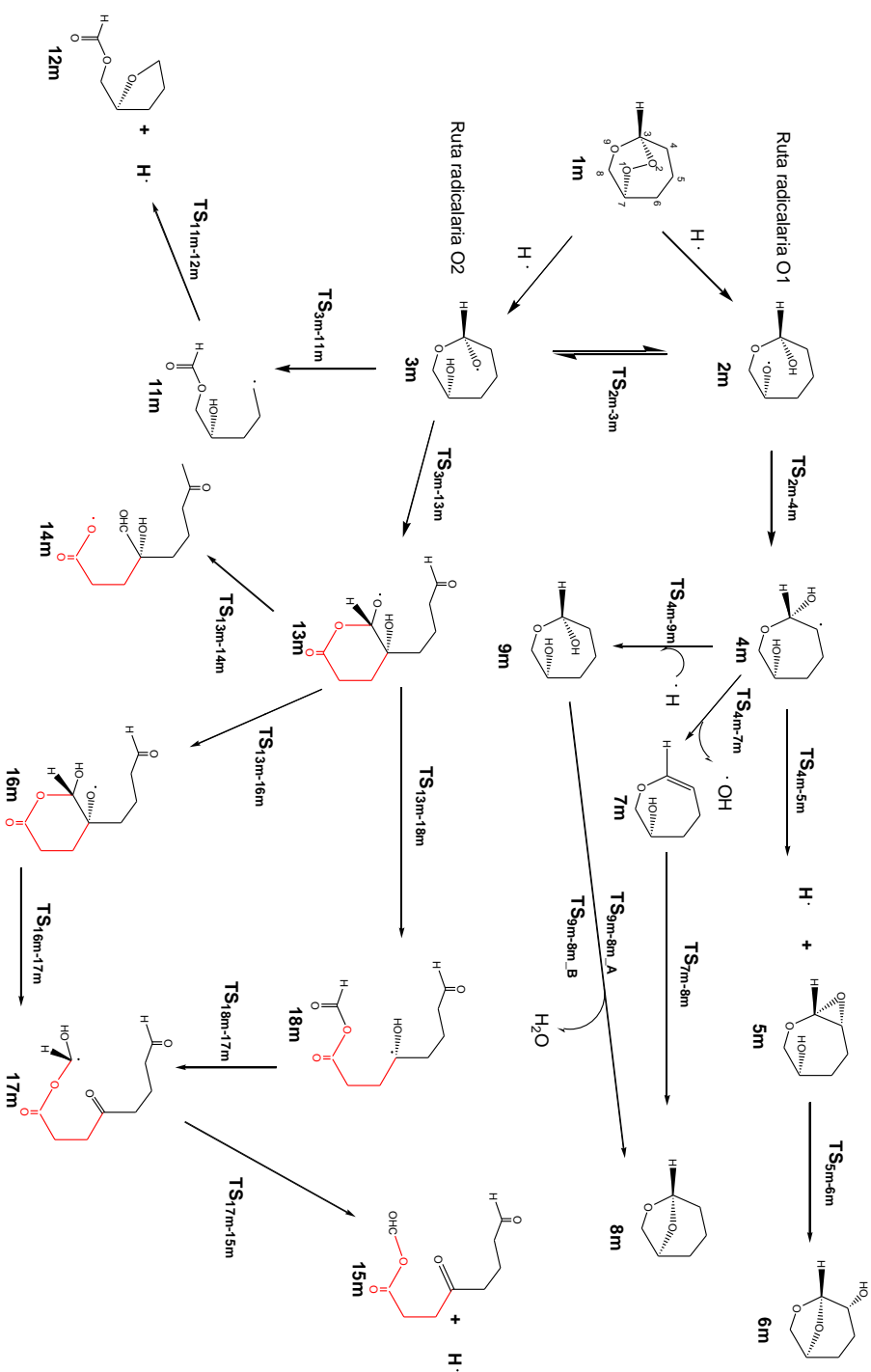


Figura 4.1.2 – Esquema de las reacciones estudiadas con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

Además, con el fin de comprobar la idoneidad del modelo bicíclico, se ha procedido a realizar el estudio del mecanismo de reacción utilizando la artemisinina (**1** en la Figura 4.1). Con el modelo ampliado, se llevan a cabo los cálculos con las mismas metodologías que para el modelo más simple: HF/3-21G y B3LYP/6-31(d,p).

En este primer apartado del capítulo de resultados se presenta el estudio del mecanismo de descomposición de la artemisinina para los dos modelos moleculares, el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y la artemisinina, y cada uno de ellos analizado con dos metodologías computacionales diferentes, Hartree-Fock con base 3-21G y B3LYP con base 6-31(d,p). El agente reductor considerado en todos estos estudios es el radical hidrógeno. El objetivo es, por un lado establecer una comparación entre los dos métodos de cálculo utilizados y, por otro lado, comprobar la validez de la utilización del modelo simplificado.

Una vez expuestos los modelos y métodos utilizados, los resultados obtenidos se van a dividir en diferentes subapartados referentes a distintos fragmentos del mecanismo. En cada subapartado se discutirán, en primer lugar, los resultados obtenidos con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano, y posteriormente, aquéllos obtenidos con la artemisinina. Con el fin de simplificar la lectura de esta Tesis Doctoral, la argumentación de los resultados se va a realizar únicamente para los obtenidos con el método B3LYP. Los resultados logrados con el método HF con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2] nonano se van a mostrar en las tablas y figuras, pero sólo se harán aquellos comentarios más relevantes concernientes a estos resultados. De los resultados alcanzados con el modelo de la artemisinina se muestran únicamente aquéllos obtenidos con el método B3LYP.

4.1.1. Reacción de reducción del enlace endoperóxido

En primer lugar se ha estudiado la reacción entre **1** y el radical hidrógeno, mostrada en la Figura 4.1.3. En el primer paso, el radical $H\cdot$ se enlaza a uno de los oxígenos del puente peroxídico y queda un electrón libre en el otro oxígeno, dando como resultado dos posibles radicales centrados átomos de oxígeno (**2** y **3**). Se han hallado las estructuras de transición de este primer paso, TS_{1-2} y TS_{1-3} . De ahora en adelante, los mecanismos de reacción derivados de la formación de **2**, se dirá que transcurren a través de la ruta del radical-O1, puesto que en **2** el electrón desapareado se encuentra sobre el átomo de oxígeno 1. Análogamente, los mecanismos que transcurren a partir de **3**, pertenecerán a la ruta del radical-O2 por las mismas razones.

En una segunda etapa, **2** y **3** pasan a una conformación más estable, en la que se forman enlaces de hidrógeno con el oxígeno radicalario. Estos radicales **2'** y **3'** se pueden interconvertir uno en otro por migración del $\cdot H$ de un oxígeno al otro. La estructura de transición entre estos radicales ($TS_{2'-3'}$) también ha sido localizada, lo que constituye la primera evidencia teórica de que las rutas que transcurren a través de los radicales centrados en O1 y O2 se pueden interconectar, confirmando así las hipótesis previas al respecto.

Cada uno de estos radicales centrados en átomos de oxígeno (O-radicales), da lugar a dos C-radicales distintos. Así, a partir de **2**, pasando por el TS_{2-4} que implica una transferencia 1,5 de hidrógeno, se obtiene el radical secundario **4**, centrado en el átomo C4; mientras que a partir de **3'**, por ruptura de un enlace C-C, a través del $TS_{3'-II}$, se obtiene el radical primario **II**, también centrado en el átomo C4.

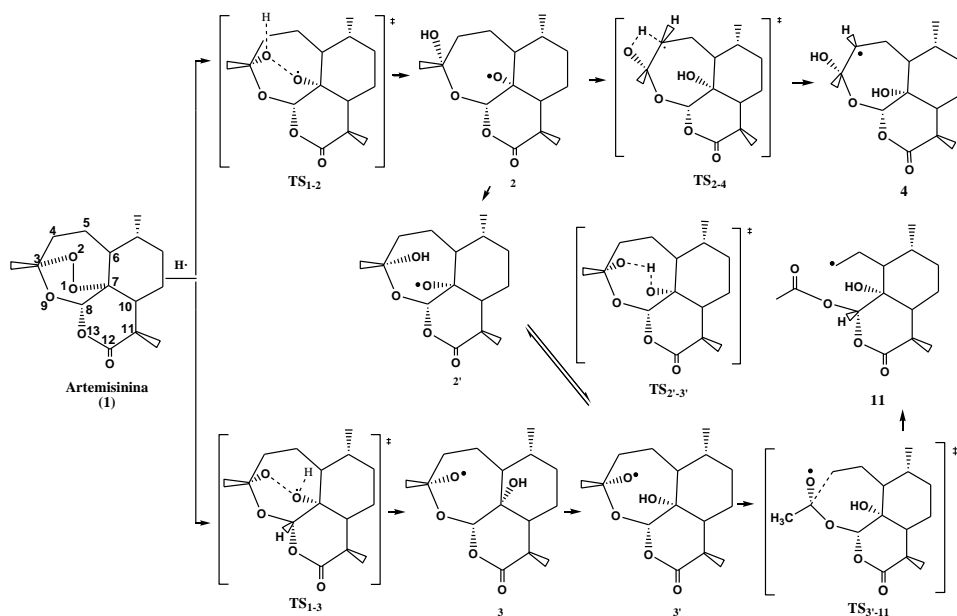


Figura 4.1.3 - Mecanismo de reacción de reducción del puente endoperoxido de la artemisinina

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

Los perfiles de energía de dichos procesos para el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano obtenidos con las metodologías Hartree-Fock y B3LYP se muestran en la Figura 4.1.4. La energía de referencia tomada es la suma de las energías de **1m** y un radical hidrógeno.

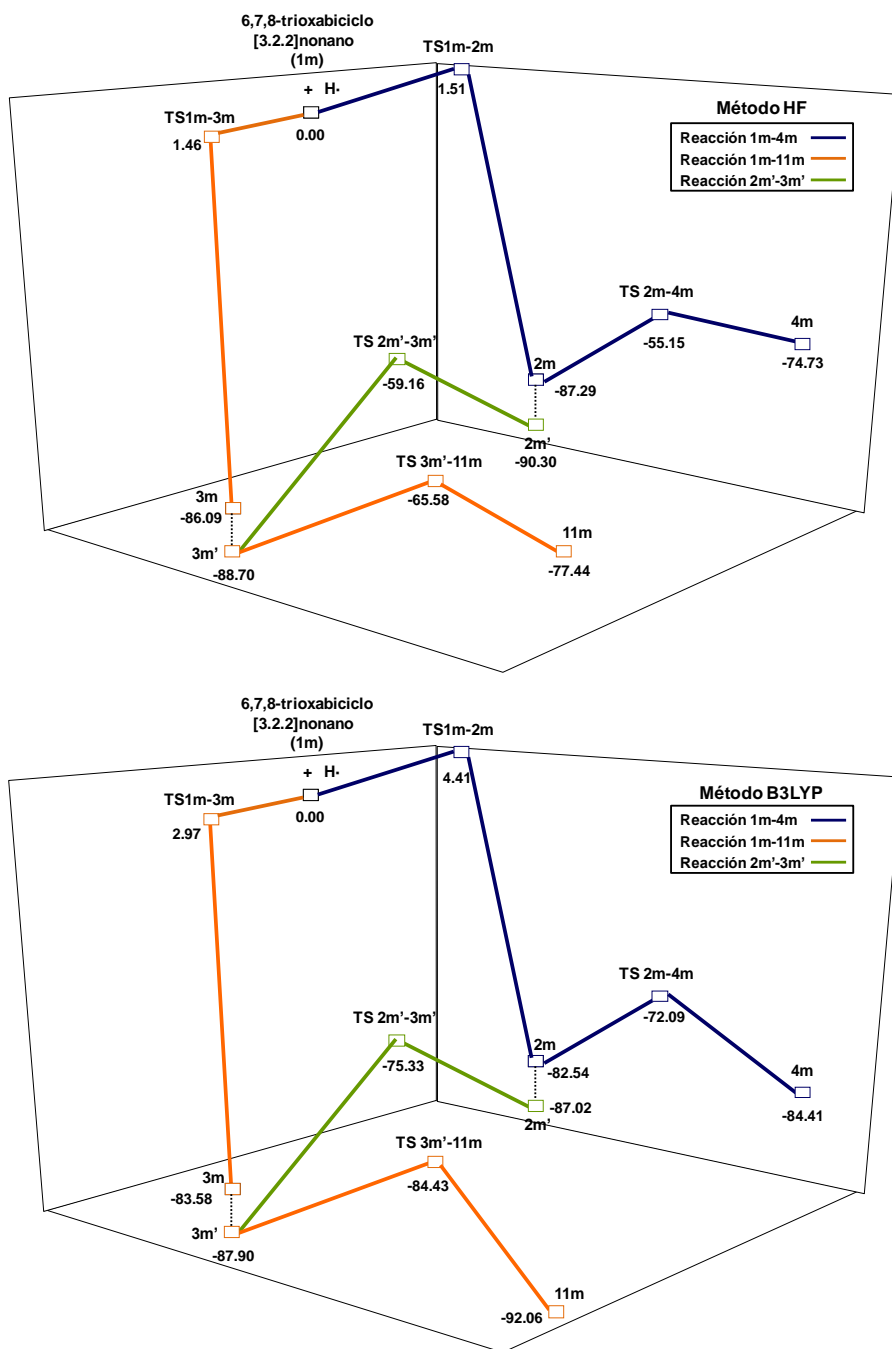


Figura 4.1.4 - Perfil de energía de la reacción de reducción del puente endoperóxido del 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano para ambos métodos de cálculo

Con el método B3LYP, la disminución de energía en la reacción que da **2m** a partir de **1m** es de casi 83 kcal/mol, y la energía de activación es de 4,4 kcal/mol. Para la reacción que va de **1m** a **3m**, la variación en la energía es muy parecida, disminuye alrededor de 84 kcal/mol. En este caso la barrera energética es un poco menor, de unas 3 kcal/mol. Posteriormente, **2m** y **3m** sufren un cambio conformacional en la posición del H del grupo hidroxilo formado, de manera que este H forma un enlace de hidrógeno con el O radicalario, estabilizándose las moléculas resultantes (**2m'** y **3m'**, respectivamente) unas 4,5 kcal/mol cada una. El paso que relaciona las dos rutas de reacción, donde **2m'** y **3m'** se interconectan, tiene asociada una barrera energética de casi 12 kcal/mol desde **2m'**. La formación del C-radical **4m** implica la disminución de energía de unas 2 kcal/mol respecto al O-radical **2m**, y tiene lugar a través de una barrera de energía de unas 10,5 kcal/mol. El otro C-radical **11m** se forma por disminución de 4 kcal/mol en la energía respecto a **3m**, pasando por una barrera energética de 3,5 kcal/mol. Según estos valores, la formación de **11m** es más favorable que la de **4m**, tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético. Gu y colaboradores han realizado un estudio teórico con la metodología B3LYP/6-31G(d) utilizando el sistema modelo del trioxano. Éstos obtienen que **4m** es 5,2 kcal/mol más estable que **2m** y que la barrera de energía es de 6,4 kcal/mol. Además, en dicho estudio **11m** es 12,2 kcal/mol más estable que **3m** y la barrera energética del proceso es de 6,5 kcal/mol. [24]

El estudio de estas mismas reacciones con la metodología HF también muestra el carácter altamente exotérmico del primer paso del mecanismo, tanto si transcurre por la ruta del radical-O1 como del radical-O2. Sin embargo, la formación de los C-radicales **4m** y **11m**, a diferencia de lo que ocurría con el método B3LYP, resulta endotérmica. No obstante no hay que olvidar que la aproximación HF es menos

precisa que la B3LYP, ya que descuida la correlación electrónica. En todos los pasos de reacción estudiados, las barreras de energía obtenidas con HF son mayores que las obtenidas con B3LYP.

El carácter altamente exotérmico del proceso de unión del radical H· a **1m** puede atribuirse a la disminución de la tensión del sistema, que pasa de ser una especie bicíclica a una monocíclica. Además, el enlace O-H que se forma compensa con creces la ruptura del enlace O1-O2 del endoperóxido. Este hecho constata el carácter irreversible de la reacción.

En la Tabla 4.1.1 se muestran los valores del operador S^2 para las moléculas estudiadas, así como de la densidad de espín de los átomos seleccionados. Los datos que están entre paréntesis corresponden a los resultados obtenidos con B3LYP, mientras que el resto corresponden a los resultados HF. Los valores de S^2 demuestran que la metodología B3LYP es más adecuada para realizar cálculos con radicales que la HF (tienen un S^2 próximo a 0.75), ya que se observa mucha menos contaminación de espín y se describe estas especies como dobletes. De estos datos se deduce que, en las estructuras **2m** y **2m'**, el electrón desapareado se concentra en uno de los oxígenos que inicialmente formaban el puente endoperóxido, O1, mientras que en **3m** y **3m'** éste está ubicado en el otro oxígeno del puente, O2. En estos casos la densidad de espín del hidrógeno que activa la ruptura del enlace endoperóxido se reduce prácticamente a cero. En las estructuras de transición TS_{1m-2m} y TS_{1m-3m} , la densidad de espín se concentra en el átomo de H activador. Por su parte, la estructura de transición de interconversión entre los radicales **2m'** y **3m'**, tiene la densidad de espín repartida entre los oxígenos 1 y 2, siendo nula en el hidrógeno activador de la reacción. En TS_{2m-4m} la densidad de espín se reparte entre el C4 dador del hidrógeno y el O1 receptor, quedando localizada en el C4 en **4m**, tal como se pronosticaba. El reparto de la densidad de espín es más

desigual en el caso del $TS_{3m'-11m}$, ya que se encuentra deslocalizada entre el C4, que alberga gran parte de carga electrónica, y el O2. En $11m$ el electrón desapareado se encuentra ubicado en C4, como ocurre en $4m$.

Tabla 4.1.1- Valores del operador S^2 y de la densidad de espín para los átomos seleccionados de los puntos estacionarios que participan en la formación de los C-radicales $4m$ y $11m$

	S^2		S			S^2		S	
TS_{1m-2m}	0,9930	H	1,00(0,82)		$TS_{2m'-3m'}$	0,8039	O2	0,65(0,42)	
	(0,7739)	O1	0,50(0,19)			(0,7563)	O1	0,63(0,51)	
		O2	-0,50(-0,05)				H	-0,21(-0,03)	
$2m$	0,7563	O1	1,05(0,87)		TS_{2m-4m}	0,7962	C4	0,85(0,49)	
	(0,7533)	C7	-0,15(-0,05)			(0,7565)	O1	0,59(0,52)	
		H_{C7}	0,06(0,11)				Ht	-0,23(-0,04)	
$2m'$	0,7570	O1	1,06(0,73)		$4m$	0,7632	C4	0,85(0,98)	
	(0,7545)	C7	-0,15(-0,02)			(0,7538)	C5	-0,20(-0,07)	
		C8	0,03(0,14)				C3	-0,16(-0,05)	
						Hnt	-0,10(-0,04)		
TS_{1m-3m}	0,9893	H	1,00(0,84)		$TS_{3m'-11m}$	0,8788	C4	0,92(0,62)	
	(0,7705)	O2	0,49(0,18)			(0,7591)	O2	0,64(0,32)	
		O1	-0,49(-0,05)				C3	-0,44(-0,04)	
						C5	-0,12(-0,03)		
$3m$	0,7560	O2	1,04(0,79)		$11m$	0,7630	C4	0,92(1,05)	
	(0,7541)	C3	-0,14(-0,05)			(0,7538)	C5	-0,20(-0,07)	
		C4	0,06(0,14)				H_{C4}	-0,11(-0,05)	
						$H_{C4'}$	-0,10(-0,05)		
$3m'$	0,7563	O2	1,04(0,68)						
	(0,7548)	C3	-0,14(-0,04)						
		C4	0,07(0,20)						

En la Figura 4.1.5 se muestran las geometrías de los mínimos y estructuras de transición que explican cada uno de los pasos de reacción mencionados. Las distancias más significativas se indican tanto para los resultados obtenidos con el método HF como B3LYP, mostrándose para este segundo método entre paréntesis. Como puede observarse, con el método HF, las estructuras de transición en las que el radical H \cdot ataca a O2 o a O1, TS_{1m-2m} y TS_{1m-3m} respectivamente, presentan valores muy parecidos en las distancias de enlace O1-O2 y O1-H \cdot , 1,57 Å y 2,90 Å respectivamente. Con el método B3LYP, la distancia O1-O2 es la misma que la hallada con HF para ambas estructuras, pero en cambio, la distancia O-H \cdot es del orden de 1,70 Å, mucho menor que la calculada con el primer método. Tras el enlace del H \cdot a la molécula, la distancia O1-O2 de los radicales formados, 2m y 3m, aumenta, mientras que cuando éstos sufren el cambio conformacional, en 2m' y 3m' esta distancia disminuye un poco. La geometría del TS_{2m'-3m'} hallada con los dos métodos de cálculo es muy parecida, al igual que la del TS_{3m'-11m}. Ésta última, con B3LYP, es prácticamente igual que la obtenida en otros estudios teóricos, en los que se obtiene una distancia C3-C4 de 1,99 Å. En TS_{2m-4m} el H \cdot que se transfiere está más cerca del O1 que del C4 con la metodología HF, en cambio está prácticamente a igual distancia de ambos átomos con B3LYP, tal como se encuentra en otros estudios teóricos.^[24]

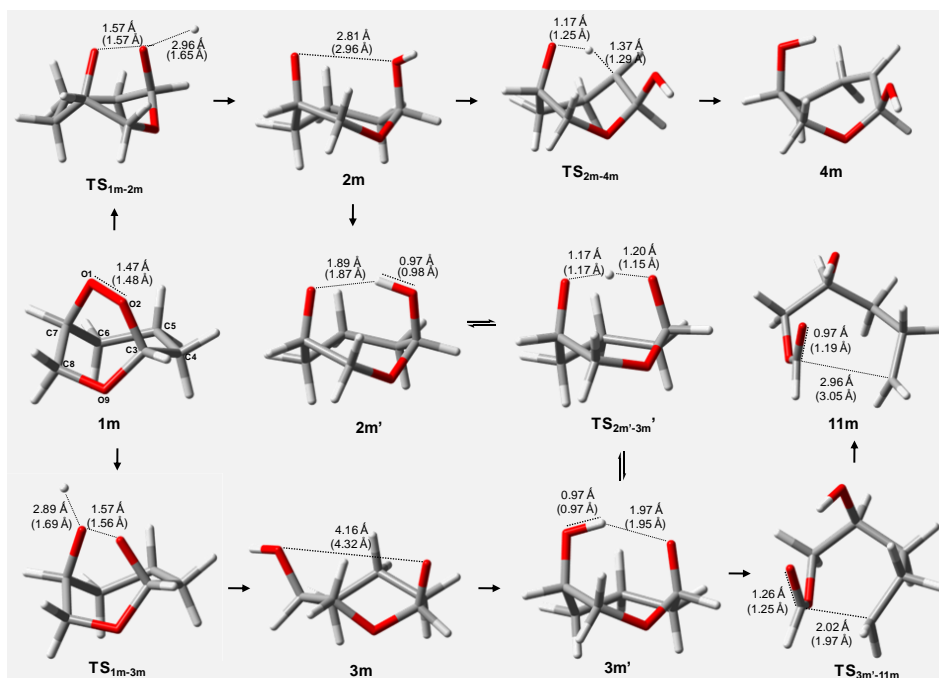


Figura 4.1.5 - Geometrías de los puntos estacionarios implicados en la formación de los C-radicales 4m y 11m, tomando como punto de partida el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el radical hidrógeno

Las frecuencias imaginarias de las estructuras de transición implicadas en todos los procesos estudiados, los valores propios negativos y los principales componentes del vector de transición se muestran en el Anexo I.

Modelo artemisinina

El estudio de estos procesos se ha llevado a cabo con la artemisinina (I) como molécula de partida, ver Figura 4.1.3. La artemisinina reacciona con el radical H·, que se enlaza a uno de los oxígenos del puente peroxídico, quedando un electrón libre en el otro oxígeno. El resultado son dos posibles radicales centrados en el oxígeno (2 y 3). Igual que con el otro

modelo, 2 y 3 experimentan un cambio conformacional, dando lugar a 2' y 3'. Ambos radicales se pueden interconvertir a través del $TS_{2'-3'}$. A partir del O-radical 2, por migración de un hidrógeno intramolecular (transferencia-1,5 de H \cdot), se forma el C-radical secundario 4. Paralelamente, por ruptura de un enlace C-C en 3', se forma el C-radical primario II.

Además, se ha propuesto un mecanismo adicional que relaciona las rutas radicalarias que transcurren a través del radical-O1 y del radical-O2 (Figura 4.1.6), ya que se ha encontrado que 3' pasa a una conformación más estable (3''), en la que el O2-radicalario se orienta hacia uno de los átomos de hidrógeno unidos al C4, de manera que éste se transfiere al O2 y da lugar al C-radical 4', que es un conformero de 4 un poco más estable que éste. La estructura de transición a través de la cual tiene lugar la reacción es $TS_{3''-4'}$.

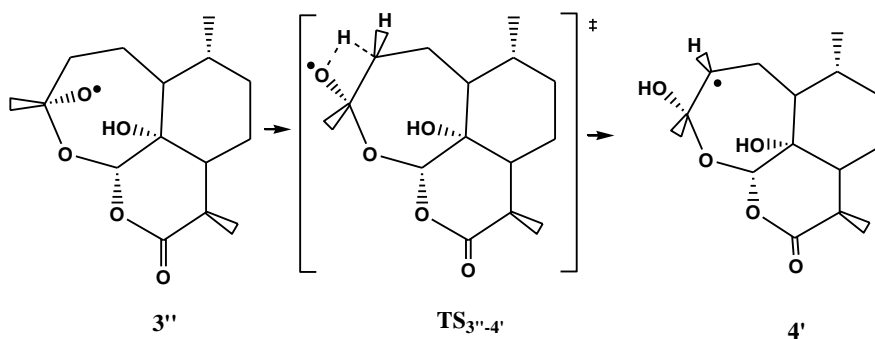


Figura 4.1.6 - Mecanismo de reacción de interconversión de las dos rutas radicalarias a través de 3'' y 4'

Con este modelo molecular se presentan únicamente los resultados obtenidos a nivel B3LYP/6-31G(d,p), de modo que los perfiles de energía se muestran en la Figura 4.1.7. Como energía de referencia se toma la suma de las energías de la artemisinina (1) y el radical hidrógeno.

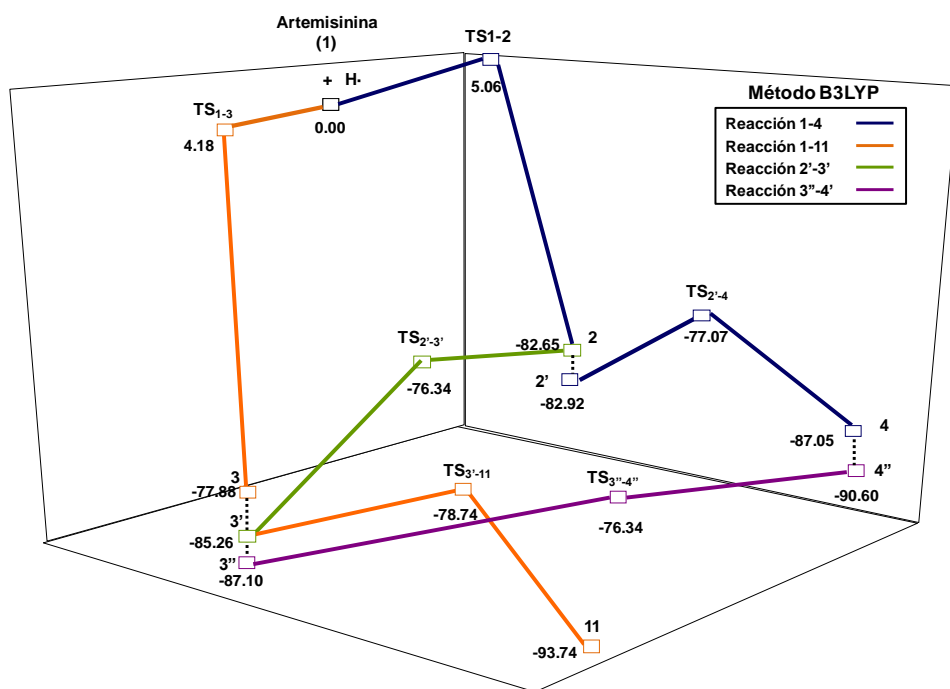


Figura 4.1.7 - Perfil de energía de la reacción de reducción del puente endoperóxido de la artemisinina hasta la formación de los C-radicales 4 y 11 para ambos métodos de cálculo

Con el método B3LYP, se obtiene una descripción energética del proceso cualitativamente igual que la obtenida con el otro modelo estudiado: los pasos de 1 a 2 y de 1 a 3 son altamente exotérmicos, puesto que 2 y 3 son 83 y 85 kcal/mol más estables que los reactivos de partida, respectivamente. La energía de activación del proceso que da lugar a 2 es de unas 5 kcal/mol y la que da lugar a 3 de 4 kcal/mol aproximadamente. Posteriormente 2, por cambios conformacionales, se estabiliza un poco (0,3 kcal/mol) dando 2', que a través del $TS_{2'-4}$, y con una barrera de energía de 6 kcal/mol, da lugar al C-radical 4, que es unas 4 kcal/mol más estable que 2'. Por su parte, el O-radical 3, se estabiliza unas 8,5 kcal/mol dando 3', que a través del $TS_{3'-11}$ y una barrera energética de 6,5 kcal/mol es precursor del C-radical 11, 7 kcal/mol más estable que el O-

radical 3'. El paso de conexión de las dos rutas entre 2 y 3' tiene asociada una barrera energética de unas 6,5 kcal/mol al ir del primero al segundo. Además, el otro mecanismo alternativo que relaciona ambas rutas reactivas a partir de 3'' da lugar a 4'', 3,5 kcal/mol más estable que el primero, a través del TS_{3'',4''} cuya barrera de energía es de unas 9 kcal/mol.

Con este modelo molecular, la formación de 3, estabilizada a 3' y 3'', resulta más favorable termodinámica y cinéticamente que la formación de 2 y 2'. Entre los pasos de obtención de los C-radicales, II se forma más favorablemente que 4 desde un punto de vista termodinámico, mientras que cinéticamente se pueden considerar ambas rutas favorecidas por igual. Así pues, en conjunto, la formación de II está favorecida por factores cinéticos y termodinámicos. Sin embargo, el hecho de que las dos estructuras de transición que interconectan las rutas radicalarias a través de O1 y O2 (TS_{2'-3'} y TS_{3'',4''}) sean fácilmente alcanzables, hace que la reacción pueda pasar por ambas rutas una vez el proceso comienza.

Comparando estos perfiles con los que se obtenían empleando el modelo reducido, se concluye que la descripción cualitativa del proceso es la misma, observándose pequeñas diferencias en los valores calculados. Así, el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2] nonano es un modelo representativo de la artemisinina.

Las densidades de espín en estas estructuras son muy similares a las obtenidas con el modelo simplificado de la artemisinina en todos los casos. Éstas se muestran en la Tabla 4.1.2. La naturaleza doblete de estas moléculas radicalarias queda demostrada por los valores de S^2 , próximos a 0,75.

Tabla 4.1.2 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados. Valores obtenidos con la metodología B3LYP

	S^2		S		S^2		S
TS ₁₋₂	0,7719	H	0,80	TS _{2'-3'}	0,7559	O2	0,43
		O1	0,18			O1	0,47
2	0,7533	O1	0,86	TS _{2'-4}	0,7560	C4	0,46
		C10	0,10			O1	0,50
2'	0,7538	O1	0,80	TS _{3''-4''}	0,7574	C4	0,52
		C6	0,13			O2	0,54
TS ₁₋₃	0,7744	H	0,81	4	0,7540	C4	0,96
		O2	0,18			C5	0,07
3	0,7534	O2	0,84			C3	-0,06
		C4	0,07			C6	0,05
3'	0,7540	C15	0,10	4''	0,7541	C4	0,99
		O2	0,76			C5	-0,08
		C4	0,16			C3	-0,05
3''	0,7534	C15	0,07			O2	0,06
		O2	0,84			H _{C4}	-0,05
TS _{3'-11}	0,7643	C4	0,10			TS _{3'-11}	0,7643
		C15	0,08	O2	0,40		
		O2	0,76	C3	-0,08		
11	0,7537	C4	0,10	11	0,7537	C4	1,05
		C15	0,08			C5	-0,08
		O2	0,76			H _{C4}	-0,05
		O2	0,76			H _{C5}	0,06

En la Figura 4.1.8 se muestran las geometrías de todos estos mínimos y estructuras de transición, cuyas distancias más significativas son prácticamente las mismas que las obtenidas con el modelo simplificado de la artemisinina.

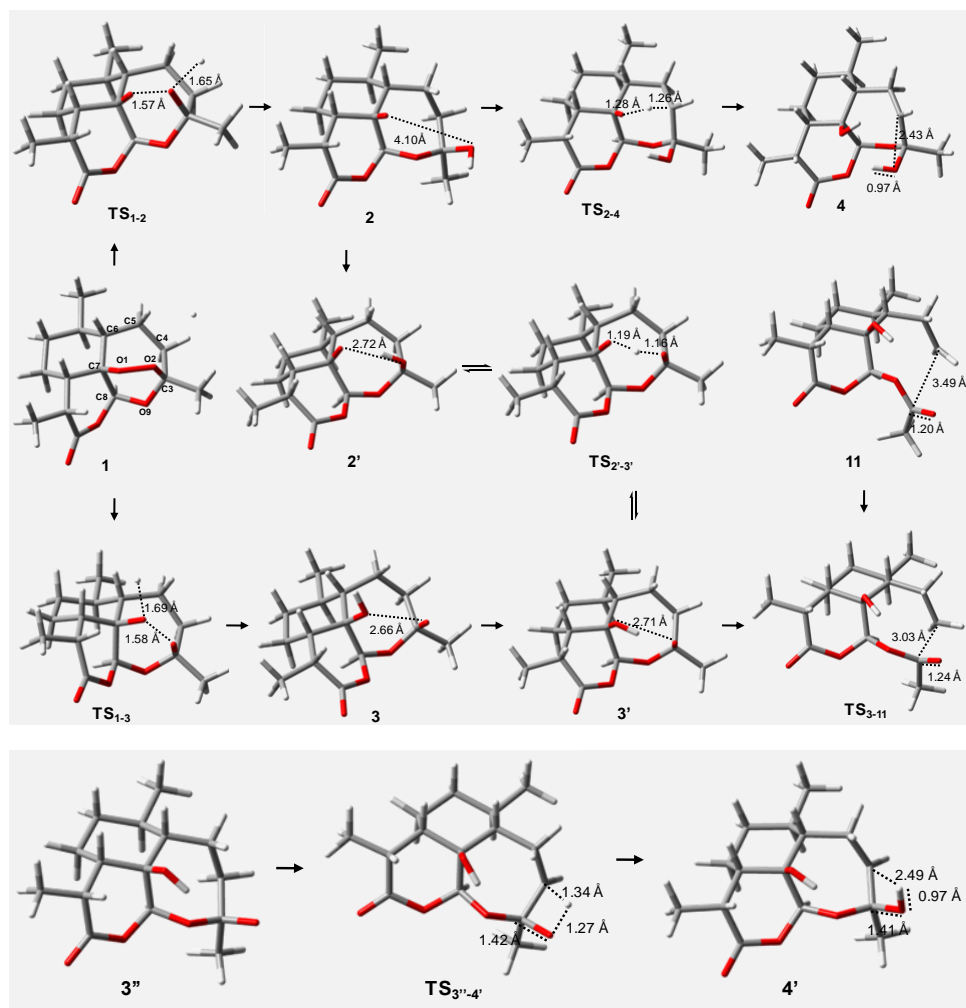


Figura 4.1.8 - Geometrías de los compuestos resultantes de la reacción de reducción del puente endoperoxido, utilizando el modelo de la artemisinina

4.1.2. Reacción de formación de 3 α -hidrodeoxi-artemisinina (6)

Tal como se muestra en la Figura 4.1, el radical 4, centrado en el átomo C4, puede seguir diferentes rutas reactivas, una de las cuales da lugar al producto final 3 α -hidrodeoxiartemisinina (6), uno de los productos

experimentales obtenidos mayoritariamente en la descomposición de la artemisinina. Tal como se muestra en la Figura 4.1.9, el mecanismo de reacción transcurre a través de dos etapas, en la primera se forma el epóxido **5** mediante la salida del H \cdot que estaba enlazado al O2, de manera que se produce el enlace entre este oxígeno y C4, que albergaba el electrón desapareado. Cabe destacar que este H \cdot que se escinde representa a la especie de Fe(II) del sistema real. Posteriormente, a través de una estructura de transición de cuatro centros que implica la ruptura del enlace O2-C3, el ataque del O1 al C3, y la migración del H \cdot enlazado al O1 hacia el O2, se forma **6**. El epóxido **5** se ha identificado como componente minoritario en la mezcla de productos derivados de la reducción del enlace endoperóxido de la artemisinina.

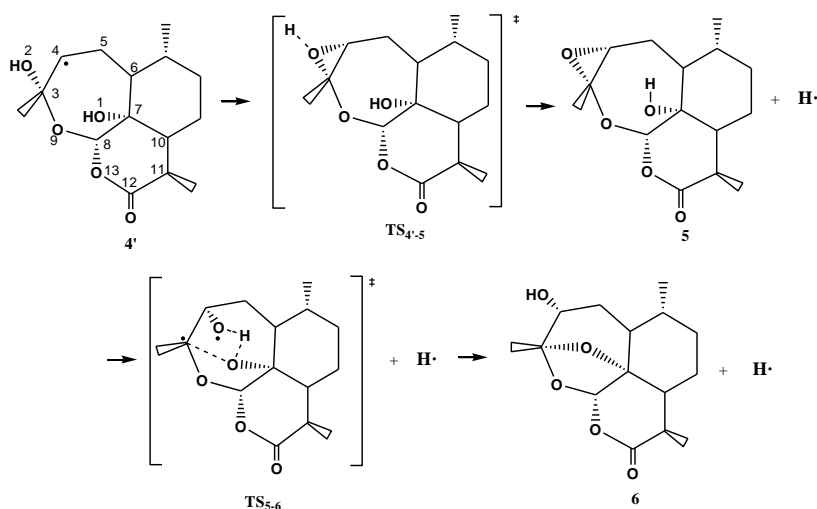


Figura 4.1.9 – Reacción de formación de **6** a partir del radical **4'**

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

Las energías relativas de las estructuras implicadas en esta reacción para el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano pueden observarse en el perfil energético de la reacción que se muestra en la Figura 4.1.10.

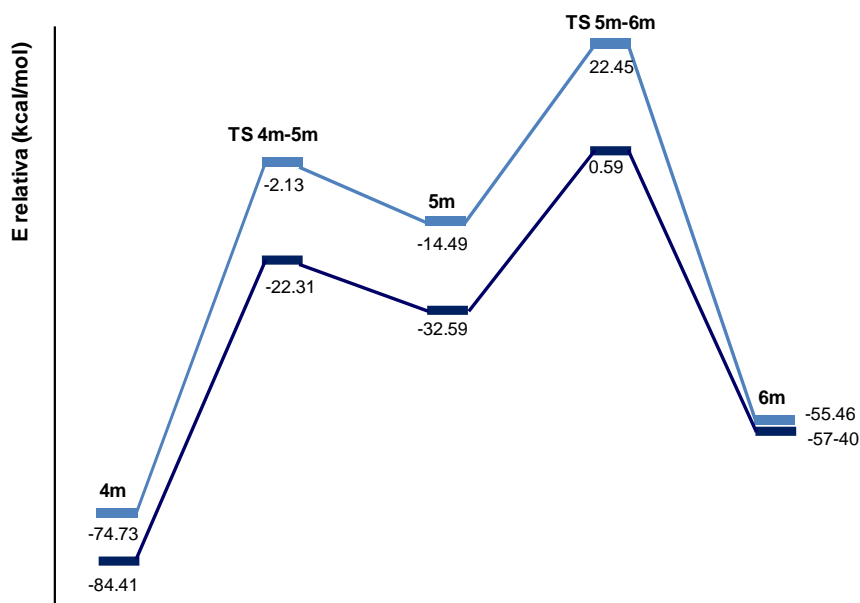


Figura 4.1.10 – Perfil de energía de la reacción de formación de 6m a partir de 4m. Resultados HF en azul claro y resultados B3LYP en azul oscuro

Se observa que la primera de las etapas es endotérmica, puesto que el epóxido **5m** (más el H \cdot saliente) es mucho más inestable que el radical **4m** (la diferencia es de unas 52 kcal/mol). Además, la energía de activación es muy elevada, aproximadamente 62 kcal/mol. En cambio, la etapa que da lugar a **6m** es exotérmica, puesto que es una molécula 25 kcal/mol más estable que el epóxido **5m**. La energía de activación de esta última etapa no es demasiado elevada, unas 32 kcal/mol. Aunque la especie **6m** sea menos estable que el radical **4m**, es más estable que **1m** más H \cdot , por lo que el proceso global es exotérmico. Estos resultados sugieren que el epóxido intermedio **5m** probablemente no sea responsable de la acción antimalaria, ya que los O \cdot - y C \cdot -radicales son especies mucho más estables.

Las geometrías optimizadas de las moléculas **4m**, **5m** y **6m** pueden observarse en la Figura 4.1.11, así como las estructuras de transición que

las interrelacionan. En el TS_{4m-5m} , el enlace O2-H del grupo alcohol empieza a romperse, a la vez que dicho oxígeno empieza a aproximarse al C4, que en la estructura **4m** alberga al electrón desapareado. Como puede verse en la Tabla 4.1.3, la densidad de espín de esta estructura de transición queda repartida entre el átomo de hidrógeno que se está separando y el átomo C4, quedando propiamente descrita como un doblete. El TS_{5m-6m} es una estructura de cuatro centros en la que el epóxido **5m** se abre cuando el H que formaba el alcohol se aproxima al oxígeno (O2), mientras el oxígeno del alcohol (O1) se acerca al carbono C4. Respecto a los resultados obtenidos con el método HF, cabe destacar que éstos presentan una contaminación de espín muy importante en el caso del TS_{4m-5m} , de manera que estas reacciones quedan mejor descritas con el método B3LYP desde el punto de vista electrónico.

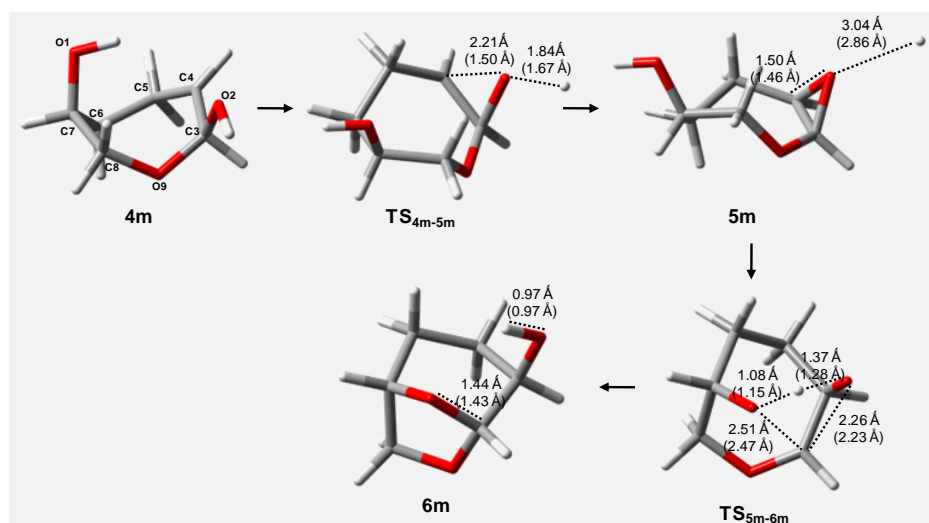


Figura 4.1.11 – Geometrías de los puntos estacionarios participantes en la formación de **6m** a partir de **4m**. Resultados B3LYP entre paréntesis

Tabla 4.1.3 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios no-singlete indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados. Resultados B3LYP entre paréntesis

	S^2		S
4m	0,7632 (0,7538)	C4	0,85(0,98)
		C5	-0,20(-0,07)
		C3	-0,16(-0,05)
		H	-0,10(-0,04)
TS _{4m-5m}	1,2317 (0,7663)	C4	0,91(0,36)
		H _{O2}	0,98(0,77)
		O2	-0,69(-0,10)
		C5	-0,14(-0,02)

Modelo artemisinina

En la Figura 4.1.12 se muestra el perfil energético para estas etapas, utilizando el modelo de la artemisinina.

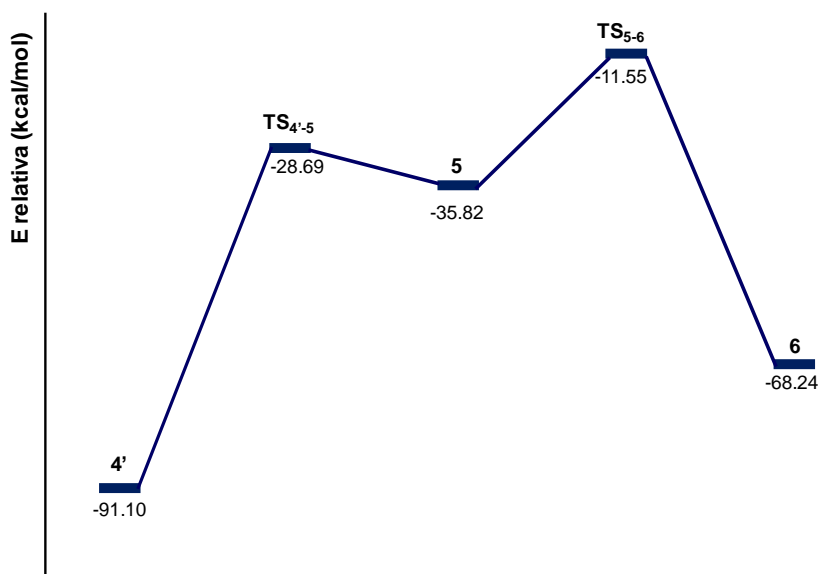


Figura 4.1.12 – Perfil de energía de la reacción de formación de 6 a partir de 4'

A la vista del perfil se deduce que la tendencia es la misma que la obtenida con el modelo simple de la artemisinina, lo cual pone otra vez de relieve la validez del modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano.

El epóxido **5** (más el H·) es 55 kcal/mol más inestable que el C-radical secundario **4'**. Así, aunque el valor de la energía de dicho epóxido está por debajo de la energía de los reactivos de partida, (**1** más H·), lo que conlleva que su formación sea un proceso exotérmico, otros pasos que no requieren este intermedio son más favorables en el proceso de descomposición de la artemisinina.

Las geometrías optimizadas de las moléculas **4'**, **5**, **6** y de las estructuras de transición que las interrelacionan se muestran en la Figura 4.1.13. En $TS_{4'-5}$ el enlace O2-H empieza a romperse, a la vez que dicho oxígeno empieza a aproximarse al C4. La densidad de espín se reparte entre el átomo de hidrógeno saliente y los átomos C4 y O2 (ver Tabla 4.1.4). Se forma por un lado un radical H· y por otro la molécula **5**, el epóxido singlete. Finalmente, a partir de **5** se forma el bicyclo **6**, que mantiene el estado singlete. El TS_{5-6} es una estructura de cuatro centros en la que el epóxido se abre cuando el H que formaba el alcohol se aproxima al oxígeno del epóxido (O2), mientras el oxígeno del alcohol (O1) se acerca al carbono C4.

Tabla 4.1.4 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios no-singlete indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados.

	S^2		S
4'	0,7539	C4	1,00
		C5	-0,08
		C6	0,06
		HC4	-0,05
$TS_{4'-5}$	0,7666	H _{O2}	0,77
		C4	0,36
		O2	0,11

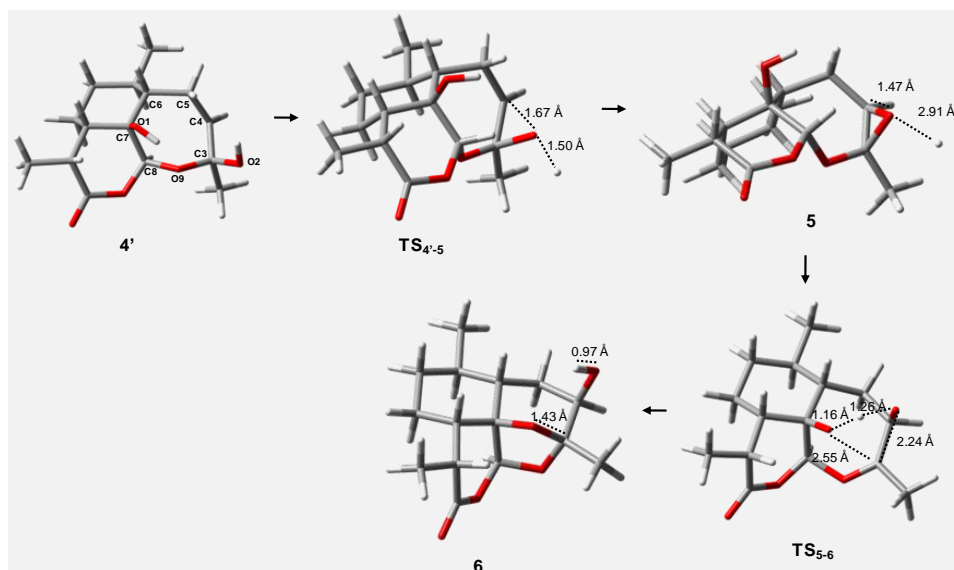


Figura 4.1.13 – Geometrías de los intermedios implicados en la formación de 6 a partir del C-radical 4

4.1.3. Reacción de formación de la deoxiartemisinina (8)

Se han postulado en la bibliografía dos mecanismos alternativos que dan lugar a la formación del producto final 8 a partir del C-radical 4. Uno de ellos pasa por la formación del alqueno 7 y eliminación de un radical hidroxilo, que representa el O=Fe (IV) que se pierde en esta etapa. El otro mecanismo empieza con una abstracción de un radical hidrógeno del medio para dar 9 y una molécula de agua, que representa la eliminación de las especies OFe^+ y H^+ . Estos mecanismos, *a* y *b* respectivamente, se muestran en la Figura 4.1.14.

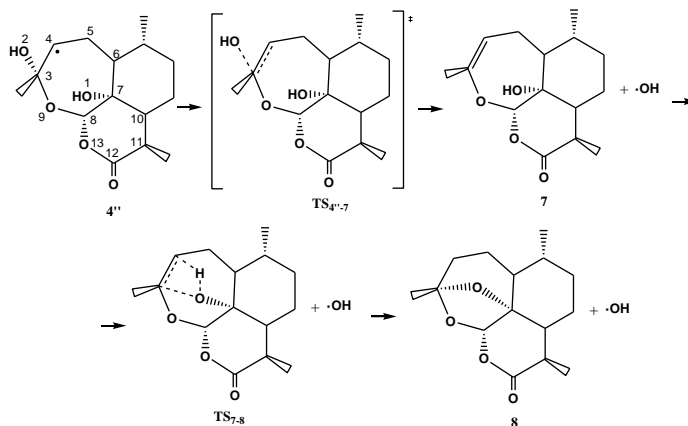
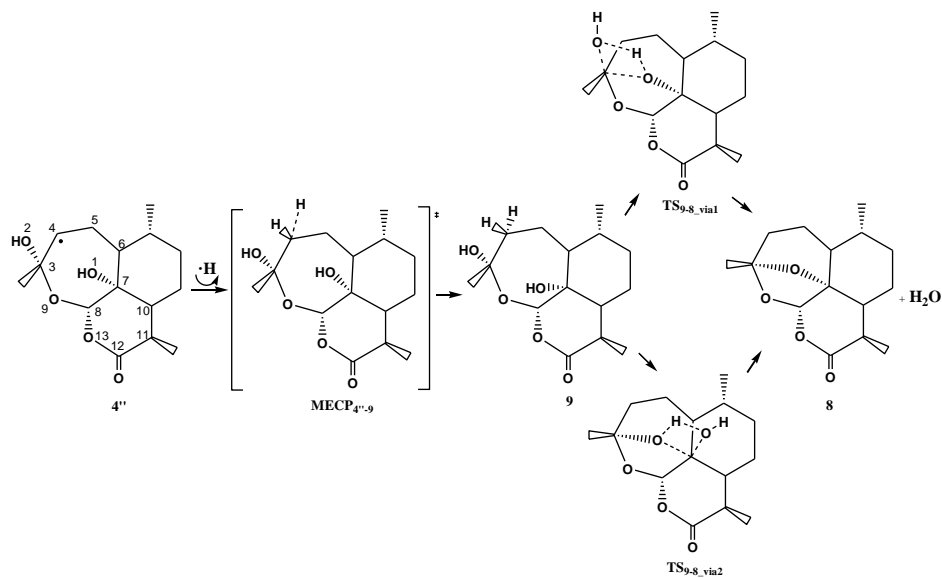
Mecanismo a:

Mecanismo b:


Figura 4.114 – Mecanismos (a y b) de reacción de formación de 8 a partir del radical 4

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

El mecanismo 'a' está compuesto por dos etapas, en la primera de ellas, por ruptura del enlace C3-O2 y formación del doble enlace entre C3 y C4, se forma **7** y se desprende un $\cdot OH$. Posteriormente, a través de una

estructura de transición de cuatro centros entre los átomos C3, C4, O1 y el H_{O1}, se forma la molécula **8**.

Los valores de las energías relativas correspondientes a los puntos estacionarios que participan en este proceso, para el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano, se representan en la Figura 4.1.15.

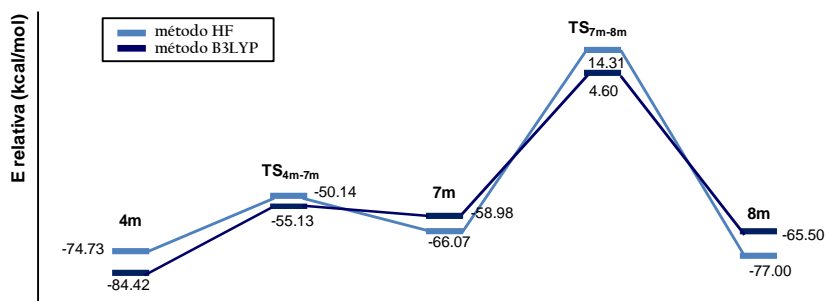


Figura 4.1.15 – Perfil de energía de las reacciones que dan lugar a **8m** a partir de **4m** por el mecanismo *a*. Resultados HF en azul claro y resultados B3LYP en azul oscuro. A la energía de cada molécula se le adiciona la energía del radical hidrógeno con el fin de poder equiparar estos mecanismos de reacción con los otros que dan lugar a **8m**.

La primera de las etapas es endotérmica puesto que el alqueno **7m** (más el grupo ·OH saliente) es 25 kcal/mol más inestable que **4m**. La barrera energética de este proceso es de aproximadamente 29 kcal/mol. En cambio, la segunda de las etapas es exotérmica, ya que **8m** es unas 6 kcal/mol más estable que la especie **7m**. La barrera energética que se debe superar es de 64 kcal/mol. Cabe destacar que la reacción global, desde **4m**, es endotérmica si los cálculos se llevan a cabo con la metodología B3LYP, mientras que es ligeramente exotérmica si éstos se realizan con el método HF.

El mecanismo '*b*' también está constituido por dos etapas, en este caso al C4 de **4m** se le adiciona un H· del medio, de modo que se genera la especie **9m**. En este proceso ha tenido lugar un cambio en la multiplicidad del sistema, ya que se ha pasado de una especie con dos

electrones desapareados (triplete), uno centrado en el C4 y el otro en el H· que ataca a éste, a una especie donde todos los electrones están apareados (singlete). Esta es una reacción ‘*prohibida por el espín*’, explicada en el apartado 3.5. La estructura que relaciona a estas especies, MECP_{4m-9m}, se corresponde con el punto de cruce de mínima energía entre dos superficies de energía potencial de diferente espín (MECP, Minimum Energy Crossing Point), calculado con el algoritmo de Harvey. Este algoritmo, para localizar MECPs, combina las energías E_i de las dos superficies y los correspondientes gradientes de energía ($\partial E_i / \partial q$) (respecto a las coordenadas nucleares q) para dar dos gradientes efectivos, f y g . En las cercanías del MECP, f es ortogonal a la hiperlínea de cruce, mientras que g es paralelo a esta hiperlínea y se dirige hacia el mínimo.^[26]

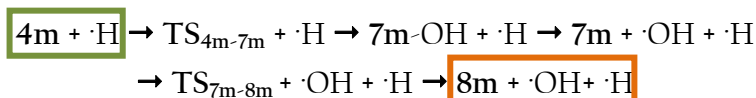
$$f = (E_1 - E_2) \left[\left(\frac{\partial E_1}{\partial q} \right) - \left(\frac{\partial E_2}{\partial q} \right) \right] = (E_1 - E_2) x_1$$

$$g = \left(\frac{\partial E_1}{\partial q} \right) - \frac{x_1}{|x_1|} \left[\left(\frac{\partial E_1}{\partial q} \right) \frac{x_1}{|x_1|} \right]$$

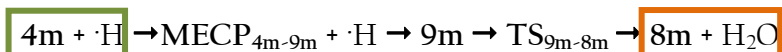
A partir de la especie **9m** uno de los grupos OH se aproxima al carbono al que está unido el otro OH, cediéndole el primero de éstos el H al otro OH y uniéndose el O al carbono, de modo que se desprende una molécula de agua y se forma el biciclo **8m**. Se han estudiado dos posibles rutas para llegar a **8m**, en ambas se desprende una molécula de agua, pero en la primera es el O2 el que forma el agua y el O1 el que forma el biciclo, y en la segunda es al revés. Cabe matizar que en el mecanismo general, ver Figura 4.1, la formación de **8** a través de **9** se postulaba con una etapa adicional intermedia que pasaba por la formación de **10**, sin embargo, esta etapa no ha sido encontrada en nuestro estudio, por lo que la conversión de **9m** a **8m** se explica mediante un solo paso de reacción que puede tener dos variantes (a través del TS_{9m-8m_vial} o del TS_{9m-8m_via2}).

Los dos mecanismos *a* y *b* conectan **4m** con **8m** pero no son equivalentes, ya que el primero de ellos conecta **4m** con **8m** más un radical hidroxilo; en cambio, el segundo de los mecanismos corresponde al proceso por el cual **4m** más un radical hidrógeno abstraído del medio da lugar a **8m** más una molécula de agua. Para que la comparación entre los valores de energía de las estructuras participantes sea posible, se toma como energía de referencia la suma de las energías de **1m** más dos radicales hidrógeno.

Las reacciones del mecanismo *a* quedan así:



Mientras que el mecanismo *b*:



En la Figura 4.1.16 se muestra el perfil de las energías relativas de los mínimos y estructuras de transición implicados en el mecanismo *b*.

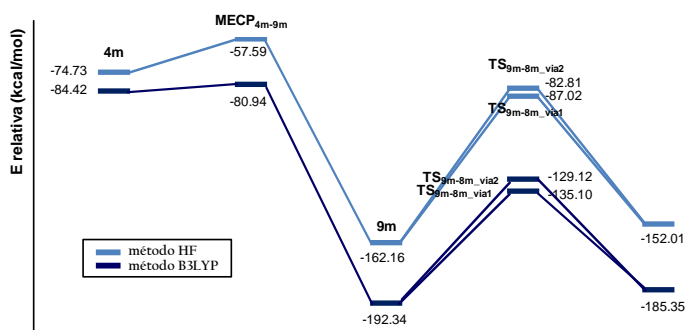


Figura 4.1.16 – Perfil de energía de las reacciones que dan lugar a **8m** a partir de **4m** por el mecanismo *b*. Resultados HF en azul claro y resultados B3LYP en azul oscuro. A la energía de cada molécula se le adiciona la energía del radical hidrógeno con el fin de poder equiparar estos mecanismos de reacción con los otros que dan lugar a **8m**.

Del mecanismo *b*, se obtiene que el paso de **4m** (más $\cdot\text{H}$) a **9m** es muy exotérmico, ya que la variación de energía es del orden de 108 kcal/mol, y su energía de activación de 3 kcal/mol. A partir de **9m**, la reacción que da **8m** es endotérmica, el aumento de energía que tiene lugar es de 7 kcal/mol tanto si la reacción transcurre a través del $\text{TS}_{9\text{m}-8\text{m_vial}}$ o del $\text{TS}_{9\text{m}-8\text{m_via2}}$.

Aunque desde un punto de vista termodinámico las dos vías de reacción no resultan favorables, cinéticamente es un poco más favorable la vía 1, ya que la energía de activación es de unas 57 kcal/mol, mientras que para la otra vía es de unas 63 kcal/mol.

Comparando las etapas de reacción que transcurren a partir del C-radical **4m**, la etapa de reacción que da lugar a **9m** es termodinámicamente más favorable que la etapa que pasa a formar **7m**, ya que entre éstas es la única exotérmica. Desde un punto de vista cinético esta etapa también resulta la más favorable puesto que la barrera de energía es de 3 kcal/mol, mucho menor que en el otro caso. Aún así, la formación de **9m** está supeditada a la existencia de radicales hidrógeno en el medio, por lo cual la formación de **8m** es posible que tenga lugar a través del intermedio **7m**, en lugar del **9m**.

En la Figura 4.1.17 se muestran las geometrías de los compuestos implicados en estas reacciones. Se puede observar que en el mecanismo *a*, en el $\text{TS}_{4\text{m}-7\text{m}}$, el O2 del $\cdot\text{OH}$ que sale de la molécula ya no forma enlace con el C3 al que estaba unido y la distancia C3-C4 es intermedia entre la de un enlace simple y uno doble. La densidad de espín en el C4 tiene un valor de uno, mientras que en el C3 y O2 también existe cierta densidad de espín electrónica (de valor 0,8 aproximadamente) de diferente signo. En la Tabla 4.1.5, se presentan los valores de densidad electrónica para todas estas moléculas, ya que para el resto el electrón desapareado está

localizado en el radical hidroxilo. En **7m** se ha formado un doble enlace y ya no existen electrones desapareados, y el radical $\cdot\text{OH}$, que alberga totalmente el electrón desapareado, se encuentra estabilizando esta especie mediante un enlace de hidrógeno con el oxígeno cíclico O9. A partir de **7m**, el hidrógeno unido al O1 pasa a enlazarse al C3 y el O1 al C4, de modo que se llega a la estructura bicíclica **8m**. En la estructura de transición entre estos compuestos, $\text{TS}_{7\text{m}-8\text{m}}$, participan cuatro centros. El enlace H-O1 ya está casi roto, y el O1, aunque se aproxima al C4, todavía no forma enlace con éste. En el mecanismo *b*, el $\text{MECP}_{4\text{m}-9\text{m}}$ presenta una distancia C4-H (del medio) de 2,60 Å y la densidad de espín está repartida entre el C4 y el $\cdot\text{H}$ del medio. En los $\text{TS}_{9\text{m}-8\text{ma}}$ y $\text{TS}_{9\text{m}-8\text{mb}}$, las distancias de enlace más importantes son muy similares y la densidad de espín se encuentra bastante deslocalizada. En el primero de éstos, el H unido al O1 se está uniéndose al O2, que a su vez se está desenlazando del C3. Además el O1 está acercándose al C3. Se produce la ruptura de dos enlaces y la formación de otros dos, formando así el biciclo **8m**. En el $\text{TS}_{9\text{m}-8\text{mb}}$ ocurre la misma reacción, pero en este caso es el H unido al O2 el que se acerca al O1 para ir a formar posteriormente la molécula de agua por ruptura del enlace O1-C7. También se forma el biciclo porque el O2 se enlaza a C7.

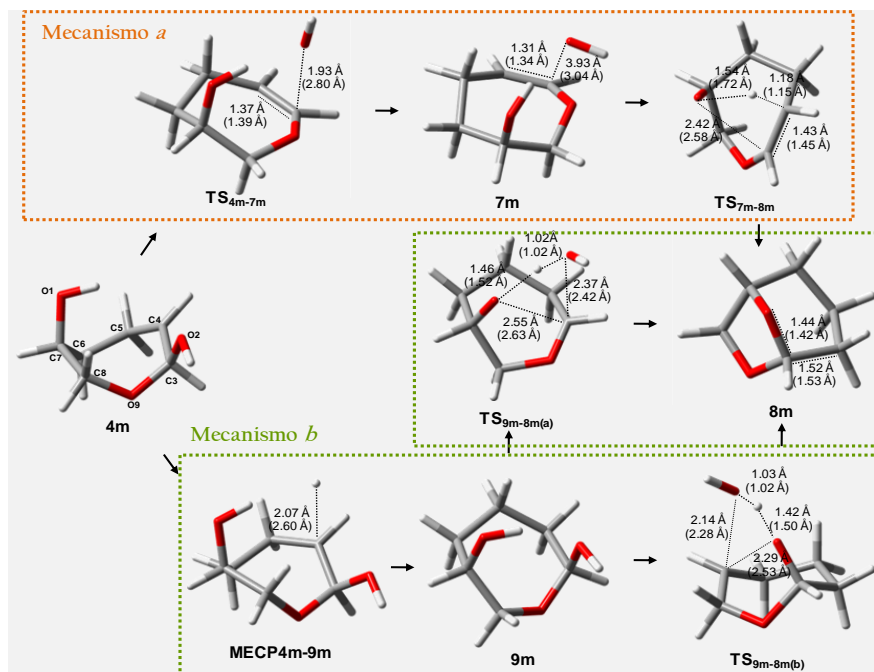


Figura 4.1.17 – Geometrías de los compuestos resultantes de la reacción de formación del 8m a partir del radical 4m. Resultados B3LYP entre paréntesis

Tabla 4.1.5 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios no-singlete indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados. Resultados B3LYP entre paréntesis

	S^2		S	
TS _{4m-7m}	1,0447	C4	1,08(0,11)	
	(0,7534)	O2	0,83(0,85)	
		C3	-0,79(-0,01)	
		C5	-0,16(-0,01)	

Modelo artemisinina

Estos mismos mecanismos, *a* (a través el alqueno 7) y *b* (a través del intermedio 9), de obtención de la deoxiartemisinina 8 se han estudiado con el modelo completo.

En la Figura 4.1.18 se ha representado el perfil energético de las etapas correspondientes al mecanismo *a*.

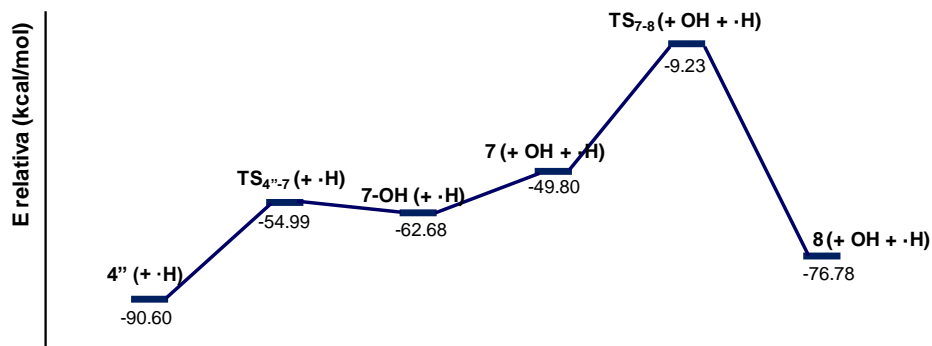


Figura 4.1.18 – Perfil de energía de la reacción de formación de 8 por el mecanismo *a*

La primera etapa es endotérmica, la especie 7-OH, en la que el ·OH está formando un enlace de hidrógeno con el O9 de la artemisinina, es 28 kcal/mol menos estable que 4''. Lo mismo ocurre si se considera la energía de 7 y los grupos ·OH y ·H por separado, entonces la energía aumenta 41 kcal/mol respecto a 4''. La barrera de energía de este proceso es de casi 36 kcal/mol. La siguiente etapa es exotérmica, puesto que 8 es 27 kcal/mol más estable que el alqueno 7, siendo la energía de activación de 40 kcal/mol. La tendencia de estas etapas es la misma que la obtenida con el modelo bicíclico. Igual que con el otro modelo, la reacción global es exotérmica, ya que la especie 8 es mucho más estable que los reactivos de partida (1 más el radical ·H).

En cuanto al mecanismo *b*, al igual que con el modelo simplificado, las energías relativas de los puntos estacionarios implicados han sido calculadas en base a la energía de la artemisinina (1) y dos radicales hidrógeno, puesto que en este mecanismo existe un átomo de hidrógeno más que en el resto. De los datos de la Figura 4.1.19 se deduce que la

primera de las etapas de la reacción es muy exotérmica, ya que la variación de energía es del orden de 195 kcal/mol y la barrera energética es de 4 kcal/mol. A partir de 9, se obtiene que la reacción para dar 8 es ligeramente exotérmica, con una disminución de energía de 2 kcal/mol. La barrera de energía de esta etapa es de 51 kcal/mol si la reacción transcurre a través de TS_{9-8a} y de 68 kcal/mol si transcurre a través de TS_{9-8b} , por lo que el mecanismo a través de la vía 1 es cinéticamente un poco más favorable. Con el otro modelo se obtenía esta misma tendencia para la primera etapa, aunque la segunda etapa resultaba ligeramente endotérmica.

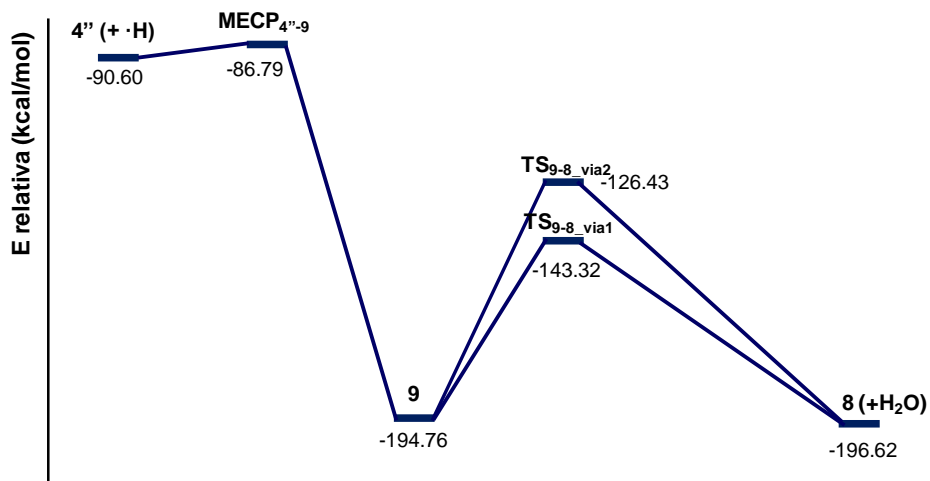


Figura 4.1.19 – Perfil de energía de la reacción de formación de 8 por el mecanismo *b*

La comparación de las tres etapas que parten de 4 (o bien 4' o 4'') permite establecer que el mecanismo que transcurre a través del intermedio 9 para dar finalmente 8 es más favorable que los mecanismos que transcurren a través del alqueno 7 (que da también 8) o que pasan por la formación de 5 (dando lugar al producto 6). Con el modelo bicíclico se obtiene este mismo comportamiento. Sin embargo, este

mecanismo se da únicamente con la condición de que en el medio reactivo existan radicales hidrógeno libres.

Las geometrías de $4''$, 7-OH, 7, 8 y las estructuras que los relacionan, $TS_{4''-7}$, $MECP_{4''-9}$, TS_{9-8a} y TS_{9-8b} se muestran en la Figura 4.1.20.

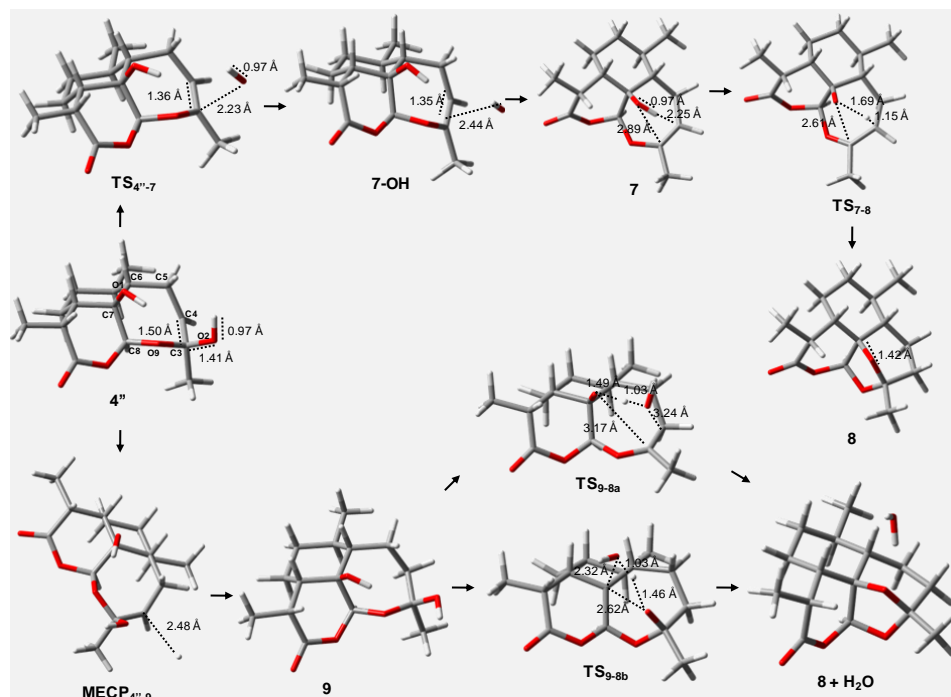


Figura 4.1.20 – Geometrías de los intermedios de reacción partícipes en la formación de 8 a partir del radical 4

En $4''$ la densidad de espín recae en C4 (ver Tabla 4.1.6). En cambio, en el $TS_{4''-7}$ la densidad de espín está repartida entre C4 y O2. La distancia del hidrógeno que se adiciona en $MECP_{4''-9}$ es de 2.48 Å. En el diol 9 los grupos hidroxilo están formando un puente de hidrógeno entre ellos. Como se observa en la figura, las distancias de enlace en las estructuras de transición TS_{9-8a} y TS_{9-8b} son muy similares. En el bicyclo 8, tanto por una vía de reacción como la otra, uno de los hidrógenos del agua que se

ha formado interacciona mediante un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del nuevo ciclo.

Tabla 4.1.6 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios no-singlete indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados

	S^2		S
4''	0,7541	C4	0,99
		C5	-0,08
		C3	-0,05
		C6	0,06
		O2	0,06
		HC4	-0,05
TS _{4''-7}	0,7597	C4	0,29
		O2	0,74

4.1.4. Reacción de formación del tetrahidrofurano 12

La formación del tetrahidrofurano 12 se explica mediante un solo paso de reacción a partir del C-radical primario 11, ver Figura 4.1.21. La reacción se produce por la escisión de un radical hidrógeno que en el C-radical 11 formaba el grupo alcohol y la formación de un enlace O1-C4, de manera que se obtiene 12, que es una estructura que posee un anillo tensionado, y un radical hidrógeno. Este radical hidrógeno es el que se corresponde con el Fe(II) del sistema real.

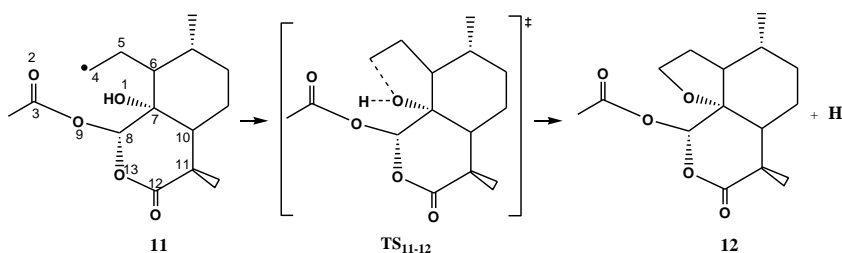


Figura 4.1.21- Mecanismo de reacción de formación de 12 a partir del C-radical 11

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

Las energías de los estos puntos estacionarios para el modelo reducido se presentan en el perfil de energía de la Figura 4.1.22. Cabe matizar que se ha modelado este mecanismo de reacción a través de su conformero **11m'**.

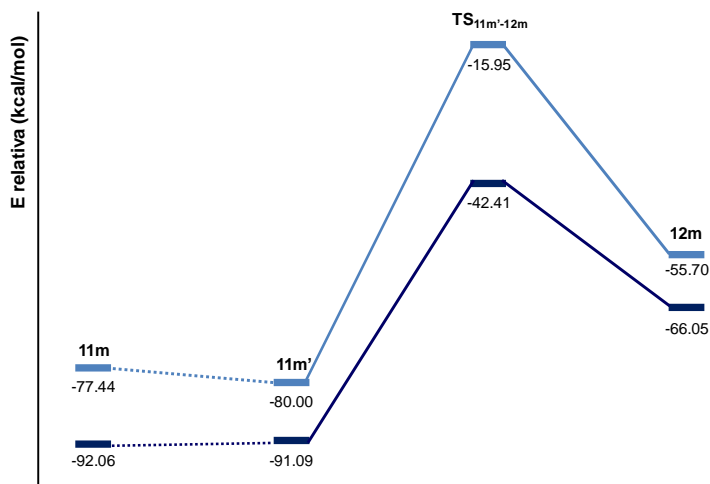


Figura 4.1.22 – Perfil de energía de la reacción 11m-12m. Resultados HF en azul claro y resultados B3LYP en azul oscuro

El paso de **11m** a **11m'** implica la pérdida del enlace de hidrógeno entre H_{O1} y $O2$, por lo que, con la metodología B3LYP, se observa un ligero aumento de energía de 1 kcal/mol. La barrera de energía de esta etapa es de casi 49 kcal/mol y se trata de una etapa endotérmica, puesto que la energía aumenta 25 kcal/mol al pasar del C-radical **11m'** al producto neutro **12m** (más el grupo $\cdot H$).

En la Figura 4.1.23 se presentan las geometrías de estas especies. Como puede deducirse por los valores de las principales distancias implicadas en la reacción, en el $TS_{11m'-12m}$ el enlace $O1-C4$ empieza a formarse, a la vez que la distancia $H-O1$ ha aumentado. En **12m** la formación de $O1-C4$ da lugar al cierre del anillo furano y el $\cdot H$ se ha separado de la molécula.

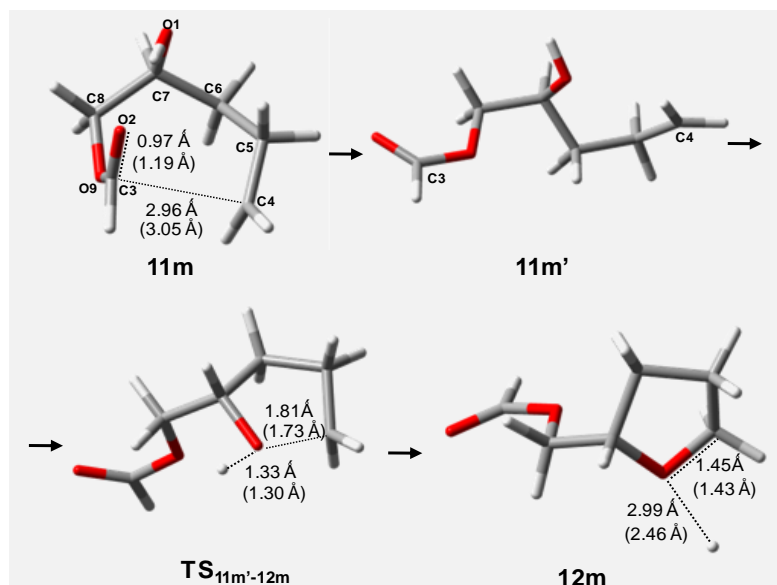


Figura 4.1.23– Geometrías de los intermedios de la reacción 11m-12m

En 11m' el electrón desapareado está situado en C4 (ver Tabla 4.1.7), como era de esperar. En el $TS_{11m'-12m}$ se encuentra deslocalizado entre el $\cdot H$ que se transfiere (Ht) y C4, con una menor participación de O1.

Tabla 4.1.7 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios no-singlete indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados. Valores HF y, entre paréntesis, B3LYP.

	S^2		S
11m'	0,7628 (0,7538)	C4	1,30(1,08)
		C5	-0,20(-0,08)
		H _{C4}	-0,11(-0,05)
		H _{C4'}	-0,10(-0,05)
$TS_{11m'-12m}$	0,9082 (0,7609)	C4	0,82(0,42)
		Ht	0,72(0,63)
		O1	-0,39(-0,06)
		C5	-0,11(-0,02)

Modelo artemisinina

Se ha llevado a cabo el estudio de esta misma etapa de formación de 12 con el modelo de la artemisinina.

En la Figura 4.1.24 se muestran los perfiles de energía de estas reacciones y en la Figura 4.1.25 se presentan las geometrías.

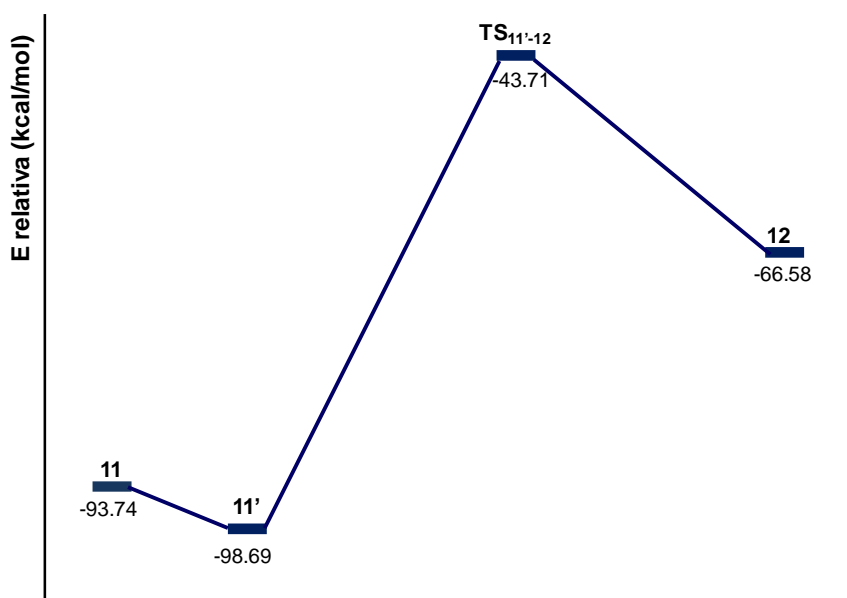


Figura 4.1.24– Perfil de energía del proceso 11'-12

Esta etapa de reacción es endotérmica, con un incremento de energía de 32 kcal/mol (al pasar de 11' a 12), y una barrera de energía de 55 kcal/mol. De nuevo, se observa que la tendencia es la misma con los dos modelos.

En 11' el electrón desapareado se encuentra localizado sobre el átomo C4, ver Tabla 4.1.8. El TS_{11'-12} describe la escisión del ·H respecto al O1 y la formación acoplada del anillo furano. En esta estructura la densidad espín se encuentra en ·H y C4.

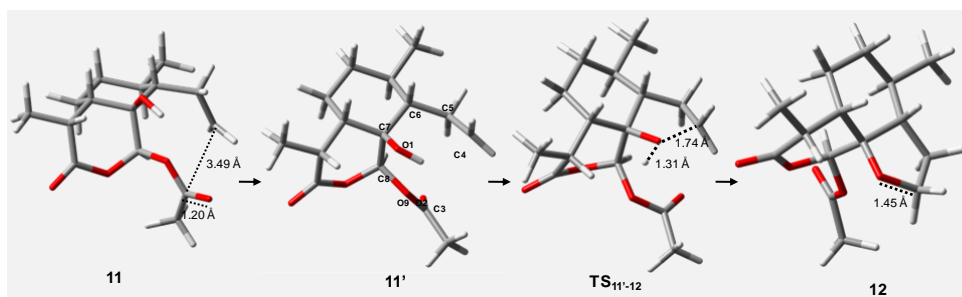

 Figura 4.1.25– Geometrías de los intermedios II, II', $TS_{II'-12}$ y 12

 Tabla 4.1.8 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios no-singlete indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados

	S^2		S
II	0,7537	C4	1,05
		C5	-0,08
		HC4	-0,05
		HC5	0,06
II'	0,7536	C4	1,02
		C5	-0,07
		HC5	0,06
$TS_{II'-12}$	0,7604	H	0,62
		C4	0,39
		O1	-0,06

4.1.5. Reacción de formación del O-radical 14

El O-radical 3' puede seguir otra vía de reacción alternativa que transcurre por la formación de un radical centrado en O9, el radical 13, que por un lado es precursor de 14, un radical centrado en O10, cuya reacción se va a explicar en este apartado. Por otro lado, a través de dos mecanismos distintos, 13 da lugar a la formación del producto 15, reacciones que se detallan en el siguiente apartado. Aunque 14 y 15 no

son los principales productos de la descomposición de la artemisinina, han sido detectados en algunos estudios derivados de la descomposición.^[10] La formación de **13** se produce a través del TS_{3'-13}, por ruptura del enlace C3-O9, como puede verse en la Figura 4.1.26.

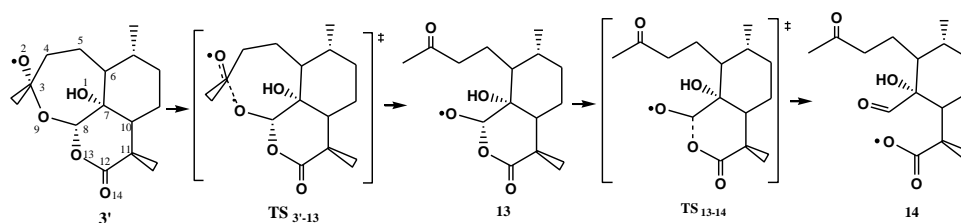


Figura 4.1.26 – Mecanismo de formación de **14** a partir de **3'**

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

Llegados a este punto, para explicar la formación de las especies **14** y **15** con el modelo reducido, es necesario ampliar el sistema molecular por inclusión de un nuevo ciclo que contiene átomos participantes en los mecanismos correspondientes. Este ciclo se representa en rojo en la Figura 4.1.2. Al análogo de **13m** que incluye este ciclo adicional se le denomina **13m'** y por ruptura del enlace C8-O13 da lugar a **14m**.

Las energías de los mínimos y estructuras de transición participantes en este mecanismo se muestran en los perfiles de energía de la Figura 4.1.27. Para poder comparar las energías de estas especies con diferente número de átomos, se ha equiparado la energía de **13m'** a la de **13m**, y partiendo de esa premisa se han recalculado las energías de las especies cuya formación es posterior a **13m'**.

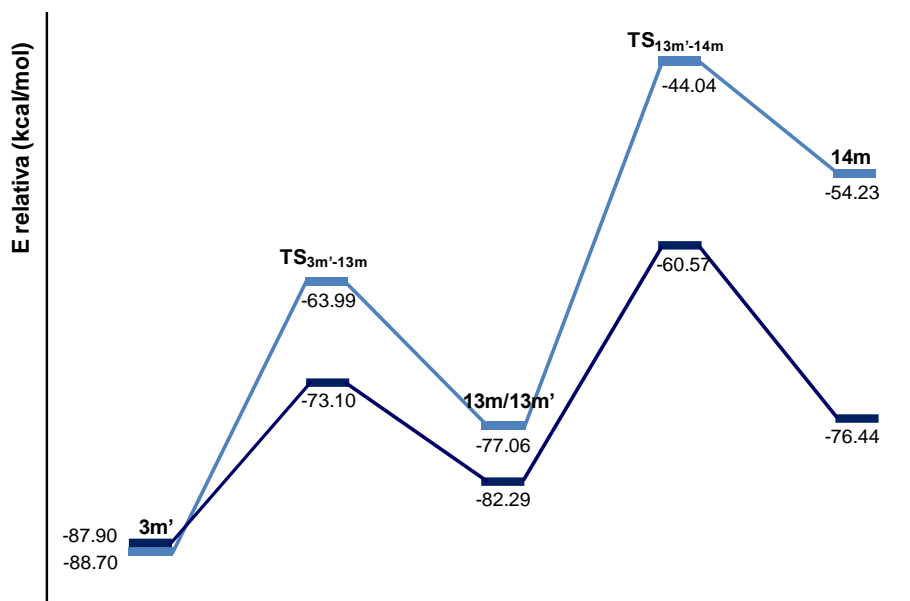


Figura 4.1.27 – Perfil de la reacción de formación de 14m a partir de 3m'. Resultados HF en azul claro y resultados B3LYP en azul oscuro

La etapa de reacción de formación de 13m/13m' a partir de 3m' es endotérmica, siendo la diferencia energética de casi 6 kcal/mol, mientras que la barrera de energía del proceso es de 15 kcal/mol. La etapa subsecuente es también endotérmica, ya que 14m es 6 kcal/mol menos estable que 13m/13m'. La barrera energética de esta etapa es de 22 kcal/mol.

En la Figura 4.1.28 se presentan las geometrías de las especies participantes en la formación de 14m a partir de 3m'. La estructura de transición de la primera reacción, TS_{3m'-13m} presenta la densidad de espín repartida entre los átomos C3 (-0,11), O2 (0,39) y O9 (0,60), tal como se puede comprobar en la Tabla 4.1. 9. En 13m/13m' el enlace O9-C3 ya se ha acabado de romper y los electrones desapareados que había en C3 y O2 se unen formando un doble enlace, de modo que ahora la densidad de espín está situada completamente sobre el átomo O9. En la etapa de

formación de **14m** se rompe el enlace C8-O13, de modo que la densidad de espín del $TS_{13m'-14m}$ está repartida entre el O9 (0,29), que era radicalario en **13m/13m'**, C8 (-0,06), O13 (0,34), el O14 (0,27) y C7 (0,11). La estructura final de esta reacción, **14m**, presenta una distancia C8-O13 bastante grande (4,92 Å) con B3LYP. La densidad de espín se encuentra igualmente repartida entre el O13 (0,56) y el O14 (0,51), debido a que el e^- desapareado se encuentra igualmente deslocalizado entre ambos oxígenos.

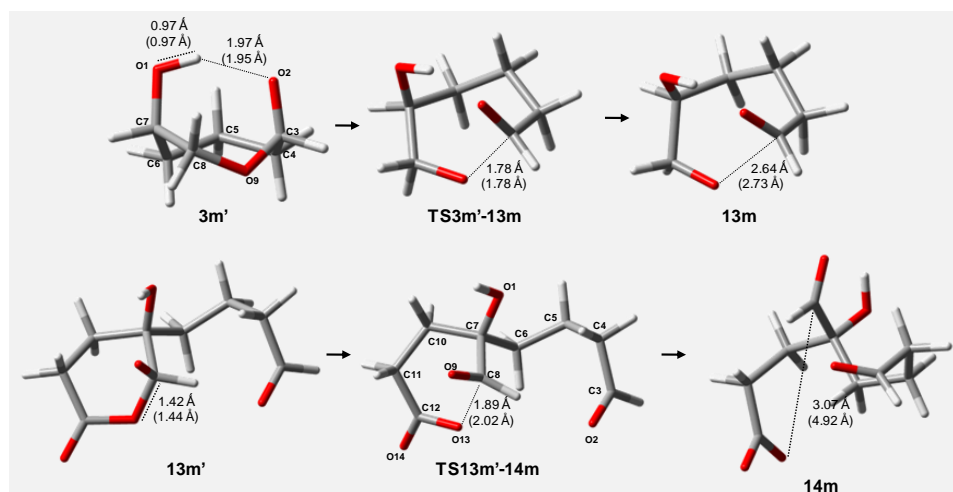


Figura 4.1.28 – Geometrías de los intermedios de la reacción de formación de **14m**

Tabla 4.1.9 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios implicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados. Resultados B3LYP entre paréntesis

	S^2		S		S^2		S	
3m'	0,7563	O2	1,04(0,68)	TS_{3m'-13m}	0,9627	O2	0,81(0,39)	
	(0,7548)	C3	-0,14(-0,04)		(0,7662)	O9	0,76(0,60)	
		C4	0,07(0,20)			C3	-0,62(-0,11)	
13m	0,7572	O9	1,05(0,72)	13m'	0,7562	O9	1,02(0,67)	
	(0,7551)	C8	-0,15(-0,03)		(0,7548)	C8	-0,13(-0,02)	
		C7	0,01(0,16)			C7	0,06(0,16)	
						H _{C8}	0,05(0,10)	
TS_{13m'-14m}	1,1387	O9	0,81(0,29)	14m	0,7564	O13	1,04(0,56)	
	(0,7661)	O13	0,80(0,34)		(0,7559)	O14	-0,03(0,51)	
		O14	0,45(0,27)					
		C8	-0,69(-0,06)					
		C12	-0,49(-0,05)					
		C7	0,10(0,11)					

Modelo artemisinina

El estudio del mecanismo de formación de **14** se ha realizado también con el modelo de la artemisinina.

Las energías relativas de los mínimos **3'**, **13**, y **14**, así como las de las estructuras de transición $TS_{3'-13}$ y TS_{13-14} se muestran en los perfiles de la Figura 4.1.29. Como energía de referencia se toma la suma de las energías de **1** (artemisinina) y del radical hidrógeno.

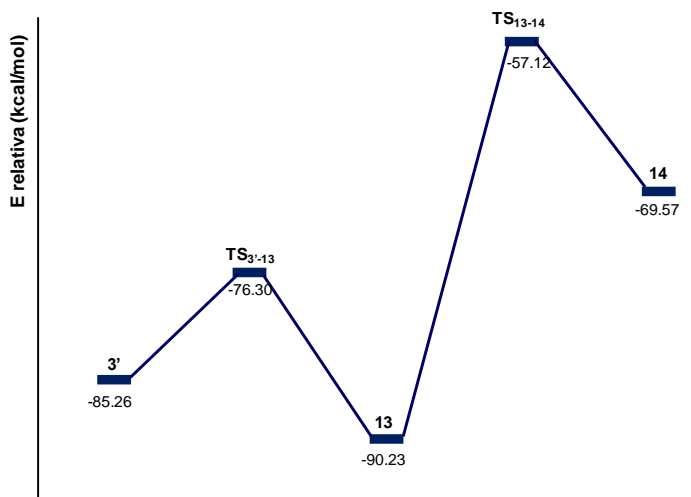


Figura 4.1.29 – Perfil de energía de la reacción 3'-14

Con este modelo molecular, la etapa de obtención de **13** es exotérmica, puesto que esta estructura es 5 kcal/mol más estable que **3'**, siendo la barrera de energía de 9 kcal/mol. Para la segunda etapa de la reacción, en la que **13** da **14**, la energía aumenta en 21 kcal/mol y la energía de activación es bastante elevada, 33 kcal/mol.

En la Figura 4.1.30 se presentan las geometrías de las especies implicadas en la formación de **14**. La estructura de transición de la primera etapa, TS_{3'-13}, presenta la densidad de espín repartida entre los mismos átomos que con el modelo simplificado: C3 (-0.10), O2 (0.44) y O9 (0.43), ver Tabla 4.1.10. En **13** el enlace C3-O9 ya se ha acabado de romper, se ha formado un enlace cetona entre C3 y O2, de modo que ahora la densidad de espín está situada completamente sobre el átomo O9. En la otra etapa, que da lugar a **14**, en el TS₁₃₋₁₄ se está rompiendo el enlace C8-O13, de modo que la densidad de espín está repartida entre el O9 (que era radicalario en **13**), C8, O13, O14 y C12. La estructura final de esta reacción, **14**, presenta una distancia C8-O13 de 2.81 Å. Al igual que ya se había comentado con el modelo simple, la densidad de espín se encuentra

igualmente repartida entre el O13 y el O14, debido a que el electrón desapareado está deslocalizado entre ambos oxígenos.

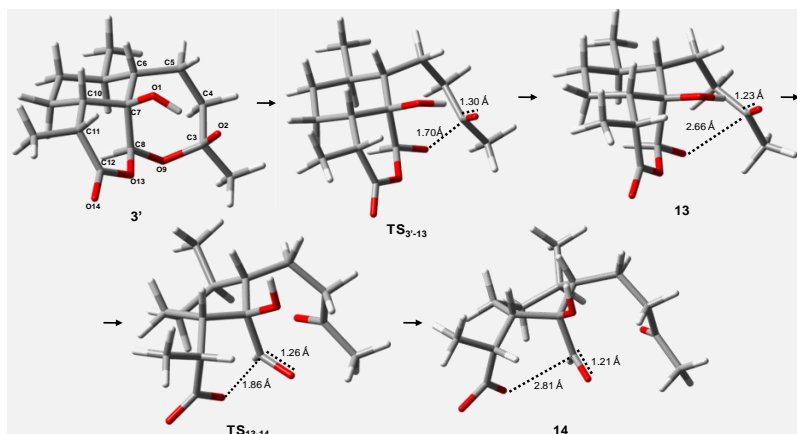


Figura 4.1.30 – Geometrías de las especies que participan en la formación de 14

Tabla 4.1.10 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios implicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados

	S^2		S		S^2		S
3'	0,7540	O2	0,76	TS ₁₃₋₁₄	0,7751	O9	0,49
		C4	0,16			O13	0,43
		C15	0,07			O14	0,23
TS _{3'-13}	0,7632			14	0,7560	C8	-0,14
		O2	0,44			O14	0,57
		O9	0,43			O13	0,48
		C3	-0,10			C12	-0,08
		C7	0,05				
13	0,7560	H _{C8}	0,06				
		O9	0,54				
		C7	0,23				
		O1	0,09				
		H _{C8}	0,09				

4.1.5. Reacción de formación del dioxodecanodial 15

En el anterior apartado se ha explicado el mecanismo de formación del O-radical 13 a partir de 3. En este apartado se explica la formación de 15 que, aunque se postulaba en una única etapa, se ha encontrado que tiene lugar a través de dos caminos de reacción distintos. En la Figura 4.1.31 se muestran estos mecanismos de reacción. Cabe destacar que para poder explicar estos mecanismos, con el método reducido, se requiere usar el modelo en el que se incluye un ciclo adicional.

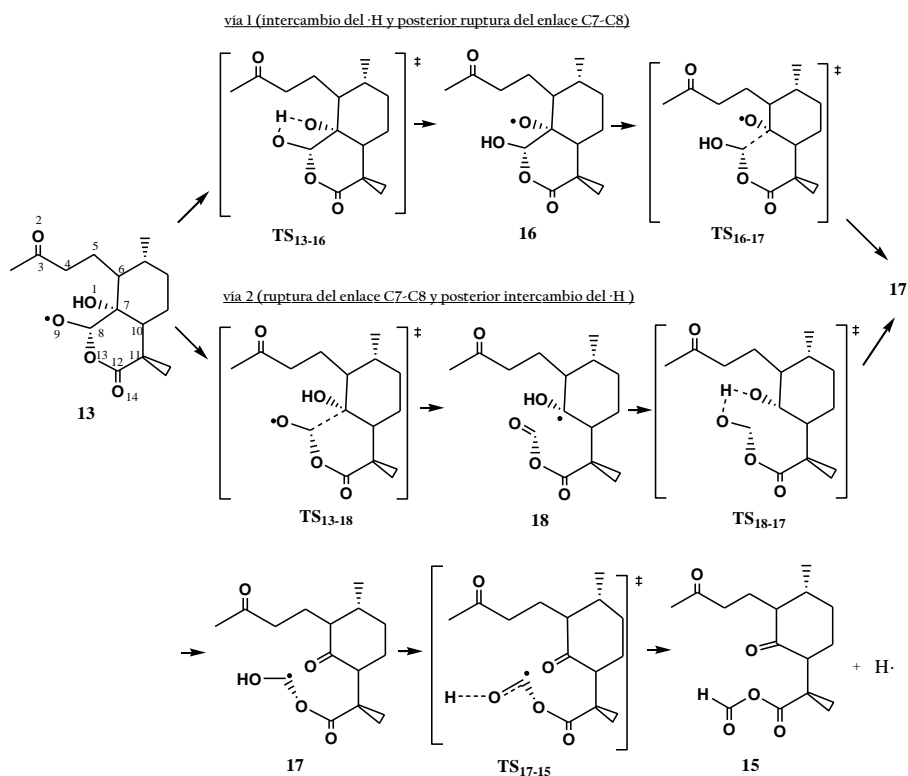


Figura 4.1.31– Mecanismo de reacción de la formación de 15 a partir de 13

El primero de los mecanismos empieza con la transferencia del hidrógeno desde el O1 al O9 dando lugar al radical centrado en O1 16. Seguidamente se produce la ruptura del enlace C7-C8, formándose el radical centrado

en el C8 17. La segunda vía de reacción tiene lugar en orden inverso a la primera, es decir, primero se produce la ruptura del enlace C7-C8, obteniéndose el radical centrado en C7 18 y, posteriormente, por transferencia del hidrógeno se obtiene 17. A continuación, a partir de 17, el ·H transferido en la etapa previa pasa al medio y se forma el dioxodecanodial 15.

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

La Figura 4.1.32 se representan las energías relativas de los mínimos y estructuras de transición de estas reacciones. La energía de referencia es la suma de las energías de 1m y un radical hidrógeno, habiéndose equiparado 13m' a 13m. Cabe comentar que la primera vía de reacción no ha sido completamente caracterizada, puesto que el TS_{13m'-16m} no ha sido hallado con la metodología B3LYP.

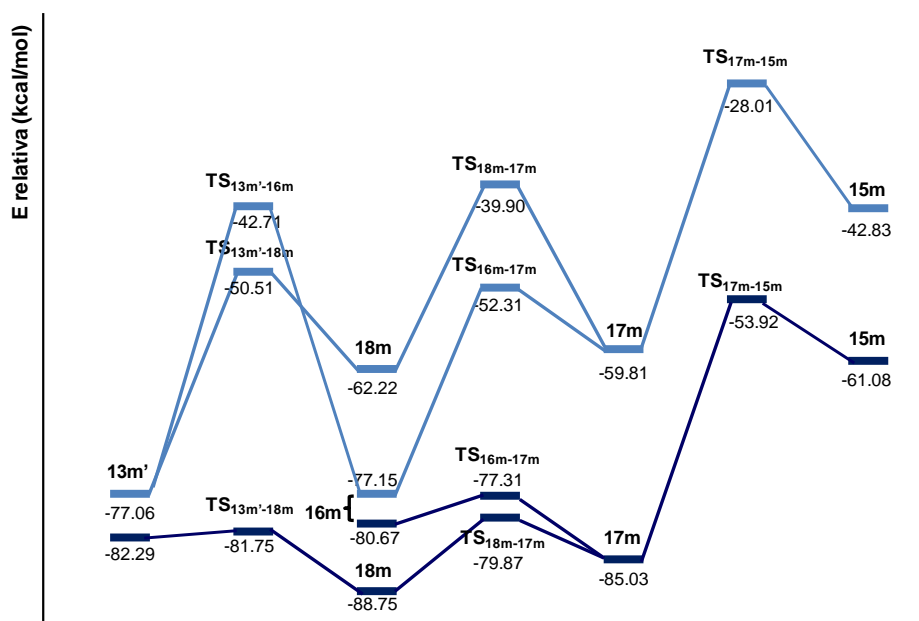


Figura 4.1.32 – Perfil de energía de las reacciones que dan lugar a 15m a partir de 13m'. Resultados HF en azul claro y resultados B3LYP en azul oscuro

Con B3LYP se ha encontrado que una de las reacciones que parten del O-radical **13m**, la que da **18m** (vía 2 para finalmente dar **17m**), es exotérmica y presenta una disminución de energía de 6 kcal/mol. La energía de activación de la misma es de 0.5 kcal/mol. Para la primera etapa de la vía 1 (**13m-16m**) no se ha localizado la estructura de transición con esta metodología, habiéndose encontrado que con el método HF la barrera de energía es de 34 kcal/mol y la disminución de energía prácticamente nula. La segunda etapa de la vía de reacción 1 (da **17m** a partir de **16m**) es exotérmica, la variación de energía es de 4 kcal/mol; y la energía de activación es de 3 kcal/mol. Esta etapa es más favorable termodinámica y cinéticamente que la que da **17m** a partir de **18m**, que tiene un incremento de energía de casi 4 kcal/mol y una barrera energética de 11 kcal/mol. La tercera etapa común a las vías 1 y 2 (**17m-15m**) presenta un incremento de energía de 24 kcal/mol, y una energía de activación de 31 kcal/mol. Atendiendo a los resultados obtenidos con el método B3LYP, la formación de **18m** es más favorable que la de **16m**. Sin embargo, los cálculos realizados con HF sugieren que, aunque el paso que transcurre a través de **16m** requiere superar una barrera de energía mayor que si transcurre a través de **18m**, el paso de formación de **17m** demanda menos energía si transcurre a través del intermedio **16m** que si transcurre a través del **18m**. Para los dos niveles de cálculo, el $TS_{17m-15m}$ es el mayor en energía, por lo que si **15m** se alcanza, ambos caminos competirán.

En la Figura 4.1.33 se muestran las geometrías de los puntos estacionarios participantes en estos procesos. La densidad de espín en **13m'** recae en el O9, tal como se puede ver en la Tabla 4.1.11.

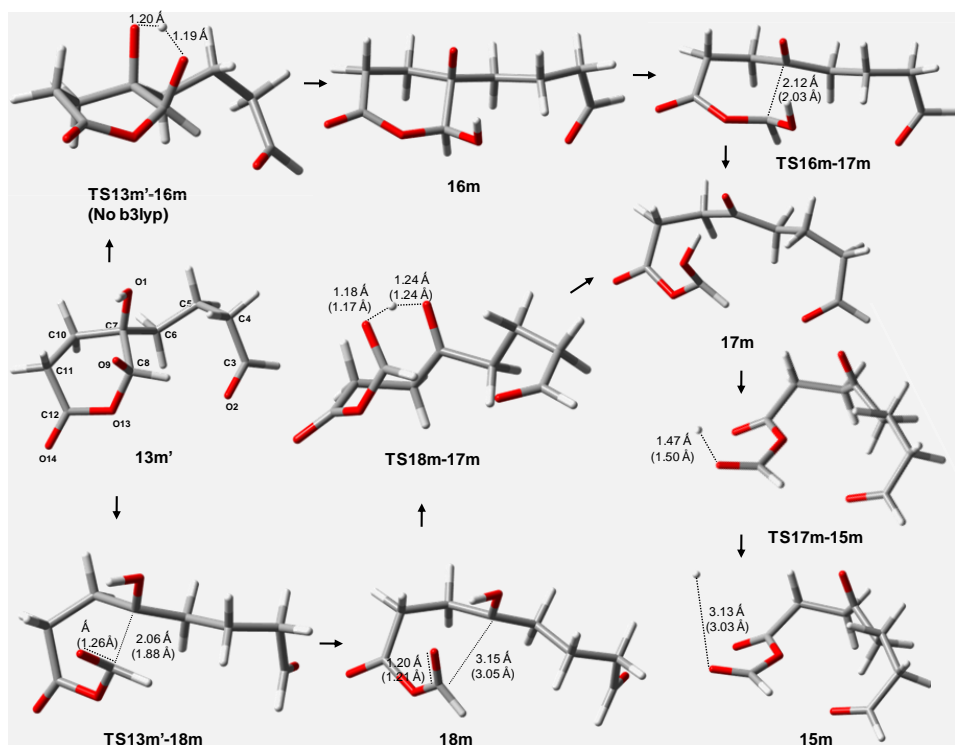


Figura 4.1.33 – Geometrías de los puntos estacionarios que participan en la formación de 15m. Resultados B3LYP entre paréntesis

En el $TS_{13m'-16m}$, obtenido únicamente con el método HF, el H se encuentra prácticamente en medio de los oxígenos. La densidad de espín se encuentra repartida entre estos tres átomos: O1, O9 y H_{O1} . La densidad de espín en **16m** está localizada en O1, que es el que ha pasado a albergar el electrón desapareado. En la estructura de transición de la última etapa que lleva a **17m** por la vía 1, $TS_{16m-17m}$, se está produciendo la ruptura C7-C8, la distancia es de 2.03 Å para B3LYP. A su vez se está formando un doble enlace entre C7 y O1, y la densidad de espín está deslocalizada entre estos átomos. En el $TS_{13m'-18m}$, se produce también la ruptura C7-C8, y la distancia obtenida con B3LYP es de 1.88 Å. El C7 y O9 albergan la densidad de espín en este estado de transición. En **18m**, la distancia C7-C8 es de 3.05 Å. La densidad de espín en esta estructura está localizada

principalmente en el C7, ya que entre el O9 y el C8 se ha formado un enlace carbonilo. En la última estructura de transición de la vía 2, que lleva a **17m**, TS_{18m-17m}, el H unido al O1 está entre este oxígeno y el O9. Con B3LYP la distancia H-O1 es de 1.24 Å y la O9-H de 1.17 Å. En esta estructura la densidad de espín está localizada en su mayor parte en los átomos C7 y C8. En el radical **17m**, la densidad de espín se encuentra localizada en el C8. La geometría del estado de transición de la última etapa, TS_{17m-15m}, presenta una distancia H-O9 de 1.50 Å. La densidad de espín de esta especie está repartida entre el H que se aleja, el C8 y, en menor medida el O9. En **15m**, la densidad de espín está localizada en el H, que ya no forma enlace con el O9.

Tabla 4.1.II - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios implicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados. Resultados B3LYP entre paréntesis.

	S^2		S		S^2		S
13m'	0,7562 (0,7548)	O9	1,02(0,67)	TS _{13m'-18m}	0,8850 (0,7572)	C7	0,80(0,35)
		C8	-0,13(-0,02)			O9	0,66(0,42)
		C7	0,06(0,16)			C8	-0,44(0,00)
		H _{C8}	0,05(0,10)			C6	-0,11(-0,02)
TS _{13m'-16m}	0,8112	O9	0,65	18m	0,7606 (0,7534)	C7	1,11(0,82)
		O1	0,67			C6	-0,17(-0,06)
		H _{O1}	-0,23			C10	-0,15(-0,04)
16m	0,7565 (0,7545)	O1	1,05(0,76)	TS _{18m-17m}	0,7703 (0,7550)	C7	0,52(0,37)
		C7	-0,15(-0,03)			C8	0,50(0,41)
		C8	0,01(0,14)				
TS _{16m-17m}	0,926 (0,7598)	C8	0,76(0,46)	17m	0,7612 (0,7527)	C8	1,00(0,84)
		O1	0,70(0,36)				
		C7	-0,57(-0,02)				
TS _{17m-15m}	0,9717 (0,7639)	H _{O9}	0,81(0,77)				
		C8	0,78(0,32)				
		O9	-0,54(-0,11)				

Modelo artemisinina

En este apartado se explica el mismo mecanismo pero haciendo uso de la artemisinina como modelo molecular.

Las energías relativas de los puntos estacionarios de estas reacciones se representan en el perfil de la Figura 4.1.34.

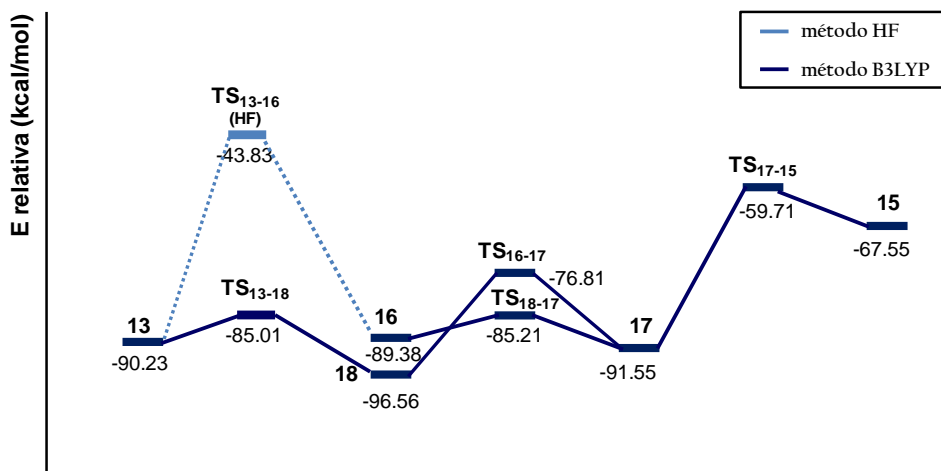


Figura 4.1.34 – Perfil de energía del proceso 13-15

Al igual que ocurría con el modelo simplificado, con B3LYP no se ha hallado la estructura de transición TS₁₃₋₁₆. La etapa 13-18 ha resultado ser exotérmica, la disminución en la energía es de 6 kcal/mol, mientras que se ha obtenido una barrera energética de 5 kcal/mol. Con el otro modelo se observaba la misma tendencia para esta etapa. La obtención de 17 se ha estudiado tanto a partir del C-radical 18 como del O-radical 16, a pesar de que como se ha dicho no se ha encontrado la conexión entre 13 y 16. En el primero de los casos la energía aumenta en 5 kcal/mol y la energía de activación es de 10 kcal/mol; mientras que en el segundo de los casos se ha obtenido que la reacción es exotérmica, con una estabilización de 1

kcal/mol y una energía de activación de 4 kcal/mol. Igual que con el otro modelo, por lo que se refiere a esta segunda etapa de reacción, la formación de **17** es más favorable si transcurre a través del intermedio **16**, tanto si se mira desde un punto cinético como termodinámico. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el TS_{13-16} solamente se ha obtenido con HF, el proceso es ligeramente endotérmico y requiere superar una barrera de energía mucho mayor que la que requiere el proceso **13-18**, que además es exotérmico. La tercera etapa, (**17-15**) común a las vías 1 y 2, presenta un incremento de energía de alrededor de 24 kcal/mol y una energía de activación de unas 32 kcal/mol. Estos resultados llevan a la misma conclusión que la obtenida con el otro modelo: si **15** se llega a formar, los dos caminos de reacción planteados competirán.

En la Figura 4.1.35 se pueden examinar las geometrías de los puntos estacionarios, que resultan muy similares a las obtenidas con el otro modelo molecular. La densidad de espín en **13** recae en el O9, que es el radicalario, aunque el C7 también alberga una pequeña parte de esta densidad, tal como se puede comprobar en la Tabla 4.1.12. En el TS_{13-16} (vía 1, datos HF), el H \cdot que estaba enlazado al O1 se encuentra entre éste y el O9, a una distancia de 1.20 Å y de 1.21 Å, respectivamente. La densidad de espín en **16** se encuentra mayoritariamente sobre el O1, tal como era de esperar. En la estructura de transición de la última etapa que lleva a **17** por la vía 1, TS_{16-17} , se está produciendo la ruptura C7-C8 y se está formando un enlace carbonilo C7-O1, de manera que la densidad de espín se encuentra repartida principalmente entre los átomos O1 y C8. En **17** esta densidad de espín ya está localizada sobre el C8. En el TS_{13-18} (vía 2), se produce también la ruptura C7-C8 y la densidad de espín está ubicada en O9 y C7. En **18**, puesto que se ha formado el grupo carbonilo, el electrón desapareado está localizado en C7. En la última estructura de transición de la vía 2 (que lleva a **17**), TS_{18-17} , el \cdot H está entre el O1 y el O9,

y la densidad de espín está distribuida entre los átomos C8 y C7. En el radical 17 el electrón desapareado está centrado en el C8. En la última de las etapas, en el TS₁₇₋₁₅ el H_{O9} se distancia de O9, de manera que la densidad de espín está repartida entre el H_{O9} que se aleja (0.75), el C8 (0.32) y, en menor medida el O9. En 15, la densidad de espín está localizada en el ·H, que ya no forma enlace con el O9.

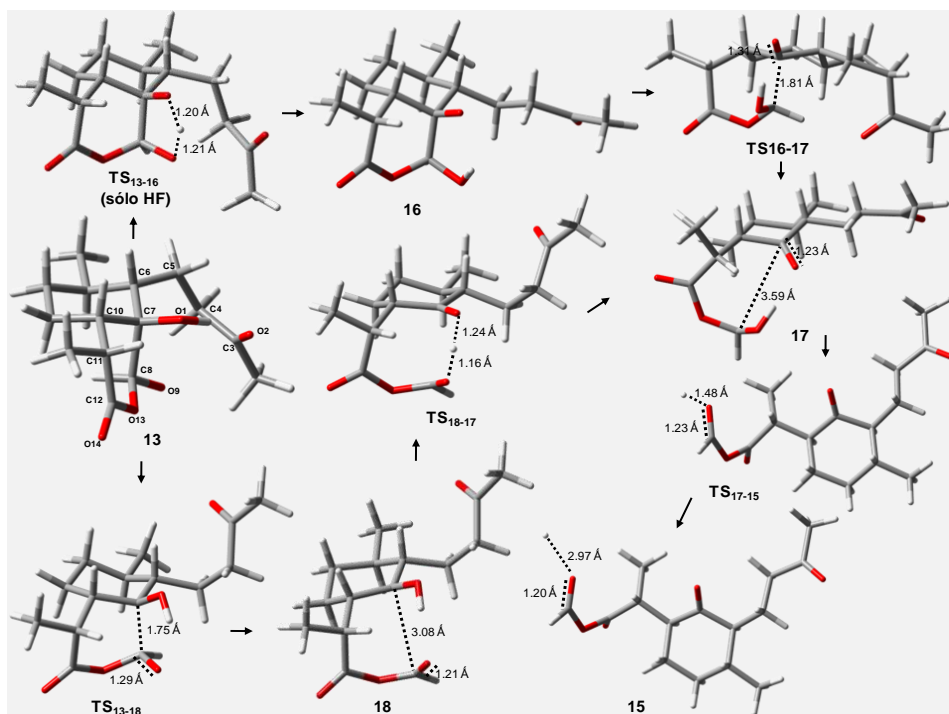


Figura 4.1.35 – Geometrías de los puntos estacionarios del proceso 13-15

Tabla 4.1.12 - Valores del operador S^2 para los puntos estacionarios indicados. Densidades de espín (S) de los átomos seleccionados.

	S^2		S		S^2		S
13	0,7560	O9	0,54	TS ₁₆₋₁₇	0,7570	O1	0,54
		C7	0,23			C8	0,25
		O1	0,09			C10	0,06
		H _{C8}	0,09			O13	0,06
16	0,7539	O1	0,79	17	0,7527	C8	0,84
		C10	0,07			O9	0,06
		C6	0,11			O13	0,05
TS ₁₇₋₁₅	0,7635	H _{O9}	0,75	TS ₁₃₋₁₈	0,7563	O9	0,58
		C8	0,32			C7	0,24
		O9	-0,11			C8	0,09
18	0,7535	C7	0,83	TS ₁₈₋₁₇	0,7560	C8	0,47
		C6	-0,06			C7	0,34
		O1	0,07			O13	0,05
		H _{C6}	0,05				
		H _{C10}	0,06				

4.1.6. Perfiles globales de reacción

En los anteriores apartados se han representado los perfiles individuales de cada una de las reacciones estudiadas. Para obtener una visión global de todos los procesos, la Figura 4.1.36 reúne el perfil de todas las reacciones de la ruta O1-radicalaria para el modelo reducido (**1m**), mientras que la Figura 4.1.37 agrupa estas mismas reacciones estudiadas con el modelo de la artemisinina (**1**). En estos perfiles solamente se han representado los resultados obtenidos con la metodología B3LYP.

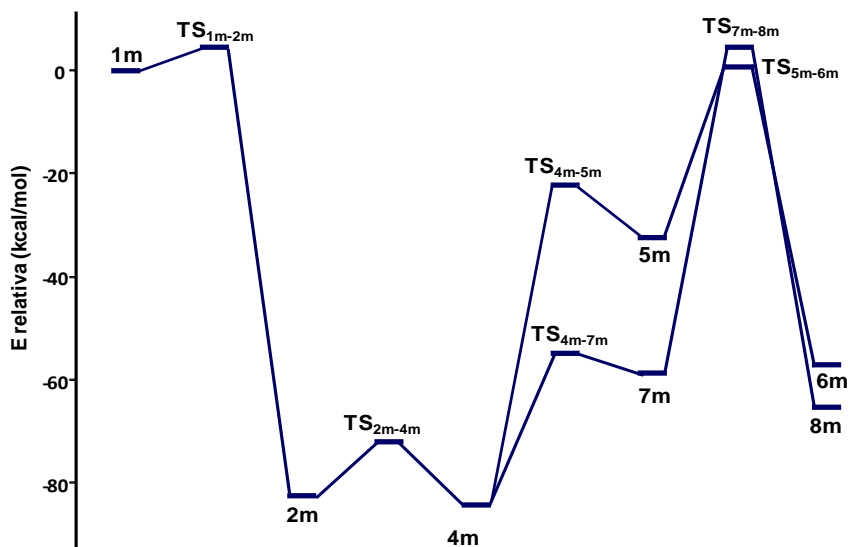


Figura 4.1.36 – Perfil de energía de la ruta O1-radicalaria con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano. Resultados obtenidos con la metodología B3LYP/6-31G(d,p)

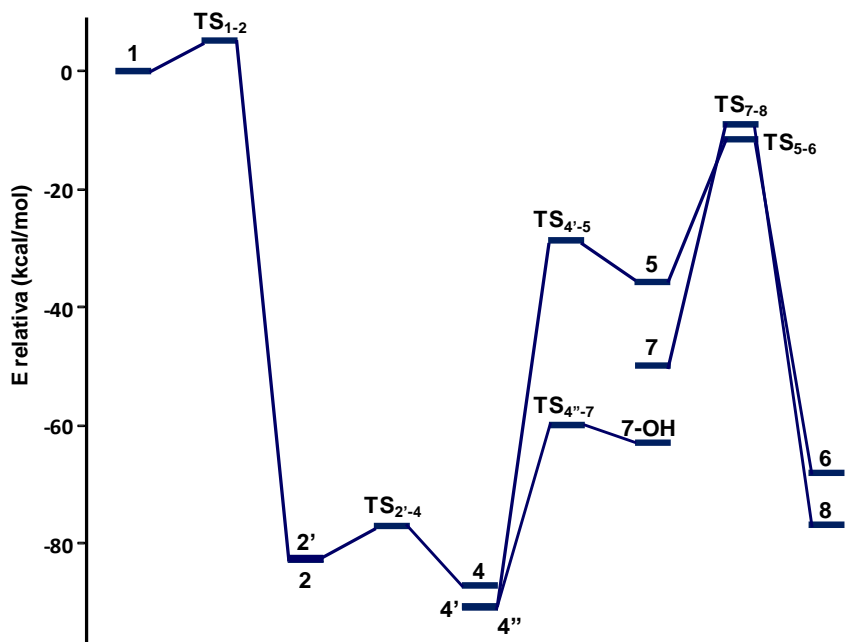


Figura 4.1.37 – Perfil de energía de la ruta O1-radicalaria con el modelo artemisinina. Resultados obtenidos con la metodología B3LYP/6-31G(d,p)

La activación de **1/1m** por reacción con un radical hidrógeno da lugar a la formación de **6/6m** y **8/8m** tras sucesivas etapas. De estos perfiles globales realizados para los dos sistemas modelo estudiados se concluye que la tendencia energética obtenida para ambos sistemas modelo es la misma. Los productos finales están muy próximos en energía, siendo **8m** 8 kcal/mol más estable que **6m**, y **8** 8,5 kcal/mol más estable que **6**. Las estructuras de transición de máxima energía para cada proceso, dejando aparte la estructura de transición inicial (TS_{1-2}/TS_{1m-2m}), son TS_{5-6}/TS_{5m-6m} y TS_{7-8}/TS_{7m-8m} , predecesores de **6/6m** y **8/8m** respectivamente, cuyo valor de energía está muy próximo. La mayoría de los puntos estacionarios de los procesos estudiados presentan energías menores que la estructura de transición inicial (TS_{1-2}/TS_{1m-2m}), por lo que la formación de los productos finales queda garantizada si la reacción se inicia. El único punto estacionario que no es más estable que el estado de transición inicial es TS_{7m-8m} . La competitividad entre los diferentes caminos de reacción está determinada por las condiciones experimentales utilizadas, de modo que dependiendo de estas condiciones se formará en mayor medida un producto u otro. En las Figuras 4.1.36 y 4.1.37 no se ha incluido el camino de reacción que da lugar a **8** a partir de **4''** pasando por la formación del intermedio **9**, ya que este paso únicamente tendría lugar si en el medio reactivo existiera una fuente de átomos de hidrógeno.

Las Figuras 4.1.38 y 4.1.39 representan las energías de las reacciones que transcurren a través de la ruta O2-radicalaria. Estos procesos, partiendo de **1/1m**, dan lugar a los productos finales **12/12m** y **15/15m**. La formación de **14/14m** también ha sido descrita, aunque éste no sea un producto neutro, sino un radical precursor de otras especies no estudiadas (ver Figura 4.1). Igual que en el caso de las reacciones de la ruta del radical-O1, solamente se han representado los resultados obtenidos con la metodología B3LYP.

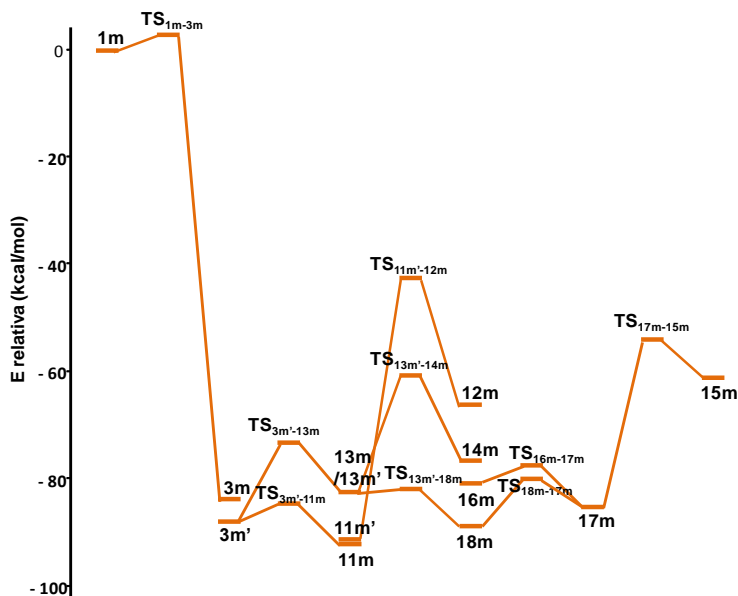


Figura 4.138 – Perfil de energía de la ruta O₂-radicalaria con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano. Resultados obtenidos con la metodología B3LYP/6-31G(d,p)

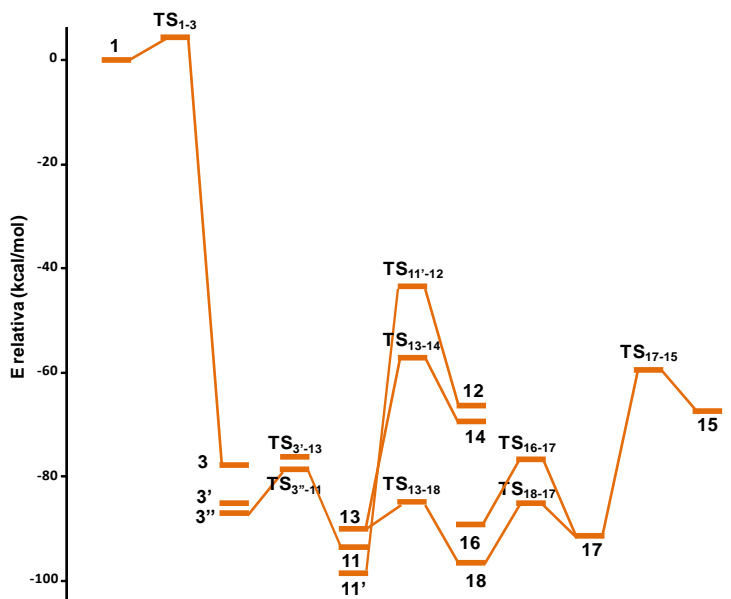


Figura 4.139 – Perfil de energía de la ruta O₂-radicalaria con el modelo artemisinina. Resultados obtenidos con la metodología B3LYP/6-31G(d,p)

De nuevo se obtienen productos finales muy cercanos en energía, siendo **12m** 5 kcal/mol más estable que **15m**; mientras que con el otro modelo se obtiene un orden inverso de estabilidad, ya que **15** es 1 kcal/mol más estable que **12**. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la vía del radical-OI, la diferencia energética de los estados de transición de mayor energía es bastante grande, siendo éstos $TS_{11'-12}$ / $TS_{11m'-12m}$ y TS_{17-15} / $TS_{17m-15m}$ para las rutas que llevan a **12/12m** y **15/15m**, respectivamente. Puesto que todos los puntos estacionarios son energéticamente más estables que la estructura de transición inicial (TS_{1-3} / TS_{1m-3m}), la formación de los productos tendrá lugar por competitividad de los diferentes caminos de reacción.

Estas observaciones se ven más claramente en la Figura 4.1.40, en la cual se representa la energía de los reactivos y estructuras de transición iniciales, las estructuras de transición de máxima energía y los productos, para ambos modelos moleculares estudiados.

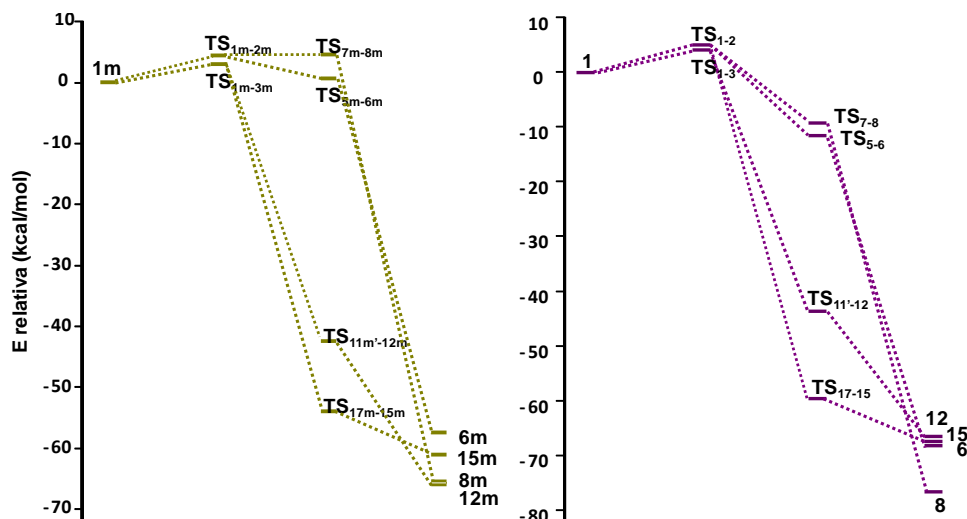


Figura 4.1.40 – Comparación de energía de reactivos, TSs iniciales, TSs de mayor energía y productos. Modelo molecular 6,7,8-trioxabicyclo [3.2.2]nonano en verde y modelo artemisinina en morado. Nivel de cálculo B3LYP/6-31G(d,p)

La formación de los productos **12/12m** y **15/15m** resulta más favorable, aunque la formación de los productos **6/6m** y **8/8m** también tiene lugar una vez la reacción de descomposición de la artemisinina se inicia, ya que los puntos más altos que superar son los TSs iniciales. Existe una excepción cuando se estudian las reacciones con el modelo simplificado, puesto que el TS_{7m-8m} se encuentra por encima del TS_{1m-2m} , aunque tan sólo se trata de 0,20 kcal/mol. Los cuatro productos finales se encuentran muy cercanos en energía, pero el orden de estabilidad es diferente para los dos modelos: con el modelo del 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano, el orden decreciente de estabilidad es: **12m**, **8m**, **15m** y **6m**; mientras que con el modelo de la artemisinina es: **8**, **6**, **15** y **12**. La diferencia energética entre **12m** y **6m** no llega a alcanzar las 9 kcal/mol, y entre **8** y **12** existe solamente una diferencia de 10 kcal/mol.

Conclusiones

Poniendo en común todos los caminos de reacción estudiados con los dos modelos moleculares (6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y artemisinina), se han explicado los mecanismos de reacción de la descomposición de la artemisinina hasta la formación de productos y se derivan las siguientes conclusiones:

a) Con los dos modelos estudiados se ha logrado reproducir el mecanismo propuesto en la bibliografía a partir de resultados experimentales, con las puntualizaciones siguientes:

- El proceso de formación de la especie **8** a partir de **9** se había postulado en dos etapas. Sin embargo, en todos los casos se ha encontrado que ocurre en una sola etapa concertada, de modo que se obtiene **8** y para ello se produce la eliminación de agua a través de dos

caminos alternativos: en cada uno de ellos es un oxígeno o el otro de los que inicialmente formaban el peróxido el que sale formando parte del agua.

· El proceso de formación de **15** a partir de **13** se había postulado en una sola etapa. Sin embargo, hemos caracterizado dos mecanismos distintos que transcurren a través de tres etapas, siendo la última común para ambos.

b) La irreversibilidad del proceso global está fuertemente marcada por la primera etapa de reacción, ya que los O-radicales formados tras la ruptura del puente peróxido de la artemisinina son mucho más estables que ésta, así como también lo son prácticamente todos los puntos estacionarios implicados en la formación de los productos finales.

c) Con ambos modelos, se ha demostrado la existencia de una vía de reacción que comunica las rutas del radical-O1 y del radical-O2, a través de las estructuras de transición $TS_{2'-3'}/TS_{2m'-3m'}$, de modo que los mecanismos estudiados no son independientes, sino que están interrelacionados a través de este camino de reacción. Esta conexión entre las rutas reactivas se ha demostrado también con el modelo de la artemisinina, donde además se ha encontrado otra estructura de transición que conecta las dos rutas, el $TS_{3''-4'}$.

d) Las especies con propiedades contra el parásito de la malaria pueden ser los C-radicales formados, tal como se había postulado experimentalmente. En nuestro estudio se han revelado especies lo suficientemente estables como para causar la inhibición de la degradación de la hemoglobina y/o la polimerización del grupo hemo y para actuar como agentes alquilantes de proteínas específicas del parásito.^[27] Viendo los casos concretos, de la ruta reactiva que transcurre

a través de $2/2m$, la especie más estable que se forma es $4/4m$, un C-radical secundario. En la ruta que transcurre a través del O-radical $3/3m$, son el C-radical primario $11'/11m$ y el C-radical terciario $18/18m$ las especies más estables.

e) Los resultados obtenidos permiten descartar el epóxido **5** como responsable de la acción antimalaria, dada su inestabilidad relativa. Posner propuso que el epóxido **5**, debido a su alto poder alquilante, era el responsable de la actividad de la artemisinina contra el parásito de la malaria, pero de los resultados presentados se deduce que este compuesto tiene una baja estabilidad intrínseca, de modo que parece más razonable la hipótesis de que los C-radicales son los responsables del efecto antimalaria. Este epóxido se ha encontrado como producto minoritario en algunos experimentos derivados de la descomposición de la artemisinina, aunque el grupo de Avery trató de aislar y estabilizar este epóxido sin ningún éxito. Además, se sintetizó un epóxido de estructura relacionada con la artemisinina y se demostró que éste carecía de actividad, lo que refuerza la conclusión de que los C-radicales son los que poseen el efecto antimalaria.^[5,10]

f) No existe un camino de reacción claramente preferente al resto, puesto que las diferencias en cuanto a energías y barreras de energía no son muy significativas. Con ambos modelos se ha obtenido que, tanto termodinámica como cinéticamente, las rutas reactivas que transcurren a través del intermedio $3/3m$ son más favorables que las que pasan por el intermedio $2/2m$, sin embargo las diferencias no son determinantes. Entre las vías reactivas que transcurren a través de $3/3m$ se obtiene que, con el modelo de la artemisinina, la que da lugar a **15** por la vía 2 es termodinámica y cinéticamente preferente a las otras; mientras que con el modelo molecular simplificado se obtiene la misma tendencia cinética,

aunque termodinámicamente prevalece la formación de **12m**. De las rutas que transcurren a través de **2/2m**, la más favorable termodinámicamente es la que da **8/8m** a través del intermedio **7/7m**, mientras que cinéticamente resulta ligeramente más favorecida la reacción que da lugar a **6/6m**. Estos resultados están de acuerdo con las diferentes observaciones experimentales, puesto que variando las condiciones de reacción puede favorecerse la formación de unos productos u otros.

g) La formación de **8** ha sido explicada mediante dos mecanismos diferentes, aunque el que pasa por la formación del intermedio **9** tiene lugar únicamente si existe una fuente de radicales hidrógeno en el medio de reacción. En cualquier caso, la aparición de **8** se explicaría también a través de la formación del alqueno **7** y eliminación de O=Fe(IV).

h) Uno de los puntos estacionarios (TS₁₃₋₁₆/TS_{13m'-16}) ha sido únicamente localizado a nivel HF/3-21G, pero no a nivel B3LYP/6-31G(d,p). Esto sugiere que es posible que la formación de **15** tenga lugar a través del intermedio **18**.

4.2. Estudio topológico con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(OH)₂ dihidratado como agente reductor

Las hipótesis acerca del agente reductor que cataliza la descomposición de la artemisinina asumen que especies de hierro en su estado ferroso (Fe(II)) son las que efectúan la transferencia electrónica que lleva a la formación de los C-radicales, supuestos responsables de la erradicación del parásito. Algunas investigaciones sugieren que el grupo prostético de la hemoglobina, es decir el hemo(Fe(II))-PPIX, ferroprotoporfirina IX), inicia la reactividad de la artemisinina,^[2, 7, 13, 14, 17, 28-34] mientras que otros

estudios defienden que la actividad de la artemisinina no requiere hemo, sino otros quelatos de hierro.^[4, 35-37]

Como se ha descrito en el Capítulo 1 (Introducción), el parásito de la malaria sintetiza sus propias proteínas para desarrollarse, y su mayor fuente de aminoácidos es la hemoglobina del huésped. En este proceso de degradación de la hemoglobina, que tiene lugar en la vacuola digestiva del parásito, se libera hemo libre, que resulta tóxico para el parásito debido a su habilidad de inhibir la actividad de algunas enzimas, así como de desestabilizar y romper membranas. Para su propia supervivencia, el parásito realiza un proceso de detoxificación del hemo, que principalmente consiste en la conversión del hemo en hemozoína, el pigmento de la malaria. La formación de la hemozoína implica, en primer lugar, la oxidación del hemo (Fe(II)-PPIX) a hemín (Fe(III)-PPIX) (seguramente por reacción con O₂), posteriormente se forman dímeros, denominados β-hematín, que finalmente se unen formando los cristales de hemozoína. La disrupción de la formación de la hemozoína es una de las estrategias más usadas para combatir la malaria. Recientemente se ha establecido que la reacción del hemo con la artemisinina es mucho más eficiente que la del hemín.^[38] Puesto que la reacción entre la artemisinina y el hemín es muy lenta, una vez el hemo se ha oxidado a hemín la formación de la hemozoína tendría lugar, incluso en presencia de artemisinina. De este modo, la disrupción del proceso por el cual se forma la hemozoína debe ocurrir antes de la oxidación del Fe(II) a Fe(III) por parte del O₂. Por tanto, puede postularse que en el primer paso de la formación de la hemozoína puede existir competitividad entre la artemisinina, que evita la formación de Fe(III) y por tanto de la hemozoína, y la molécula de oxígeno, que promueve su formación. En la Figura 4.2.1 se muestra un esquema de estos procesos.

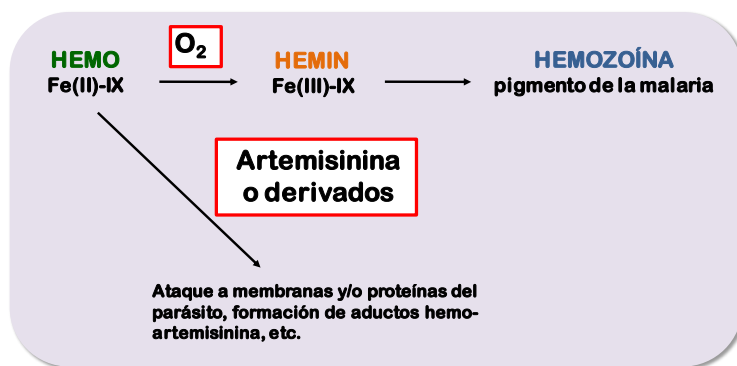


Figura 4.2.1 – Proceso competitivo entre el O₂ y la artemisinina o sus derivados

En este apartado la artemisinina ha sido modelada de nuevo con el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano (denominado **1m** en el apartado anterior, y **1f** en este apartado), ya que la validez de este modelo para simular la reactividad de la artemisinina ha sido demostrada en el apartado 4.1. Por su parte, el hemo ha sido modelado con el Fe(OH)₂ dihidratado (**fe**) en este primer estudio (ver Figura 4.2.2).

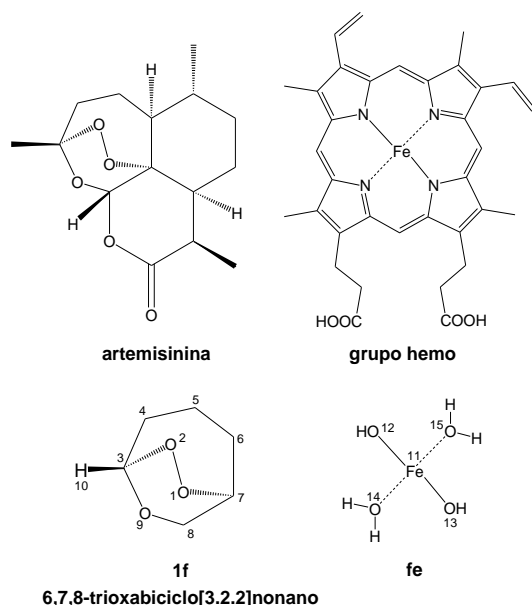


Figura 4.2.2 – Modelos moleculares para simular la artemisinina y el grupo hemo

Este estudio consiste, por un lado, en la localización y caracterización de los puntos estacionarios implicados en el proceso de descomposición del modelo de la artemisinina (If) catalizada por la molécula fe. Para ello, se ha utilizado el programa Gaussian03^[39] con la metodología DFT, concretamente con el funcional híbrido B3LYP^[21, 22] al nivel 6-311+G(d,p). Otros estudios teóricos demuestran la validez de los resultados obtenidos con funcionales híbridos DFT a la hora de tratar modelos del grupo hemo, que pueden presentar diferentes estados electrónicos. Los funcionales puros sobreestiman la estabilidad de los espines bajos de estos modelos del hemo, mientras que con el funcional B3LYP se obtienen prácticamente los mismos resultados que los que se alcanzan con metodologías más costosas, como CCSD, cuyo uso resulta impracticable con modelos complejos como el que aquí se utiliza.^[40] Puesto que la mayoría de las especies estudiadas presentan electrones desapareados, las energías de los puntos estacionarios se han calculado en función de su estado electrónico y con el formalismo UB3LYP (Unrestricted B3LYP). En la mayoría de los casos las moléculas presentan estado electrónico quintuplete, es decir, tienen cuatro electrones desapareados.

La metodología utilizada para estudiar estas reacciones incluye también el análisis topológico de la densidad electrónica basado en la *Función de Localización Electrónica* (ELF, *Electron Localization Function*), que proporciona información de la estructura de enlace. Asimismo, mediante la *Teoría de Átomos en Moléculas* (AIM, *Atoms In Molecules*), se explora la topología de la densidad electrónica y se describen con precisión los conceptos químicos de átomo, enlace y estructura. Estas metodologías han sido descritas con detalle en el Capítulo 3 (apartado 3.6). Los análisis AIM y ELF se han llevado a cabo a partir de la densidad electrónica calculada con la metodología B3LYP/6-311+G(d,p), con los programas

AIM2000^[41] y TopMoD^[42], respectivamente; y las isosuperficies ELF han sido visualizadas con el programa AMIRA 4.1.^[43]

4.2.1. Formación de los C-radicales y estudio de la competitividad entre la artemisinina y el O₂

En primer lugar se estudia el mecanismo de activación de la artemisinina por interacción con la molécula de Fe(II) que, basándose en el mecanismo global de la Figura 4.1 y adaptándolo a los sistemas modelo descritos, se representan en la Figura 4.2.3. Al igual que ocurría cuando el agente reductor era el radical hidrógeno, tras la reducción inicial del enlace endoperóxido, se forman paralelamente dos O-radicales, que seguidamente dan lugar a la formación de los radicales 4f y 11f, centrados en el átomo C4.

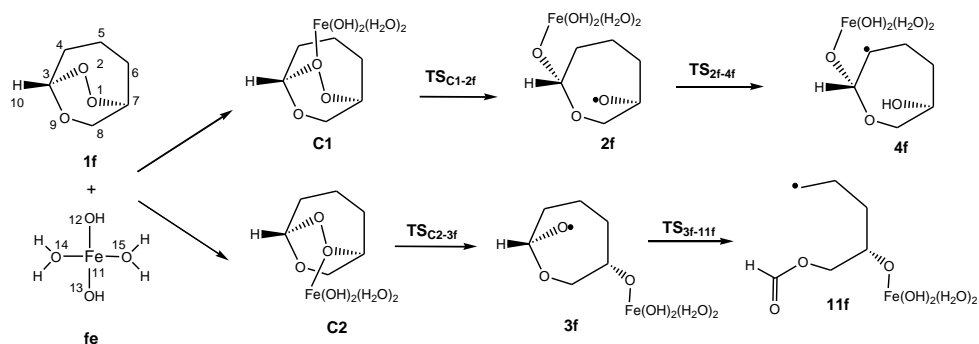


Figura 4.2.3 – Mecanismo de reacción de la descomposición de la artemisinina hasta la formación de C-radicales

Por aproximación de la molécula fe al O₂ de 1f se forma el complejo de interacción C1, que es 13,03 kcal/mol más estable que los reactivos de partida, poniendo de relieve la afinidad entre el Fe(II) y los oxígenos peroxídicos. En la Figura 4.2.4 se representan las geometrías de estas estructuras, y en la Figura 4.2.5 el perfil energético de estos procesos. Después de la formación del complejo C1, a través de una barrera de 2,78

kcal/mol, tiene lugar a la formación del radical centrado en O1 **2f**, 39,62 kcal/mol más estable que los reactivos iniciales. Por otra parte, si Fe se acerca al átomo O1, se forma el complejo **C2**, 9,64 kcal/mol más estable que los reactivos iniciales. Posteriormente, a través de una barrera de 1,77 kcal/mol, se forma el radical centrado en O2 **3f**, 42,51 kcal/mol más estable que **1f+Fe**. Como se puede observar en la Figura 4.2.4, a medida que el átomo de Fe se acerca al O2 o al O1, la distancia O1-O2 aumenta progresivamente desde **1f** hasta **2f** o **3f**, respectivamente. A partir del O-radical **2f**, superando una barrera de 12,81 kcal/mol se alcanza el C-radical **4f**, que es casi 2 kcal/mol más estable que **2f**. El TS_{2f-4f} está asociado a la migración del hidrógeno desde el C4 al O1, como se puede observar en la Figura 4.2.4 por los valores de las distancias H-C4 y H-O1. Partiendo de **3f**, a través de una pequeña barrera de energía de 2,08 kcal/mol se alcanza el C-radical **11f**, que es la especie más estable de todas las estudiadas. El TS_{3f-11f} está asociado a la ruptura del enlace C3-C4, puesto que esta distancia aumenta progresivamente desde **3f** a **11f**.

La ruta que transcurre a través de la formación del radical **3f**, centrado en O2, resulta más favorable termodinámica y cinéticamente que la ruta que transcurre a través de **2f**. Estos resultados concuerdan con los experimentos realizados *in vivo*, puesto que hasta la fecha la única alquilación completamente caracterizada en ratones infectados es la alquilación del grupo hemo por parte del C-radical **11f**.^[18, 32]

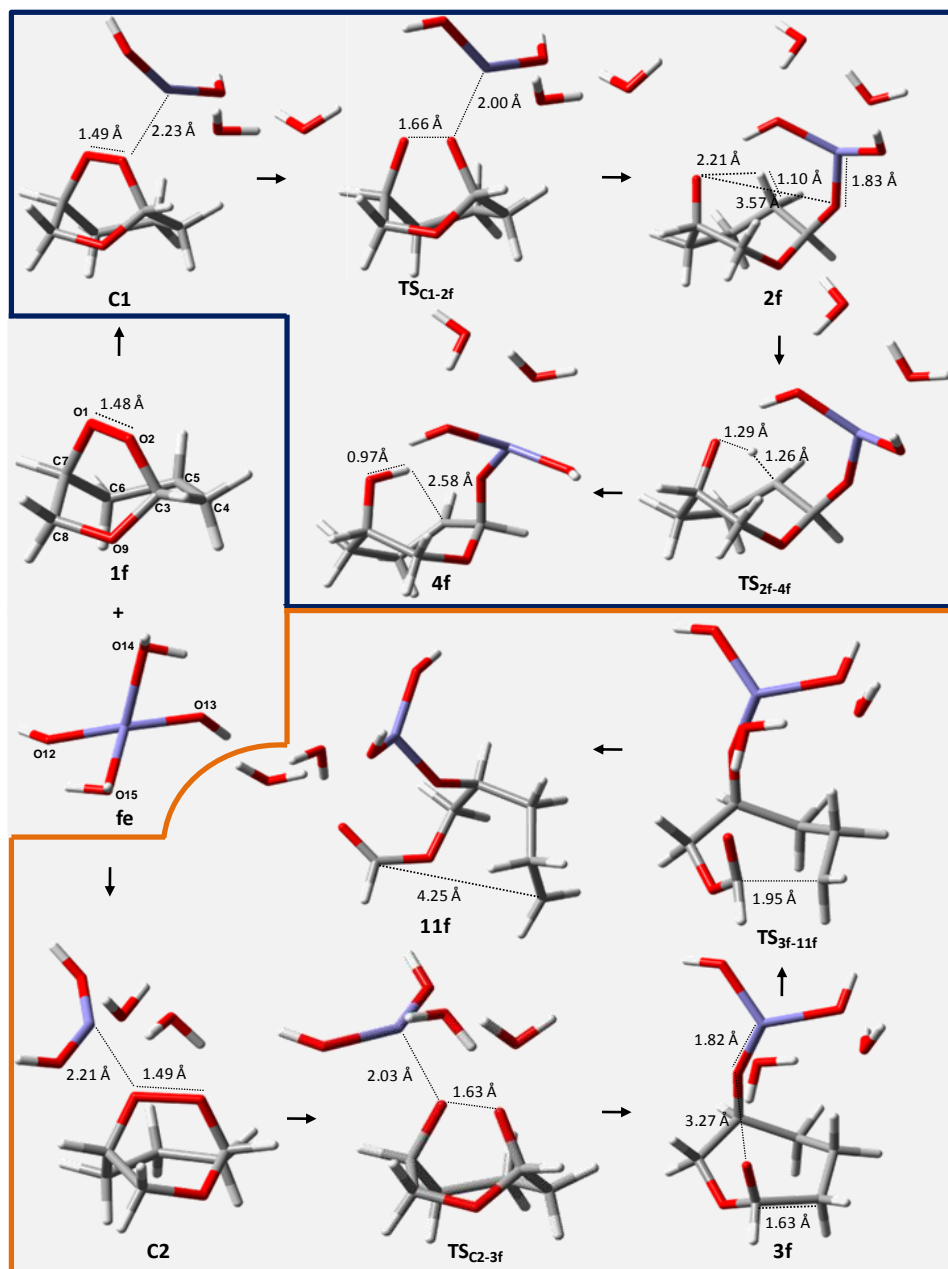


Figura 4.2.4 – Geometrías de los puntos estacionarios implicados en la formación de **4f** y **11f**

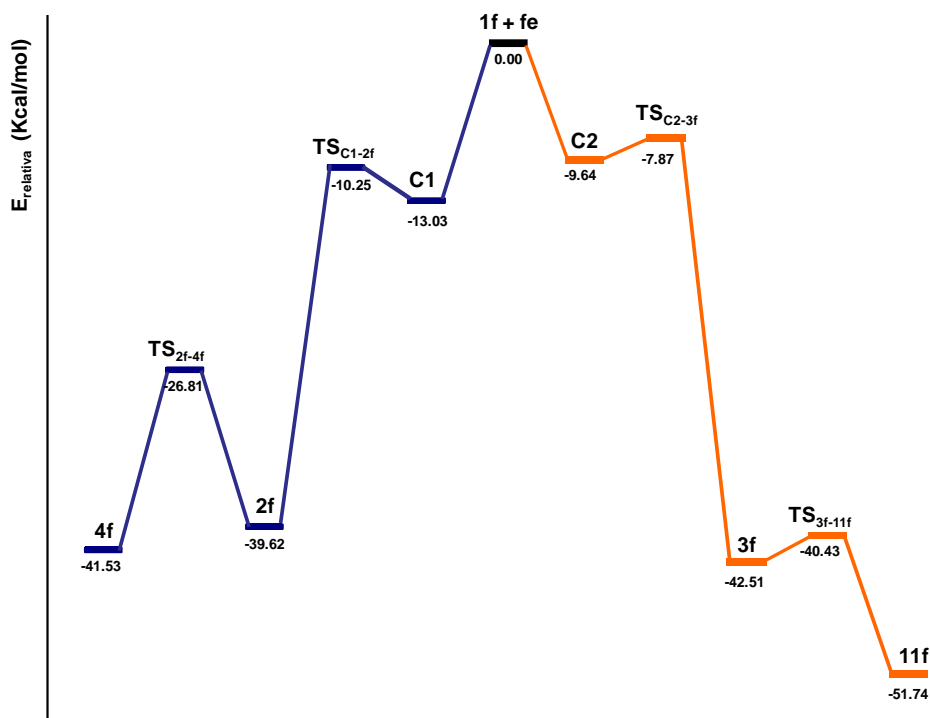


Figura 4.2.5 – Perfil de energía de las reacciones que dan lugar a los C-radicales 4f y 11f

Por otra parte, si el complejo fe se aproxima a una molécula de oxígeno, se forma el complejo de interacción C3, mostrado en la Figura 4.2.6 y cuya formación no pasa por ninguna barrera energética perceptible. Sin embargo, la estabilización que se alcanza es mucho menor que la que tiene lugar por la formación de los complejos C1 o C2. El estado electrónico de mayor estabilidad para C3 es el septuplete, que se encuentra únicamente 2,42 kcal/mol por debajo de los reactivos separados, es decir, por debajo de fe en estado quintuplete y de O₂ en su estado fundamental triplete. En consecuencia, el modelo de Fe(II) reacciona preferentemente con especies que presenten enlaces peróxido, como el modelo de la artemisinina utilizado, que con oxígeno molecular. Si estas conclusiones se extrapolan al sistema real, la artemisinina reaccionará más favorablemente con el grupo hemo que con la molécula

de oxígeno. Así pues, la oxidación inicial de hemo a hemín no tendría lugar en presencia de artemisinina, y el proceso que utiliza el parásito para eliminar el hemo tóxico queda interrumpido.

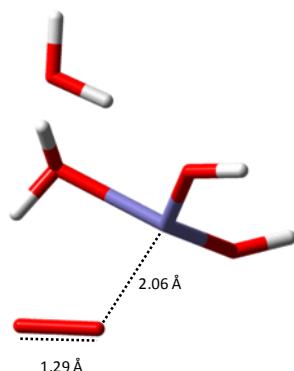


Figura 4.2.6 – Estructura del complejo (C3) entre el modelo de Fe(II) y el oxígeno

4.2.2. Análisis topológico de las reacciones de obtención de los C-radicales

If y fe:

El análisis ELF de If indica que el enlace peróxido O1-O2 es deficiente en electrones, puesto que entre estos átomos de oxígeno existen dos cuencas monosinápticas de 0,26 y 0,28 electrones (ver Figura 4.2.7). En cambio, las cuencas correspondientes a los pares solitarios de estos oxígenos presentan poblaciones más elevadas de lo normal (más de 2,5 electrones cada una), compensando la baja población de las cuencas del peróxido.

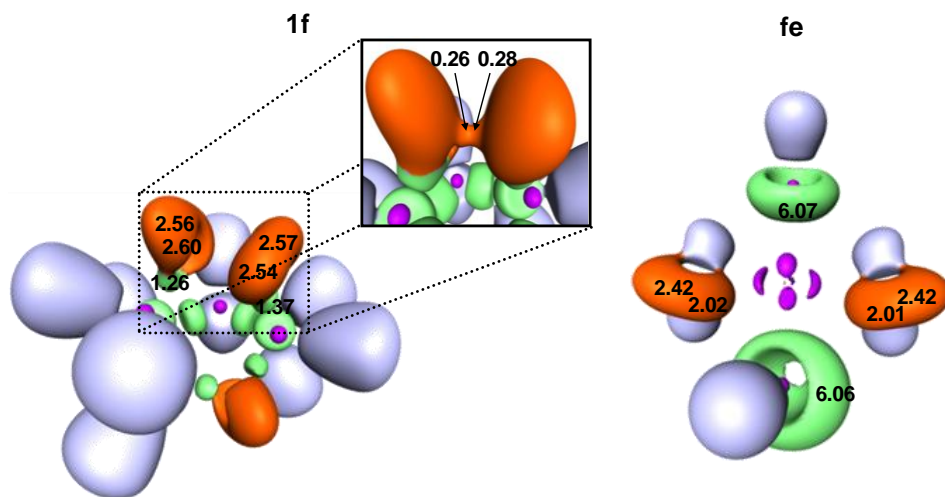


Figura 4.2.7 – Isosuperficies ELF de 1f y fe dibujadas con un valor de 0,815, excepto para las cuencas monosinápticas del enlace endoperóxido, que han sido representadas para el valor de 0.665

Además, en el mapa de contorno de la laplaciana de la densidad electrónica (Figura 4.2.8) se puede ver cómo el BCP (*Punto Crítico de Enlace*, ‘*Bond Critical Point*’) de este enlace está ubicado en una región de dispersión de carga electrónica, puesto que las líneas de esta zona son discontinuas. Esta tendencia se puede ver también en el valor positivo de la laplaciana ($\nabla^2\rho(r)$) mostrado en la Tabla 4.2.1 que, junto al valor no muy negativo de la energía de la densidad electrónica ($E_d(r)$), refleja la estabilidad relativamente pequeña del enlace. Sin embargo, el valor más bien elevado de la densidad electrónica ($\rho(r)$), hace que este enlace pueda ser descrito como una interacción relativamente covalente. En trabajos de Sambrano y colaboradores se han analizado diferentes sistemas con enlaces peróxidos y se ha encontrado esta misma topología con dos cuencas monosinápticas conformando el enlace.^[44] Desde el punto de vista de la Teoría de Catástrofes esta topología de ELF, también encontrada en estudios de la molécula F_2 por Llusar y colaboradores, corresponde a la formación/ruptura del enlace a través de una catástrofe

de tipo cúspide y, consecuentemente, se le ha denominado ‘enlace protovalente’.^[45] Este tipo de enlace ha sido identificado en otros sistemas en los que existen enlaces peróxidos.^[46]

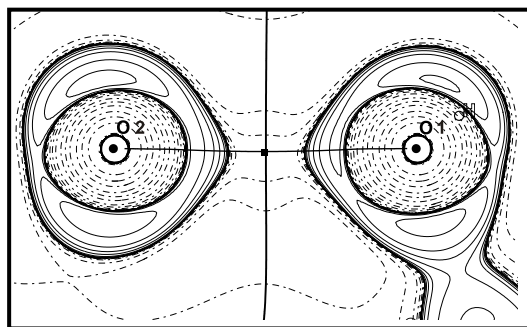


Figura 4.2.8 – Mapa de contorno de la laplaciana de la densidad electrónica del enlace O1-O2 de If

Tabla 4.2.1 - Propiedades electrónicas de los puntos críticos de enlace (BCP) implicados en las reacciones para los puntos estacionarios encontrados. Densidad electrónica, $\rho(r)$ (unidades atómicas), laplaciana de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(r)$ (unidades atómicas), y energía de la densidad electrónica, $E_d(r)$ (unidades atómicas)

	enlace	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$E_d(r)$
If	O1-O2	0,255	0,121	-0,152
fe	O12-Fe	0,111	0,615	-0,020
	O13-Fe	0,111	0,622	-0,020
	O14-Fe	0,038	0,179	0,000
	O15-Fe	0,038	0,179	0,000
Cl	O1-O2	0,250	0,140	-0,145
	O2-Fe	0,043	0,239	0,002
TS _{Cl-2f}	O1-O2	0,156	0,343	-0,045
	O2-Fe	0,075	0,456	-0,001
2f	O1-O2	—	—	—
	O2-Fe	0,118	0,687	-0,023
	C4-H	0,274	-0,905	-0,270
	O1-H	0,016	0,062	0,003
TS _{2f-4f}	C4-H	0,176	-0,352	-0,130
	O1-H	0,145	0,030	-0,081

	enlace	$\rho(\mathbf{r})$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r})$	$E_d(\mathbf{r})$
4f	C4-H	—	—	—
	O1-H	0,353	-0,240	-0,682
C2	O1-O2	0,248	0,145	-0,143
	O1-Fe	0,045	0,253	0,002
TS _{C2-3f}	O1-O2	0,168	0,328	-0,056
	O1-Fe	0,071	0,421	-0,001
3f	O1-O2	—	—	—
	O1-Fe	0,125	0,706	-0,029
	O2-C3	0,337	-0,395	-0,521
	C3-C4	0,188	-0,309	-0,126
TS _{3f-11f}	O2-C3	0,378	-0,329	-0,616
	C3-C4	0,090	-0,006	-0,034
11f	O2-C3	0,410	-0,171	-0,690
	C3-C4	—	—	—
O ₂	O-O	0,539	-0,765	-0,659
C3	O-O	0,424	-0,317	-0,419
	Fe-O	0,080	0,314	-0,006

En la molécula fe existe una cuenca disináptica entre cada átomo de oxígeno del grupo hidroxilo y el Fe, tal como se puede comprobar en la Figura 4.2.7. Los átomos de oxígeno de las moléculas de agua presentan dos cuencas monosinápticas de alrededor de 2 electrones cada una, que corresponden a los pares solitarios. Los BCP localizados entre los oxígenos de los grupos OH y el Fe (ver Tabla 4.2.1) presentan valores positivos de la laplaciana, lo que significa que están en zonas de dispersión de carga. Aún así, el valor de la densidad electrónica junto al valor pequeño pero negativo de la energía de la densidad electrónica, demuestra la formación del enlace. En cambio, los BCP entre los oxígenos de las moléculas de agua y el Fe presentan valores positivos de la laplaciana, valores muy pequeños de la densidad electrónica y la energía de la densidad electrónica nula, lo que concuerda con el hecho de que simplemente se encuentran coordinados al átomo de Fe, pero no forman un enlace.

Descripción topológica de C1, TS_{C1-2f}, 2f, TS_{2f-4f} y 4f

Haciendo uso de los análisis ELF y AIM, se ha descrito rigurosamente el movimiento electrónico que tiene lugar en el transcurso de las reacciones químicas. Tras la formación del complejo C1, por aproximación del átomo de hierro de fe al O2 de If, todavía se hallan las cuencas monosinápticas correspondientes al enlace peróxido (ver Figura 4.2.9) que se encontraban en If, mientras que en el TS_{C1-2f} ya desaparecen, puesto que empieza a romperse el enlace. Cabe observar que la morfología de las cuencas de los oxígenos peroxídicos (O1 y O2) en C1 y TS_{C1-2f} es la misma que en If, así que la aproximación del átomo de Fe no cambia la estructura de los pares solitarios de dichos oxígenos, lo que significa que esta estructura de transición se parece más bien a reactivos por lo que respecta a la coordenada Fe-O2. Sin embargo, en 2f esta morfología es diferente debido a la formación del enlace Fe-O2. Las cuencas correspondientes al átomo O2 pasan de ser una monosináptica y otra disináptica en C1, a ser ambas disinápticas en TS_{C1-2f} y una única cuenca disináptica en 2f, poniendo de manifiesto la formación del enlace Fe-O2. Por otra parte, el incremento de población de las cuencas monosinápticas del O1 al ir de C1 a TS_{C1-2f}, junto con la desaparición de las cuencas monosinápticas entre O1 y O2, muestra que el TS_{C1-2f} es de carácter tardío por lo que se refiere a la coordenada O1-O2. En 2f la morfología de las cuencas correspondientes a O1 y O2 es diferente, por un lado se ha formado el enlace O2-Fe, lo que queda reflejado por la cuenca disináptica entre estos dos átomos; mientras que por otro lado, la población electrónica en O1 es bastante elevada, lo que indica que esta ganancia electrónica proviene de la ruptura del enlace peróxido. Además, la población de la cuenca disináptica entre O1 y C7 aumenta desde C1 a 2f, mostrando también el carácter radicalario de O1.

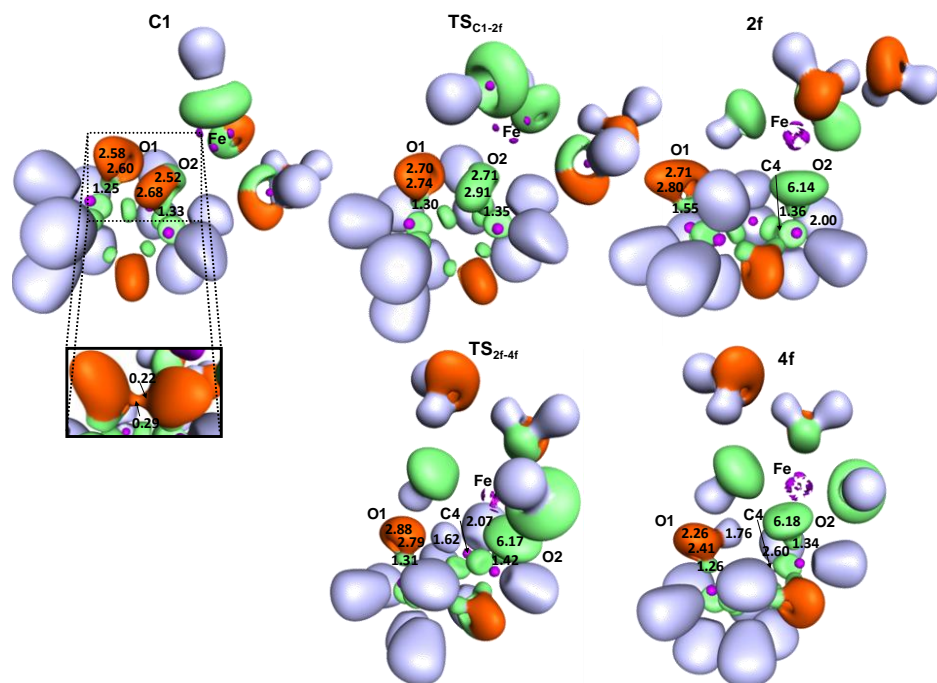


Figura 4.2.9 – Isosuperficies ELF de C1, TS_{C1-2f}, dibujadas con un valor de 0,815 y de 2f, TS_{2f-4f} y 4f, dibujadas con un valor de 0.784. Las cuencas monosínapticas del enlace endoperoxido, han sido representadas para el valor de 0.665

En base a los valores AIM mostrados en la Tabla 4.2.1, queda demostrada la formación del enlace Fe-O2 y la ruptura del enlace O1-O2. El BCP localizado entre Fe y O2, al ir de C1 a TS_{C1-2f} y luego a 2f, aumenta la $\rho(r)$. La $E_d(r)$ de este BCP pasa de un valor positivo (por tanto demuestra inestabilidad del enlace) en C1, a un valor pequeño negativo en TS_{C1-2f} y a un valor más negativo en 2f. En cuanto al valor de $\nabla^2\rho(r)$ del mismo BCP, éste es positivo en los tres puntos estacionarios, por lo tanto se encuentra ubicado en zonas de dispersión de carga, y su valor aumenta al ir de reactivos a productos, lo cual quiere decir que se trata de un enlace de carácter iónico. En el mapa de contorno de la laplaciana de la Figura 4.2.10 se puede observar que este BCP se encuentra en una zona discontinua, lo cual confirma que se halle en una región de dispersión de carga, y por tanto su carácter iónico. El BCP hallado entre O1 y O2,

disminuye el valor de $\rho(r)$ al pasar de **Cl** a **TS_{Cl-2f}**, mientras en **2f** no se ha encontrado un BCP entre estos átomos (cosa que también se puede ver en la Figura 4.2.10), lo cual demuestra la ruptura del enlace peróxido. Además, el valor de $E_d(r)$ en este BCP es menos negativo al pasar de **Cl** a la estructura de transición, mientras que el valor de $\nabla^2\rho(r)$ se hace más positivo, resultados que de nuevo confirman la ruptura del enlace O1-O2.

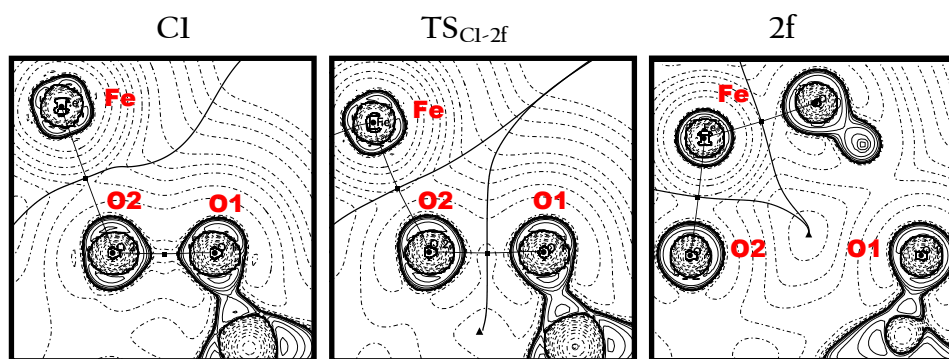


Figura 4.2.10 – Mapas de contorno de la laplaciana de la densidad electrónica del plano O1-O2-Fe de los puntos estacionarios indicados

Analizando con ELF la reacción posterior, en **TS_{2f-4f}** existe una cuenca hidrogenada entre O1 y C4 poblada con 1,62 electrones, que corresponde al hidrógeno que se transfiere, como se muestra en la Figura 4.2.9. En este punto estacionario, las cuencas que corresponden a los pares solitarios del O1 están todavía bastante pobladas (prácticamente como **2f**), lo que indica que la transferencia del hidrógeno todavía no se ha completado. En **4f**, la población de estas cuencas monosinápticas del O1 es menor que en el **TS_{2f-4f}**, la diferencia concreta entre éstas es de un electrón, lo que significa que **TS_{2f-4f}** todavía puede ser descrito como un radical centrado en O1, mientras que en **4f** el O1 ha pasado a formar un grupo alcohol, y el electrón desapareado recae en C4, tal como queda demostrado por el exceso de 0,60 electrones en la única cuenca hidrogenada perteneciente al C4 y por el exceso en 0,25 electrones en la cuenca disináptica que existe entre C4 y C5.

El estudio AIM de este paso del mecanismo de reacción explica la ruptura del enlace C4-H (ver Tabla 4.2.1). La disminución del valor de $\rho(r)$ en el BCP entre C4 y H, al pasar de **2f** a TS_{2f-4f} , y el hecho de que no existe un BCP entre dichos átomos en **4f**, explican la ruptura del enlace. Tanto $E_d(r)$ como $\nabla^2\rho(r)$ pasan a tener valores menos negativos al ir de **2f** a TS_{2f-4f} , lo cual indica que el enlace se hace menos estable y que la concentración de carga entre dichos átomos disminuye. Por otro lado, la formación del enlace O1-H se explica por el aumento de $\rho(r)$ en el transcurso de la reacción; la evolución de $E_d(r)$ desde un valor positivo en **2f**, a un valor pequeño negativo en TS_{2f-4f} y un valor muy negativo en **4f**; y por el paso de valores de $\nabla^2\rho(r)$ positivos en reactivos y estado de transición a un valor negativo en **4f**, lo cual indica que en este último punto estacionario este BCP presenta acumulación de carga.

Descripción topológica de **C2**, TS_{C2-3f} , **3f**, TS_{3f-11f} y **11f**

Como puede verse en la Figura 4.2.11, al pasar de **C2** a TS_{C2-3f} , las cuencas correspondientes a los electrones desapareados de O1 y O2 aumentan su población. Al igual que ocurría al pasar de **C1** a TS_{C1-2f} , la morfología de estas cuencas es la misma, por lo que la interacción Fe-O1 no es suficientemente significativa todavía. Una vez formado **3f**, esta morfología es diferente, además entre el core de los átomos O1 y Fe existe una cuenca disináptica que indica la formación del enlace entre estos átomos. El carácter radicalario del O2 viene determinado por el aumento de la población de sus cuencas monosinápticas y también por el aumento de población de la cuenca disináptica que se halla entre los cores O2 y C3, consecuencia de la deslocalización. Al igual que con la estructura de transición análoga (TS_{C1-2f}), el TS_{C2-3f} se asemeja a reactivos por lo que respecta a la coordenada Fe-O1. En **C2** se encuentran dos cuencas monosinápticas entre O1 y O2 que en TS_{C2-3f} ya no existen. Este hecho,

junto al aumento de población de las cuencas monosinápticas del O2, marca la semejanza de esta estructura de transición respecto al producto 3f. Así pues, la ruptura del enlace peróxido es la que inicia la reorganización electrónica que conduce a la formación del C-radical 11f.

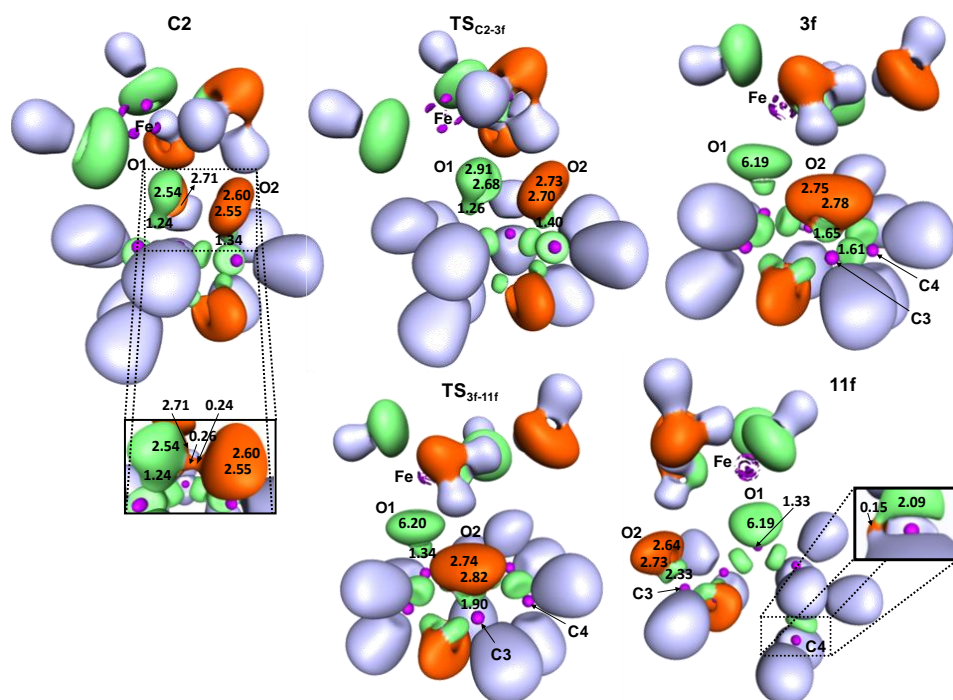


Figura 4.2.11 – Isosuperficies ELF de C2, TS_{C2-3f}, dibujadas con un valor de 0,815 y de 3f, TS_{3f-11f} y 11f, dibujadas con un valor de 0,784. Las cuencas monosinápticas del enlace endoperóxido en C2 y la cuenca monosináptica del C4 en 11f que han sido representadas para el valor de 0,665

El análisis AIM de estas reacciones, mostrado en la Tabla 4.2.1, confirma la formación del enlace Fe-O1 y la ruptura del enlace O1-O2. El pequeño valor de la $\rho(r)$ obtenido para el BCP ubicado entre los átomos Fe y O1 en C2, aumenta progresivamente al pasar por TS_{C2-3f} hasta formarse 3f. La $E_d(r)$ de este BCP es positiva en C2 y pasa a valores cada vez más negativos hasta llegar a 3f, lo cual indica que el enlace se hace cada vez

más estable. Sin embargo, los valores de $\nabla^2\rho(r)$ de este BCP pasa a valores cada vez más positivos desde reactivos a productos, lo cual indica que, aunque el enlace es estable por lo que se ha explicado anteriormente, éste presenta carácter iónico. La ruptura del enlace O1-O2 se explica por la disminución de la $\rho(r)$ del BCP entre O1 y O2 al pasar de C2 a TS_{C2-3f} , así como por la no aparición de BCP entre estos átomos en 3f. Además, el valor de $E_d(r)$ de este BCP revela la pérdida de estabilidad del enlace al avanzar la reacción; y el aumento del valor positivo de $\nabla^2\rho(r)$ al pasar de C2 al estado de transición indica que el BCP está en zona de mayor dispersión de carga, lo cual es también indicativo de la ruptura del enlace. La existencia de los BCP nombrados, así como el valor positivo de $\nabla^2\rho(r)$ de todos estos BCPs, se puede ver gráficamente en los mapas de contorno de la laplaciana de la Figura 4.2.12.

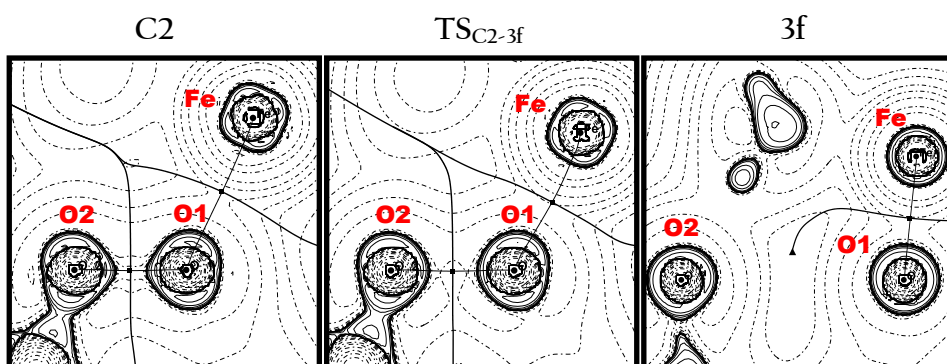


Figura 4.2.12 – Mapas de contorno de la laplaciana de la densidad electrónica del plano O1-O2-Fe de los puntos estacionarios indicados

Un aspecto a destacar si se observan los mapas de contorno de las Figuras 4.2.8, 4.2.10 y 4.2.12, es que en If, C1 y C2 aparece una protuberancia en cada átomo de oxígeno (O1 y O2), apuntado hacia el BCP. Esta región más prominente corresponde a la densidad electrónica que pertenece a las cuencas monosinápticas localizadas entre O1 y O2 en el estudio ELF. Los correspondientes mapas de contorno del TS_{C1-2f} ,

TS_{C2-3f}, 2f y 4f muestran la desaparición de esta protuberancia, debido a la desaparición de densidad electrónica en esa región.

El siguiente paso de reacción lleva a la ruptura del enlace C3-C4, y en 3f existe una cuenca disináptica entre dichos átomos que desaparece en el TS_{3f-IIf}, lo que pone de manifiesto la ruptura del enlace. Además, la población de la cuenca disináptica localizada entre O2 y C3 aumenta al ir transcurriendo la reacción, de modo que el aumento de carga electrónica de esta cuenca en II f se traduce en la formación de un enlace aldehído. El carácter radicalario de II f se manifiesta por deslocalización de la carga entre una cuenca monosináptica de 0,15 electrones ubicada en C4 y la elevada población de la cuenca disináptica entre C4 y C5.

Estudiando esta reacción con AIM (ver Tabla 4.2.1), se encuentra un BCP entre los átomos de C3 y C4 en las estructuras 3f y TS_{3f-IIf}, mientras que no ha sido hallado ningún BCP entre estos átomos en II f. La $\rho(r)$ de este BCP disminuye al ir de 3f a TS_{3f-IIf}, y la $E_d(r)$ y la $\nabla^2\rho(r)$ pasan a ser menos negativas. Todos estos indicios explican la ruptura del enlace. Por otra parte, los cambios en los parámetros que experimenta el BCP localizado entre O2 y C3 indican el fortalecimiento de dicho enlace, puesto que la $\rho(r)$ experimenta un aumento, y la $E_d(r)$ se hace más negativa. El valor de $\nabla^2\rho(r)$ pasa a ser menos negativo; esto se da porque el enlace presenta cierto carácter iónico. Aún así el BCP se encuentra en zona de acumulación de carga en todos los puntos estacionarios (3f, TS_{3f-IIf} y II f).

Descripción topológica de O₂ y C3

El estudio ELF de la molécula de O₂ muestra la presencia de una cuenca disináptica entre los átomos de oxígeno, cuya población se reduce una vez formado el complejo C3. En la Figura 4.2.13 se muestran estas

estructuras ELF. La topología del enlace O-O en C3 es muy distinta de la del enlace peróxido en C1 y C2, puesto que en estas últimas estructuras dos cuencas monosinápticas constituyen el enlace 'protocovalente' entre los átomos de oxígeno del peróxido. Por otra parte, se ha encontrado una cuenca disináptica entre el átomo de hierro y uno de los átomos de oxígeno. Las cuencas monosinápticas de los átomos de oxígeno en O₂ tienen un exceso de carga electrónica que refleja el carácter paramagnético de la molécula. En C3 las cuencas monosinápticas del oxígeno que no está unido al hierro están sobrepobladas, debido al carácter radicalario de dicho oxígeno.

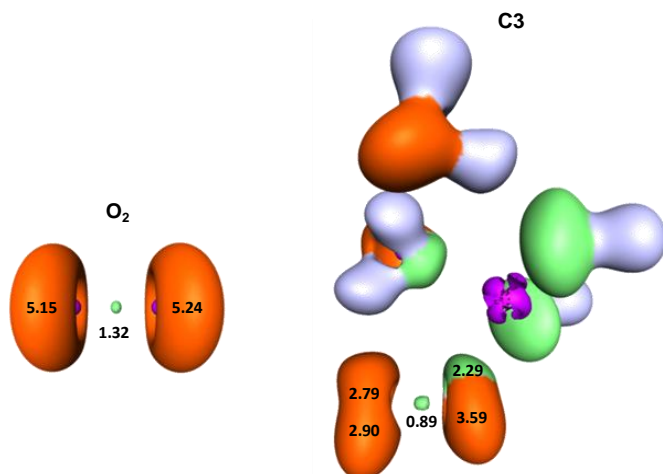


Figura 4.2.13 – Isosuperficies ELF de O₂ y C3 dibujadas para el valor de 0.784

El estudio AIM de O₂ y C3 (ver Tabla 4.2.1) demuestra la existencia de un BCP entre los átomos de oxígeno, localizados en ambos casos en una zona de concentración de carga como indica tanto el valor negativo de $\nabla^2\rho(r)$ como las líneas continuas en las que se encuentra el BCP (ver Figura 4.2.14). La densidad electrónica ($\rho(r)$) del mismo BCP disminuye un poco al pasar de O₂ a la formación del C3, ya que se deslocaliza la carga entre los átomos de oxígeno. Los valores altamente negativos de $E_d(r)$, junto con los valores mencionados de $\nabla^2\rho(r)$ y $\rho(r)$, muestran el

carácter covalente del enlace O-O, así como su estabilidad. Por otra parte, el BCP ubicado entre el átomo de hierro y uno de los átomos de oxígeno de C3 resulta una interacción más bien iónica, como el valor positivo de $\nabla^2\rho(r)$, el valor pequeño de $\rho(r)$ y el valor también pequeño y negativo de $E_d(r)$ indican.

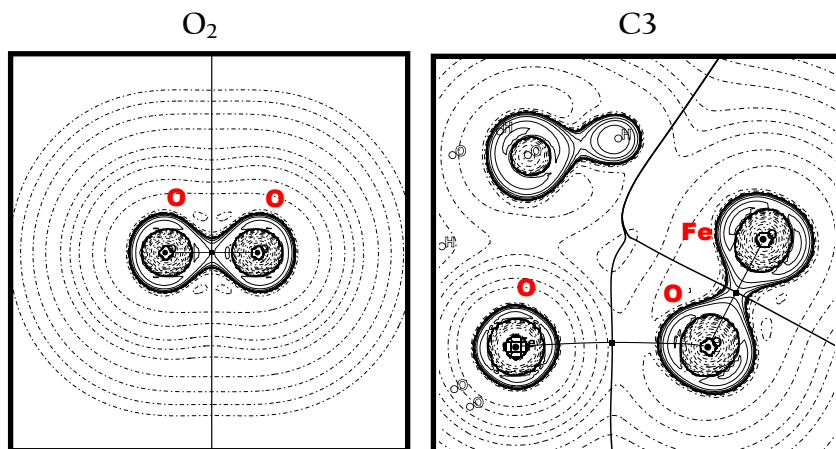


Figura 4.2.14 – Mapas de contorno de la laplaciana de la densidad electrónica del plano de O₂ y C3

La comparación de los valores obtenidos con AIM para el BCP localizado entre átomos de oxígeno en O₂ y en If, pone de relieve la fortaleza del enlace en la molécula de oxígeno frente a dicho enlace en la artemisinina. De estos resultados se concluye que el enlace O-O en If es mucho más reactivo que en O₂, lo que explica de nuevo que la reacción del modelo ferroso se dé preferentemente con especies que contienen enlaces endoperóxido que con el oxígeno molecular.

Conclusiones

✓ Como conclusión más general, cabe decir que se ha llevado a cabo el estudio de las etapas de reacción que, a partir de un modelo de la artemisinina que es reducida por una molécula que modela al grupo hemo, llevan a la formación de los C-radicales **4f** y **IIf**. Este estudio ha sido realizado utilizando un sistema que contiene un átomo de hierro, lo que constata el potencial del trabajo, puesto que hasta la fecha no habían sido localizadas estructuras de transición para sistemas de la artemisinina empleando modelos moleculares que contienen hierro.

✓ Asimismo, los resultados obtenidos aportan un nuevo punto de vista al estudio del modo de acción antimalaria de la artemisinina, puesto que se ha realizado un estudio centrado en los aspectos topológicos de la reacción entre los modelos de hemo y la artemisinina. Haciendo uso de la metodología ELF se ha realizado un análisis cuantitativo de la reorganización de la densidad electrónica en el transcurso de las reacciones. Con la teoría AIM se han localizado los puntos críticos de enlace (BCP) que explican distintas propiedades de los enlaces.

✓ La afinidad entre el átomo de hierro del modelo del hemo y el enlace peróxido de la artemisinina ha quedado demostrada. Además, se ha llevado a cabo la comparación de la reacción del modelo de Fe(II) con oxígeno molecular, y los resultados obtenidos llevan a la conclusión de que el modelo ferroso reacciona preferiblemente con especies que contienen enlaces peróxido. Consecuentemente, la artemisinina interrumpe el proceso de detoxificación del hemo, puesto que evita la oxidación inicial de Fe(II) a Fe(III). La artemisinina compite con el oxígeno molecular en el primer paso de formación de la hemozoína, terminando con la vida del parásito de la malaria.

Las conclusiones específicas se pueden resumir en los siguientes puntos:

a) El radical **11f** ha sido descrito como la estructura más estable formada como consecuencia de la descomposición de la artemisinina. La ruta por la cual se obtiene **11f** (la ruta que transcurre a través del O-radical **O2**) es el camino de reacción más favorable tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético. Este hecho está de acuerdo con el dato experimental de que el único producto de alquilación encontrado *in vivo* proviene de este C-radical.

b) La ruta que transcurre a través del radical **O1** puede competir con la que tiene lugar a través del radical **O2**, puesto que el complejo **C1** es termodinámicamente más estable que **C2**. Esto concuerda con los hechos experimentales, puesto que muchos de los intermedios de la ruta del radical **O1** han sido identificados.

c) El enlace **O1-O2** en **1f** ha sido caracterizado por medio de estudios ELF y AIM como un '*enlace protovalente*', es decir, como un enlace de baja estabilidad relativa. Este es el motivo por el cual el enlace endoperóxido de la artemisinina puede romperse fácilmente en presencia de especies de Fe(II). En cambio, el enlace O-O de la molécula de O₂ presenta una topología bastante diferente (entre estos átomos se halla una cuenca disináptica bastante poblada), y las características del BCP calculadas lo describen como un enlace mucho más fuerte que el enlace equivalente en **1f**.

d) Por medio de los análisis ELF y AIM se ha encontrado que la ruptura del enlace endoperóxido de la artemisinina inicia la reorganización electrónica, conduciendo a la formación de los O-radicales. Este hecho concuerda con la observación experimental de que dicho enlace juega un papel fundamental para la actividad antimalaria.

4.2.3. Análisis topológico de las reacciones de obtención de los productos finales

Diversos experimentos realizados *in vitro* han demostrado que si el proceso de alquilación del hemo por parte de los carboradicales no tiene lugar, el proceso de descomposición continúa hasta la formación de diferentes productos, cuya obtención depende de las condiciones de reacción.

En este apartado, partiendo de los C-radicales **4** y **II**, se describe la formación de los productos finales **6** (3 α -hidrodeoxi-artemisinina), **8** (deoxiartemisinina) y el tetrahidrofurano **12** (ver Figura 4.1). El sistema modelo utilizado es el mismo que el empleado en el apartado anterior, es decir, el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano (**1f**) y el Fe(OH)₂ dihidratado (**fe**) para simular la artemisinina y el hemo, respectivamente (ver Figura 4.2.2). Siguiendo con el mismo esquema de trabajo, el estudio se ha ejecutado desde dos puntos de vista distintos. Por un lado se ha realizado la caracterización geométrica y la obtención de los parámetros energéticos de las especies implicadas. Con este fin, se ha utilizado el programa Gaussian03 con la metodología B3LYP/6-311+G(d,p). Por otro lado, se ha llevado a cabo un estudio basado en las metodologías ELF y AIM, con el propósito de conocer los detalles referentes a la redistribución electrónica que tiene lugar en estos procesos y hacer un análisis más riguroso del enlace.

Formación de **6f**

Como se ha explicado anteriormente, la formación de **4f** tiene lugar a través de la ruta del radical **O1**. Éste, tras dos pasos de reacción, da lugar al producto **6f**, según el mecanismo mostrado en la Figura 4.2.15.

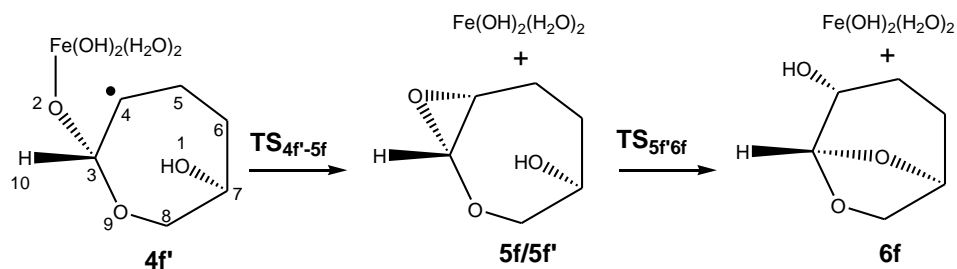


Figura 4.2.15 – Mecanismo de reacción de formación de 6f

En la Figura 4.2.16 se muestra el perfil de energía de todos los procesos estudiados con este sistema. En gris se muestra el perfil descrito en el apartado anterior, mientras que el resto de etapas se representan en color. En la Figura 4.2.17 se muestran las geometrías de las especies implicadas en la reacción de 4f' a 6f.

Una vez formado 4f, que es 41,53 kcal/mol más estable que los reactivos de partida por separado (1f y fe), éste sufre un ligero cambio conformacional dando lugar a 4f', que es 43,55 kcal/mol más estable que los reactivos de partida. Posteriormente, se debe superar una barrera de energía de 5,5 kcal/mol que implica la ruptura del enlace Fe-O2 y formación del enlace O2-C4 ($\text{TS}_{4f'-5f}$) para obtener el epóxido 5f con la molécula de Fe(II) coordinada al oxígeno del epóxido, cuya energía relativa es de -54,83 kcal/mol. La posterior eliminación de la molécula de Fe(II) causa un incremento en la energía debida a la pérdida de la interacción Fe-O2, dando lugar a 5f' (el epóxido más el $\text{Fe}(\text{OH})_2$ dihidratado por separado), que es 35,26 kcal/mol más estable que los reactivos iniciales. Para finalizar, se alcanza 6f a través del $\text{TS}_{5f'-6f}$, superando una barrera de 33 kcal/mol. Este último proceso implica la ruptura de los enlaces O2-C3 y O1-H, y la formación de los enlaces O2-H y O1-C3. 6f presenta una energía relativa de -59,80 kcal/mol y es la especie más estable de entre las implicadas en esta ruta reactiva. En

consecuencia, la formación de **6f** se da directamente una vez se ha iniciado el proceso, lo cual explica la observación experimental de la detección de este producto, es decir, la detección de **6**, tras la descomposición de la artemisinina. Además, puesto que la barrera energética más grande que hay que superar es el paso que va a través de TS_{5f-6f} , es razonable que el intermedio previo, es decir **5f**, se acumule. Esto explica la detección del epóxido **5** como componente minoritario en algunos experimentos.

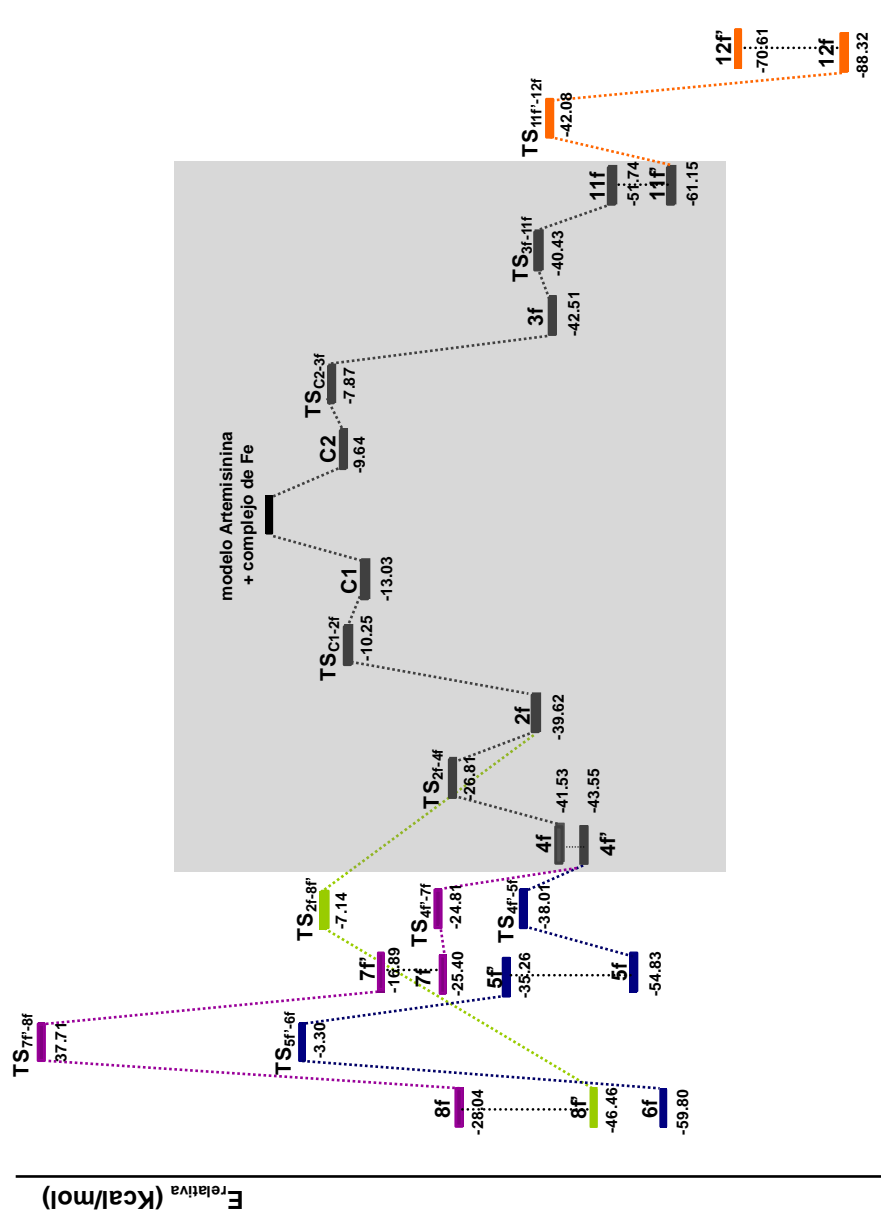


Figura 4.2.16 – Perfil de energía de la formación de los productos finales

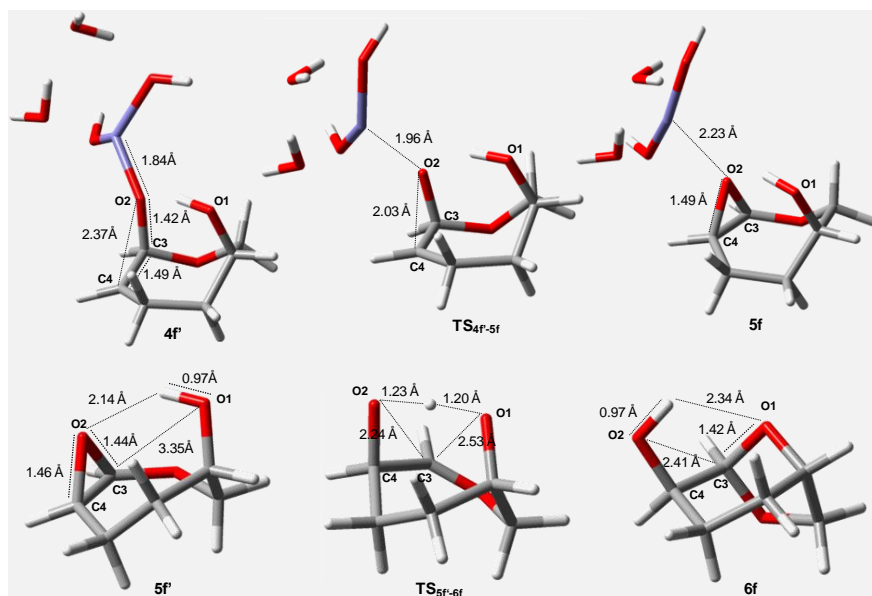


Figura 4.2.17 – Geometrías de los puntos estacionarios implicados en la formación de 6f

El estudio ELF de estos procesos describe $4f$ con una cuenca monosináptica en C4 poblada con 0,34 electrones (ver Figura 4.2.18), lo que está de acuerdo con la naturaleza radicalaria de esta molécula. Esta cuenca desaparece ya a partir del TS_{4f-5f} , puesto que posteriormente los electrones desapareados recaen sobre el átomo de Fe. La cuenca disináptica entre O2 y Fe en $4f$, pasa a dividirse en dos cuencas disinápticas en TS_{4f-5f} , lo que indica que el enlace empieza a debilitarse. En $5f$, una de estas cuencas se mantiene disináptica, mientras que la otra es monosináptica. Este hecho evidencia la ruptura del enlace Fe-O2 y la posterior coordinación del O2 con la molécula de Fe(II) (fe) ya separada. Además, en esta estructura aparece una cuenca disináptica entre los átomos O2 y C4, con lo cual el epóxido está formado. En el segundo paso de reacción, la molécula fe ya no participa de los cambios electrónicos, por lo que se parte de la molécula $5f$, que presenta una cuenca disináptica entre los cores de O2 y C3, que no está presente en el TS_{5f-6f} ni en $6f$, debido a la ruptura del enlace entre éstos átomos. La cuenca

hidrogenada perteneciente al O1 tiene una población de 1,75 electrones en 5f', mientras que en TS_{5f'-6f} esta cuenca se sitúa entre O1 y O2 y su población disminuye a 0,38 electrones. En la estructura de transición el hidrógeno se localiza entre los oxígenos donador y aceptor, que son los que soportan la carga electrónica. En 6f esta cuenca pertenece a O2 y su población es de 1,73 electrones; además aparece una cuenca disináptica entre O1 y C3, indicando la formación del enlace entre esos átomos.

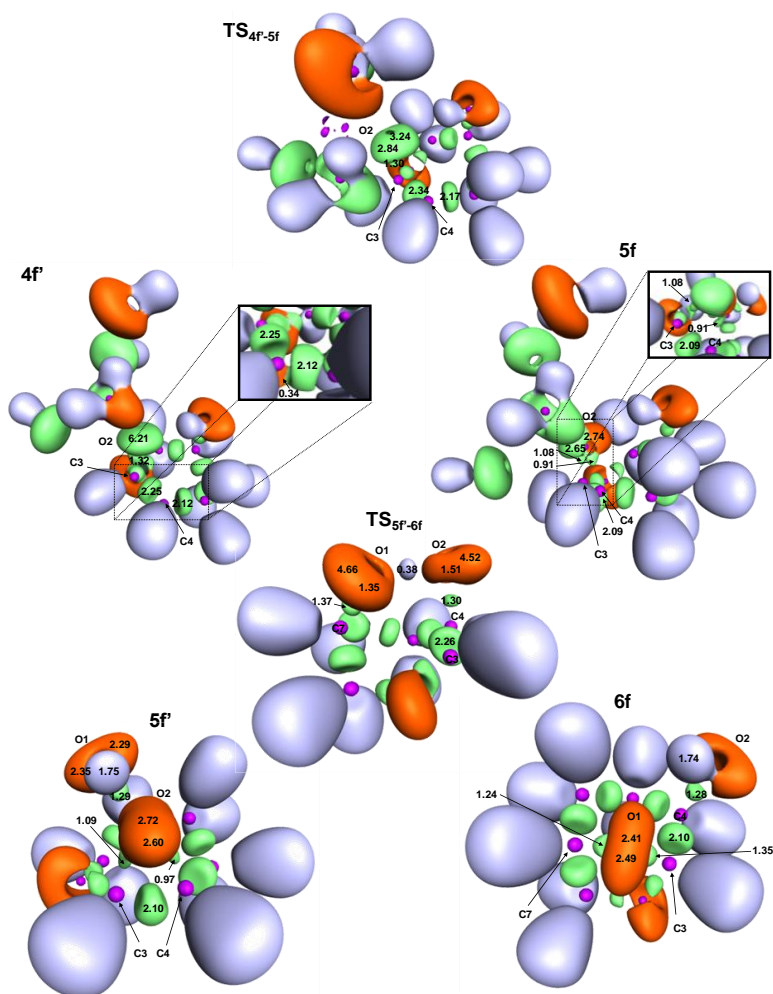


Figura 4.2.18 – Isosuperficie ELF de los puntos estacionarios que participan en la formación de 6f, representada con el valor 0,815, excepto para 4f' que se representa con 0,784 y 5f, que se representa con el valor de 0,665

Con la teoría AIM se han analizado las características de los enlaces que participan en estos procesos reactivos, según se muestra en la Tabla 4.2.2. La formación de **5f** se explica por la ruptura del enlace O2-Fe, que viene dada por la disminución de la $\rho(r)$ del BCP encontrado entre estos átomos al ir de **4f** a **5f**; y la evolución de $E_d(r)$ a valores menos negativos en la estructura de transición y positivos en **5f**. Los valores de $\nabla^2\rho(r)$ en ese BCP se hacen menos positivos en el transcurso de la reacción, llevando a que **5f** presente menos dispersión de carga, lo cual se explica porque el enlace está formado en **4f**, pero tiene carácter iónico. De estos valores se deduce también que en **5f** el átomo de hierro está coordinado al átomo O2. Respecto a la coordenada O2-C4, no se ha encontrado ningún BCP entre dichos átomos ni en **4f** ni en TS_{4f-5f} ; sin embargo, en **5f** este BCP está presente, y los valores de $\rho(r)$, $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ confirman la formación del enlace. Según esto, el TS_{4f-5f} se asemeja más a reactivos que a productos por lo que respecta a la coordenada O2-C4, lo que está de acuerdo con la larga distancia O2-C4 (2,03 Å) en este punto estacionario. El BCP hallado entre O2 y C3 en **5f** se caracteriza como un enlace estable según los parámetros AIM calculados, pero este BCP ya no existe en TS_{5f-6f} ni en **6f**, lo cual explica que la distancia O2-C3 sea muy grande en la estructura de transición (2,24 Å) y que el enlace esté completamente roto en el producto. Entre O1 y H se ha encontrado un BCP en la estructura **5f**, con valores de $\rho(r)$, $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ que demuestran que el enlace alcohol está formado; mientras que la $\rho(r)$ disminuye en el mismo BCP del TS_{5f-6f} , así como $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ se hacen menos negativas, lo que indica el debilitamiento del enlace. En **6f** no se ha encontrado ningún BCP entre estos átomos. En **5f** se ha localizado un BCP entre O2 y H, cuyos valores AIM demuestran que existe una interacción débil entre dichos átomos, sin embargo, en TS_{5f-6f} la interacción entre dichos átomos se hace ligeramente más fuerte, con valores de densidad electrónica mayores, $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ más negativa;

quedando confirmada la formación de un enlace O2-H en **6f**, puesto que la $\rho(\mathbf{r})$ es muy elevada, y $E_d(\mathbf{r})$ y $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ son bastante negativas. La formación del enlace O1-C3 se empieza a notar en el TS_{5f-6f} por la aparición de un BCP entre estos átomos, aunque en este punto la baja densidad electrónica, así como los valores positivos de $E_d(\mathbf{r})$ y $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$, muestran que la interacción entre los átomos O1 y C3 es todavía débil. Estos datos concuerdan con la larga distancia O1-C3 en dicho TS. En **6f**, los valores AIM de este BCP muestran la formación de un enlace estable, puesto que la densidad electrónica es significativa, y la energía de la densidad electrónica y la laplaciana son negativas.

Tabla 4.2.2 - Propiedades electrónicas de los puntos críticos de enlace (BCP) implicados en las reacciones para los puntos estacionarios encontrados. Densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$ (unidades atómicas), laplaciana de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ (unidades atómicas), y energía de la densidad electrónica, $E_d(\mathbf{r})$ (unidades atómicas)

	enlace	$\rho(\mathbf{r})$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r})$	$E_d(\mathbf{r})$
4f	O2-C4	—	—	—
	O2-Fe	0,123	0,659	-0,027
	O2-C3	0,262	-0,551	-0,342
	C3-C4	0,267	-0,660	-0,230
TS _{4f-5f}	O2-C4	—	—	—
	O2-Fe	0,087	0,504	-0,007
5f	O2-C4	0,214	-0,154	-0,217
	O2-Fe	0,044	0,233	0,001
5f	O2-C3	0,248	-0,374	-0,292
	O1-H	0,361	-2,502	-0,697
	O2-H	0,018	0,060	0,001
	O1-C3	—	—	—
TS _{5f-6f}	O2-C3	—	—	—
	O1-H	0,179	-0,310	-0,172
	O2-H	0,167	-0,207	-0,145
	O1-C3	0,025	0,075	0,001
6f	O2-C3	—	—	—
	O1-H	—	—	—
	O2-H	0,364	-2,490	-0,696
	O1-C3	0,264	-0,584	-0,343

Formación de 8f

Otro mecanismo de dos pasos (ver Figura 4.2.19), da lugar al producto 8f a partir del C-radical 4f. 8f es un modelo de la deoxiartemisina 8, un compuesto obtenido experimentalmente en la descomposición de la artemisinina.^[11]

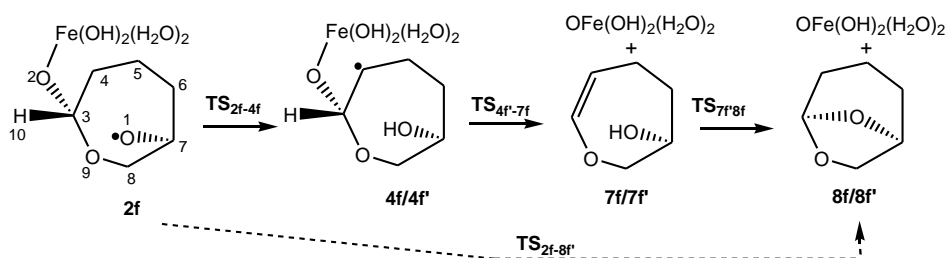


Figura 4.2.19 – Mecanismos de reacción de la formación de 8f

A partir de 4f', por ruptura del enlace O2-C3 y a través del TS_{4f'-7f}, da lugar al alqueno 7f. Las energías de dicho TS y de 7f son -24,81 y -25,40 kcal/mol, respectivamente, tal como se puede comprobar en la Figura 4.2.16. Este paso es, tanto termodinámica como cinéticamente, menos favorable que el paso de obtención de 5f a partir de 4f'. La eliminación de la especie de Fe(IV) da lugar a 7f', que con la energía de la molécula saliente OFe(OH)₂(H₂O)₂ se sitúa 16,89 kcal/mol por debajo de los reactivos en el perfil de energía. Las geometrías de estas moléculas son las representadas en la Figura 4.2.20. En el segundo paso de reacción, a través de una estructura de transición de cuatro centros TS_{7f'-8f}, 37,71 kcal/mol menos estable que los reactivos de partida, se forma el producto final 8f, cuya energía relativa es -28,04 kcal/mol. De estos valores se podría concluir que el camino reactivo que conduce a 8 es muy desfavorable, más aún cuando se compara con el camino de formación de 6, por lo que resulta difícil de explicar que 8, en algunos casos, sea el principal producto obtenido experimentalmente en la descomposición

de la artemisinina. Además, debido a la elevada barrera energética de 44,5 kcal/mol que hay que superar para que el proceso que va de 7f' a 8f tenga lugar, se prevé la acumulación del intermedio 7f', que es un modelo del alqueno 7. Sin embargo, no se tiene conocimiento de la detección de 7 en los experimentos de descomposición de la artemisinina.

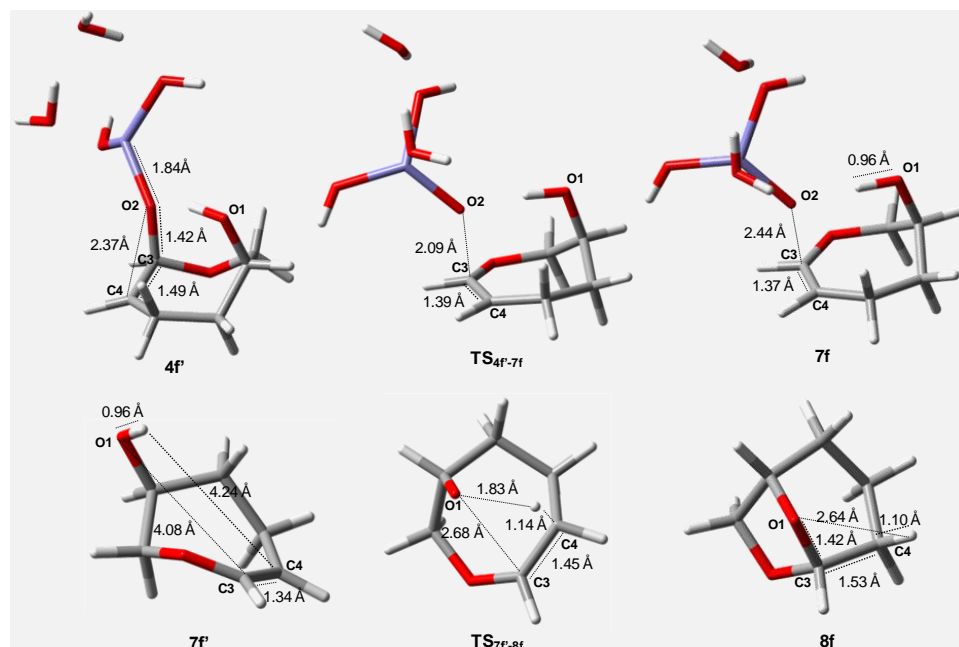


Figura 4.2.20 – Geometrías de los puntos estacionarios implicados en la formación de 8f a través del intermedio 7f

En consecuencia, hemos explorado un mecanismo alternativo que consiste en la eliminación directa de la especie de Fe(IV) a partir de 2f, dando lugar a 8f' en un solo paso de reacción. En esa etapa se produce la formación del enlace O1-C3 y la ruptura del enlace C3-O2, tal como se muestra en la Figura 4.2.19. En la Figura 4.2.21 se muestran los puntos estacionarios localizados para esta etapa. La especie 8f' es el complejo entre 8f y la molécula de Fe(IV). La localización de la estructura de transición implicada en este proceso (TS_{2f-8f'}) ha supuesto el

descubrimiento de una nueva ruta mecanística, no propuesta hasta la fecha, para la formación de **8**. La barrera de energía del proceso **2f**-**8f'** es de 32,5 kcal/mol, siendo la energía relativa de **8f'** de -46,46 kcal/mol. La salida de la molécula de Fe(IV) provoca la pérdida de la interacción Fe-O1, por lo que **8f** es menos estable que **8f'**. Todos los puntos estacionarios implicados en este nuevo camino de reacción son más estables que los reactivos iniciales, por lo que la formación de los productos tiene lugar una vez iniciada la reducción del enlace endoperóxido. Este camino alternativo evita las rutas reactivas que transcurren a través de las especies que modelan el alqueno **7**, lo que explicaría que dichas especies no hayan sido identificadas experimentalmente. Además, el $TS_{2f-8f'}$ presenta una energía muy similar a la del TS_{5f-6f} , la estructura de transición de mayor energía en el paso de **2f** a **6f**. Este hecho sugiere que existe competición entre el camino que lleva a **8** y el que conduce a **6**. De hecho las observaciones experimentales llevan a la conclusión de que la formación de un producto u otro depende de las condiciones aplicadas.

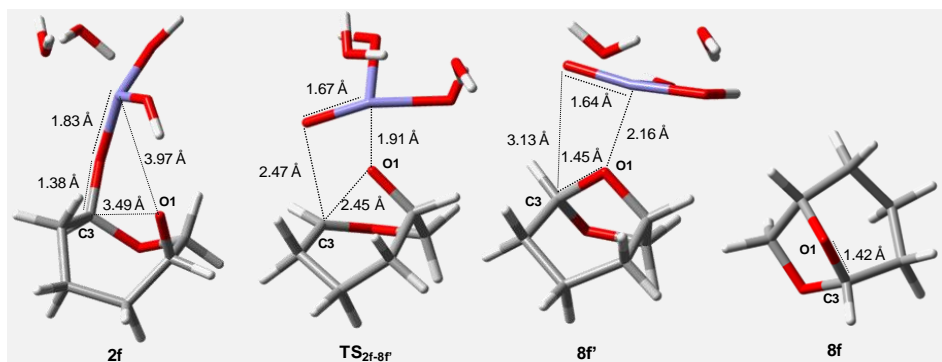


Figura 4.2.21 – Geometrías de los puntos estacionarios participantes en la ruta alternativa de obtención de **8f**

En la Figura 4.2.22 se muestran las isosuperficies ELF correspondientes al estudio de la formación de **8** a través del intermedio **7**, que es el camino que se proponía en la bibliografía existente.

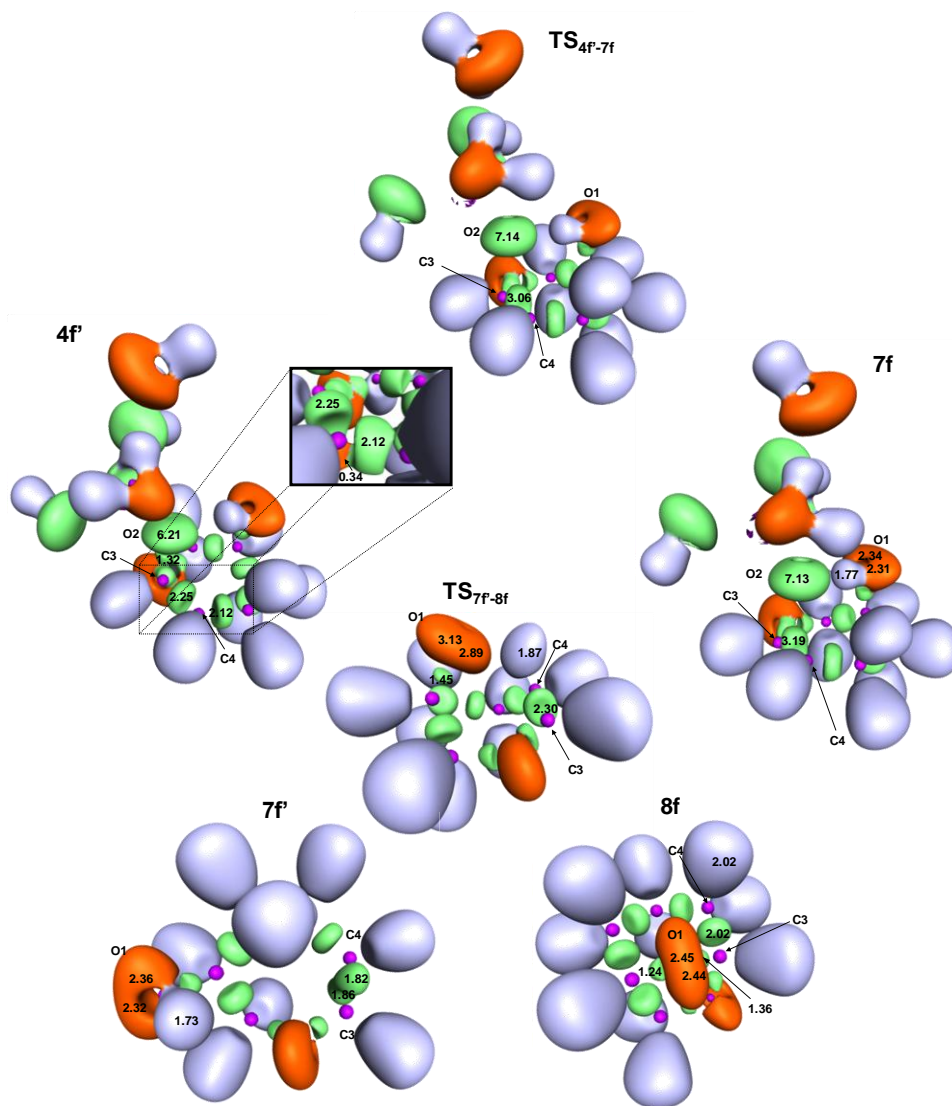


Figura 4.2.22 - Isosuperficies ELF de los puntos estacionarios que participan en la formación de 8f a través de la formación del intermedio 7f. Valor de isosuperficie utilizado para 4f, TS_{4f-7f} y 7f 0,784, para el resto 0,815; excepto para la ampliación de 4f, que se ha utilizado el valor de 0,665

En 4f' existe una cuenca disináptica entre los cores de O2 y C3, poblada con 1,32 electrones, que ya no aparece en el TS_{4f-7f} ni en 7f, puesto que este enlace está roto. La cuenca disináptica localizada entre O2 y Fe

presenta una población de 6,21 electrones en $4f^{\circ}$, y aumenta a 7,14 y 7,13 electrones en la estructura de transición y en $7f$, respectivamente, mostrando la transferencia electrónica procedente de la ruptura del enlace O2-C3. La cuenca disináptica ubicada entre C3 y C4 tiene una población de 2,25 electrones en $4f^{\circ}$, y aumenta a 3,06 electrones en $TS_{4f^{\circ}-7f}$ y 3,19 electrones en $7f$. En el segundo paso, la transferencia de un hidrógeno de O1 a C4 se explica por la evolución de la cuenca hidrogenada que en $7f^{\circ}$ pertenece a O1 y está poblada con 1,73 electrones. Esta cuenca pasa a 1,87 electrones en el $TS_{7f^{\circ}-8f}$ y se ubica entre O1 y C4, y en $8f$ tiene 2,02 electrones y ya pertenece al C4. Aunque en las estructuras $7f^{\circ}$ y $TS_{7f^{\circ}-8f}$ no existe ninguna cuenca disináptica entre O1 y C3, ésta aparece en $8f$ con una población de 1,36 electrones, lo que indica la formación del enlace O1-C3. Por otro lado, puesto que se forma el enlace C4-H y O1-C3, el enlace C3-C4 evoluciona de doble en $7f^{\circ}$ a simple en $8f$, lo que se refleja por la disminución progresiva de la cuenca disináptica localizada entre dichos átomos en el transcurso de la reacción.

El estudio de estas etapas con la teoría AIM (ver Tabla 4.2.3), muestra la ruptura del enlace O2-C3 por la disminución de la densidad electrónica del BCP encontrado entre dichos átomos al ir de $4f^{\circ}$ a $TS_{4f^{\circ}-7f}$. En el alqueno $7f$ no se ha encontrado ningún BCP entre los átomos O2 y C3, puesto que el enlace ya está roto. La $E_d(r)$ es negativa en $4f^{\circ}$ y presenta un valor negativo, pero más pequeño, en la estructura de transición; y los valores de $\nabla^2\rho(r)$ muestran que el BCP está en zona de acumulación de carga en $4f^{\circ}$, mientras que en $TS_{4f^{\circ}-7f}$ está en zona de dispersión de carga. Todos estos valores indican la ruptura del enlace O2-C3. El aumento de la fuerza del enlace entre C3 y C4 queda demostrado por el aumento del valor de $\rho(r)$, así como por el paso a valores más negativos de $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ al ir de $4f^{\circ}$ a $7f$. El progreso de la segunda etapa implica, por un lado, la transferencia del átomo de H del grupo alcohol de $7f^{\circ}$, en el cual

los valores del BCP ubicado entre el H y O1 muestran que el enlace está formado (la $\rho(r)$ es bastante elevada, y $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ presentan valores bastante elevados y negativos). En TS_{7f-8f}, el BCP entre estos átomos presenta un valor más pequeño de $\rho(r)$, así como un valor nulo para $E_d(r)$ y un valor positivo para $\nabla^2\rho(r)$, lo cual prueba que el enlace está debilitándose. En 8f no hay BCP entre H y O1. Además, el BCP entre C3 y C4, al pasar de 7f a 8f experimenta una disminución de $\rho(r)$, y $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ se hacen menos negativos, lo que concuerda con el paso de enlace doble a simple. En cuanto a la explicación de la formación del enlace H-C4, en TS_{7f-8f} aparece un BCP cuyos valores de $\rho(r)$, $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ muestran que el enlace está ya muy formado, estando totalmente formado en 8f. Sin embargo, el TS_{7f-8f} puede describirse como asíncrono, ya que presenta una distancia O1-C3 bastante larga, lo que concuerda con la ausencia de BCP entre estos átomos. Así pues, esta estructura de transición es muy parecida a 7f por lo que respecta a la coordenada O1-C3. En 8f, el BCP entre O1 y C3 sí aparece, y los valores de los parámetros AIM (que presenta $\rho(r)$ elevada y $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ bastante negativos) prueban la formación del enlace entre dichos átomos.

Tabla 4.2.3 - Propiedades electrónicas de los puntos críticos de enlace (BCP) implicados en las reacciones para los puntos estacionarios encontrados. Densidad electrónica, $\rho(r)$ (unidades atómicas), laplaciana de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(r)$ (unidades atómicas), y energía de la densidad electrónica, $E_d(r)$ (unidades atómicas)

	enlace	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$E_d(r)$
4f	O2-C4	—	—	—
	O2-Fe	0,123	0,659	-0,027
	O2-C3	0,262	-0,551	-0,342
	C3-C4	0,267	-0,660	-0,230
TS _{4f-7f}	O2-C3	0,056	0,149	-0,003
	C3-C4	0,313	-0,879	-0,325
7f	O2-C3	—	—	—
	C3-C4	0,322	-0,922	-0,347

	enlace	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$E_d(r)$
7f	C3-C4	0,340	-0,993	-0,389
	O1-H	0,366	-2,476	-0,694
	O1-C3	—	—	—
	C4-H	—	—	—
TS _{7f-8f}	C3-C4	0,281	-0,738	-0,274
	O1-H	0,041	0,132	0,000
	O1-C3	—	—	—
	C4-H	0,246	-0,753	-0,224
8f	C3-C4	0,252	-0,595	-0,205
	O1-H	—	—	—
	O1-C3	0,267	-0,606	-0,348
	C4-H	0,274	-0,907	-0,270

Respecto al camino de reacción por el cual se obtiene **8f** a partir de **2f** en un solo paso, se ha realizado el análisis ELF mostrado en la Figura 4.2.23. En **2f** existe una cuenca disináptica entre O2 y C3, que desaparece en TS_{2f-8f} y **8f**, lo cual indica que en estas estructuras ya no existe enlace entre esos átomos. En **2f** hay una cuenca disináptica entre O2 y Fe, cuya población aumenta progresivamente en TS_{2f-8f} y **8f** por formación de enlace doble entre dichos átomos. En **8f** el átomo de Fe permanece coordinado al átomo O1, pero no existe cuenca disináptica entre ellos. La formación del enlace O1-C3 se explica en **8f** por la aparición de una cuenca disináptica entre dichos átomos, sin embargo, en la estructura de transición todavía no aparece dicha cuenca.

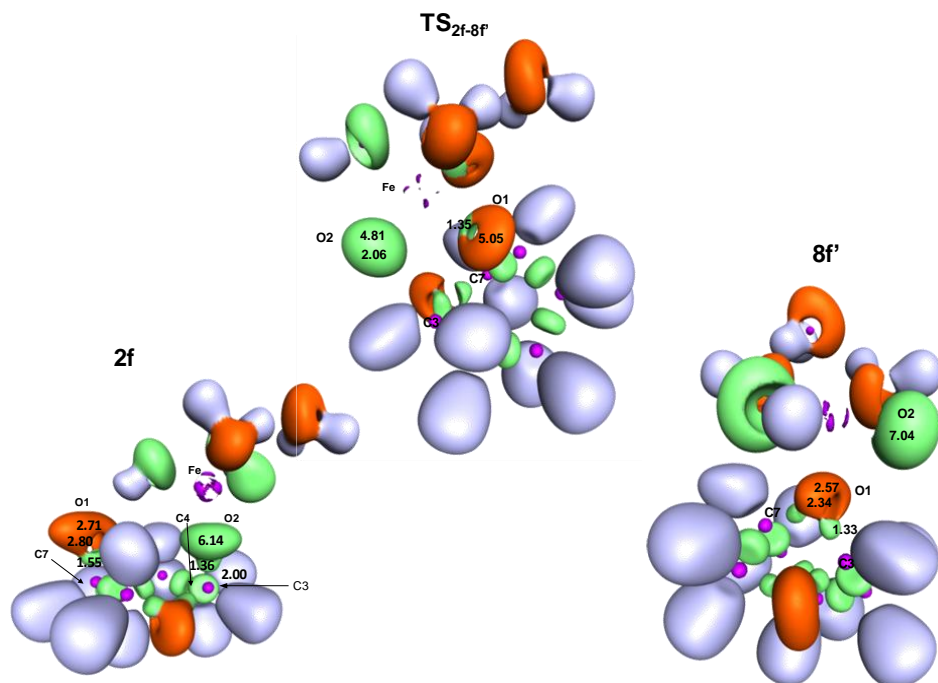


Figura 4.2.23 – Isosuperficie ELF de los puntos estacionarios que participan en la formación de 8f' a partir de 2f, representada con un valor de 0.815

El estudio AIM de este paso de reacción, mostrado en la Tabla 4.2.4, describe el progreso del enlace, puesto que en 2f y TS_{2f-8f} existe un BCP entre los átomos O2 y C3, cuyo valor de $\rho(r)$ es mayor en 2f, y $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ son negativos en esta estructura, mientras que son positivos en la estructura de transición. En 8f' no existe ningún BCP entre O2 y C3, con lo cual queda descrita la ruptura del enlace. El paso de enlace sencillo a doble enlace se manifiesta porque el BCP situado entre O2 y Fe aumenta el valor de $\rho(r)$ y aumenta el valor negativo de $E_d(r)$ en el transcurso de la reacción. El valor de $\nabla^2\rho(r)$ de este BCP es bastante positivo para las tres estructuras (está en zona de dispersión de carga), debido a que es un enlace de carácter iónico. La formación del enlace O1-C3 se demuestra por la aparición de un BCP cuyas propiedades en TS_{2f-8f} aún muestran que se trata de un enlace débil, pero en 8f', los valores AIM explican la

estabilidad del enlace. Concordando con la geometría de TS_{2f-8f} , en el estudio AIM se ha hallado un BCP entre Fe y O1, cuyos valores son indicio de una interacción débil entre dichos átomos. En $8f'$ estos valores de $\rho(r)$, $E_d(r)$ y $\nabla^2\rho(r)$ muestran que el átomo O1 está coordinado al átomo de Fe, aunque la interacción entre ellos es muy débil.

Tabla 4.2.4 - Propiedades electrónicas de los puntos críticos de enlace (BCP) implicados en las reacciones para los puntos estacionarios encontrados. Densidad electrónica, $\rho(r)$ (unidades atómicas), laplaciana de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(r)$ (unidades atómicas), y energía de la densidad electrónica, $E_d(r)$ (unidades atómicas)

	enlace	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$E_d(r)$
2f	C3-O2	0,286	-0,471	-0,406
	O1-C3	—	—	—
	Fe-O1	—	—	—
	Fe-O2	0,118	0,687	-0,023
TS_{2f-8f}	C3-O2	0,027	0,090	0,002
	O1-C3	0,028	0,086	0,000
	Fe-O1	0,103	0,493	-0,015
	Fe-O2	0,206	0,780	-0,113
$8f'$	C3-O2	—	—	—
	O1-C3	0,243	-0,475	-0,302
	Fe-O1	0,054	0,272	0,001
	Fe-O2	0,223	0,829	-0,135

Formación de 12f

Como se ha descrito anteriormente, la ruta radicalaria O2 conduce a la formación del C-radical II, precursor del producto 12, que es un anillo tetrafurano contraído que ha sido detectado experimentalmente.^[5, 11]

El mecanismo de esta reacción implica la ruptura del enlace Fe-O1 y la formación del enlace C4-O1, tal como se puede ver en la Figura 4.2.24.

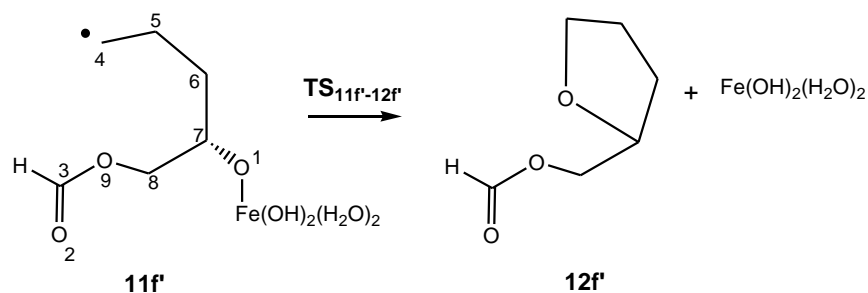


Figura 4.2.24 – Mecanismo de reacción de formación de 12f' a partir de 11f'

Esta reacción ha sido modelada tomando como partida un paso previo por el cual 11f, cuya energía relativa es -51,74 kcal/mol, da lugar a 11f' a través de un cambio conformacional, siendo este último 61,15 kcal/mol más estable que los reactivos de partida. En la Figura 4.2.16 está representado el perfil de energía de este proceso. A partir de 11f', a través de una barrera de 19 kcal/mol que implica sobrepasar una estructura de transición de cuatro centros (TS_{11f'-12f'}), se forma 12f. Finalmente, la separación de la molécula fe (Fe(OH)₂(H₂O)₂), da lugar a 12f', cuya energía relativa, sumada a la energía de fe, es de -70,61 kcal/mol. La obtención de 12f' es más favorable que la formación del resto de productos finales, tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético: es la especie más estable, y las barreras de energía que hay que superar son menores en el caso de la ruta del radical O₂. Sin embargo, el hecho de que todos los puntos estacionarios estudiados sean más estables que los reactivos iniciales (1f y fe) implica que la formación de todos los productos derivados de la descomposición de la artemisinina sea posible una vez superada la primera barrera.

En la Figura 4.2.25 se pueden ver las geometrías de los puntos estacionarios que participan en este proceso.

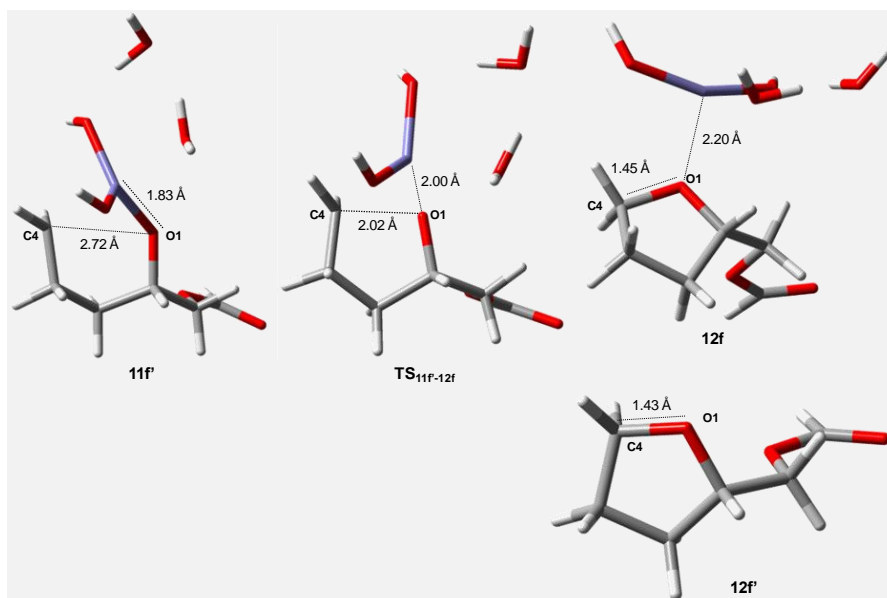


Figura 4.2.25 – Geometrías de los puntos estacionarios implicados en la formación de $12f$

El estudio ELF de este mecanismo muestra que en $11f$ existe una cuenca disináptica localizada entre los cores de los átomos O1 y Fe, poblada con 6,10 electrones, lo que demuestra que el enlace O1-Fe está formado. En la Figura 4.2.26 se representan las isosuperficies ELF de estas estructuras. En $TS_{11f-12f}$ la cuenca disináptica entre estos átomos posee únicamente 2,66 electrones, y aparece una cuenca monosináptica de 3,25 electrones, que está constituida por los pares solitarios de O1. Esta disposición significa que el enlace O1-Fe se está debilitando en la estructura de transición. En $12f$ no existen cuencas disinápticas entre dichos átomos, lo cual es indicativo de la ruptura del enlace. El carácter radicalario de $11f$ se demuestra porque la cuenca disináptica existente entre los cores de C4 y Fe presenta un exceso de carga; además C4 está coordinado al Fe. Por otra parte, la formación del enlace O1-C4 se evidencia por la aparición de una cuenca disináptica de 1,22 electrones en $12f$, que pasa a tener 1,25 electrones en $12f'$.

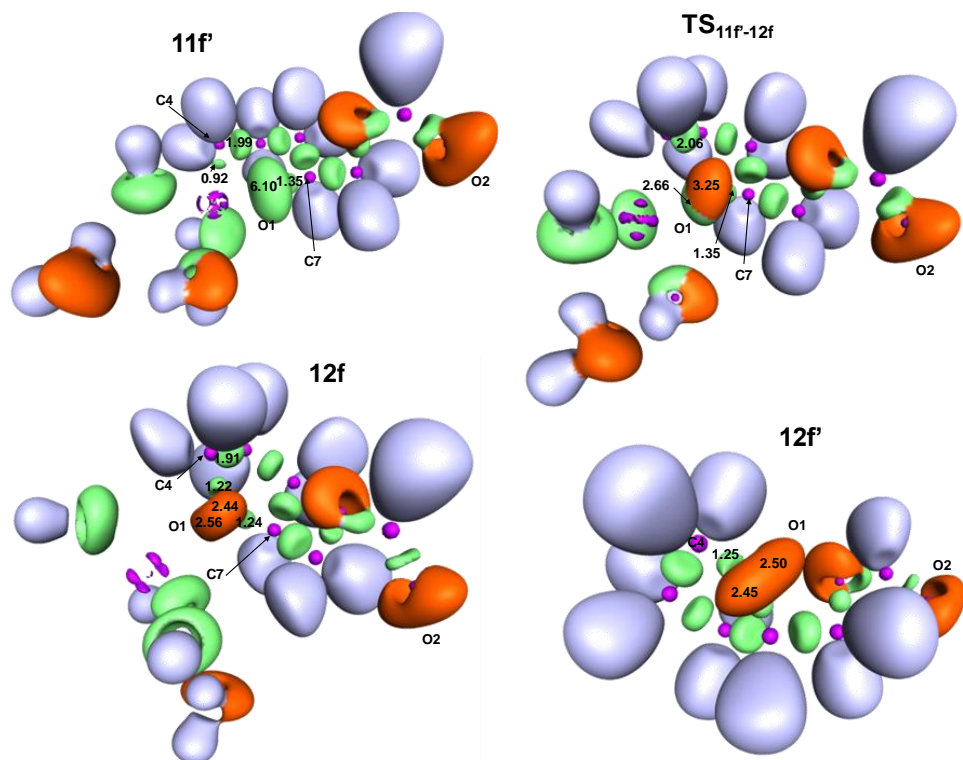


Figura 4.2.26 – Isosuperficies ELF de las estructuras implicadas en la formación de 12f, representadas para un valor de 0,815

La teoría AIM describe la ruptura Fe-O1 por las características del BCP entre estos átomos (ver Tabla 4.2.5): disminución de $\rho(r)$ y paso de valores negativos a positivos de $E_d(r)$ en el transcurso de la reacción que va de 11f' a 12f'. Los valores de $\nabla^2\rho(r)$ son positivos en todas estas estructuras, debido al carácter iónico del enlace Fe-O; sin embargo, estos valores se hacen menos positivos en el avance de la reacción. Este mismo comportamiento se ha encontrado también en la evolución del enlace en el transcurso de la reacción que va de 4f' a 5f. Además, la existencia de un BCP en 12f pone de manifiesto que el O1 todavía está coordinando al átomo de hierro. En el TS_{11f-12f} aparece otro BCP entre los átomos C4 y O1, que en 12f y 12f' pasa a tener valores más elevados de $\rho(r)$ y más

negativos de $E_d(\mathbf{r})$. Estos datos, junto al paso de un valor positivo de $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ en $TS_{11f-12f}$ a un valor negativo en $12f$ y $12f'$, corroboran la formación del enlace C4-O1.

Tabla 4.2.5 - Propiedades electrónicas de los puntos críticos de enlace (BCP) implicados en las reacciones para los puntos estacionarios encontrados. Densidad electrónica, $\rho(\mathbf{r})$ (unidades atómicas), laplaciana de la densidad electrónica, $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ (unidades atómicas), y energía de la densidad electrónica, $E_d(\mathbf{r})$ (unidades atómicas)

	enlace	$\rho(\mathbf{r})$	$\nabla^2\rho(\mathbf{r})$	$E_d(\mathbf{r})$
11f'	O1-Fe	0,130	0,654	-0,032
	C4-O1	—	—	—
$TS_{11f-12f}$	O1-Fe	0,082	0,422	-0,006
	C4-O1	0,071	0,129	-0,010
12f	O1-Fe	0,047	0,256	0,001
	C4-O1	0,231	-0,358	-0,285
12f'	C4-O1	0,249	-0,470	-0,317

Conclusiones

✓ Como conclusión global, cabe comentar que han sido estudiadas las reacciones que, a partir de los C-radicales formados tras la descomposición de la artemisinina, conducen a la obtención de los productos neutros **6**, **8** y **12**. Igual que en el apartado anterior, la inclusión de un átomo de hierro en el sistema modelo resulta un aspecto novedoso en este tipo de estudios.

✓ El estudio de la evolución del enlace en el avance de la reacción química se ha realizado desde el punto de vista del análisis topológico del enlace, mediante el uso de las metodologías ELF y AIM. De este modo se ha profundizado en el conocimiento de la topología del enlace y de la localización de los pares solitarios.

✓ La formación del producto 12f es más favorable termodinámica y cinéticamente que la del resto de productos finales. Por un lado, 12f ha sido descrito como la estructura más estable formada como consecuencia de la descomposición de la artemisinina. Por otro lado, la obtención de esta especie implica la superación de barreras de energía más bajas que los correspondientes a la ruta radicalaria O1. Este resultado concuerda con las observaciones experimentales, puesto que el tetrahidrofurano 12 se ha detectado en diferentes ensayos de la descomposición de la artemisinina.

✓ Se ha descrito un nuevo mecanismo para explicar la obtención de 8f, que resulta más favorable que los hasta ahora reseñados.

✓ Una vez comenzado el proceso de descomposición de la artemisinina, la formación de los productos 6 y 8 es posible, puesto que todos los puntos estacionarios implicados resultan más estables que los reactivos iniciales. En consecuencia, la formación de unos productos u otros vendrá determinada por las condiciones experimentales utilizadas.

✓ El mecanismo de reacción de formación de 6f implica la superación de una barrera de energía bastante elevada, que es la correspondiente al paso de 5f^o a 6f, aunque la estructura de transición de este paso (TS_{5f-6f}) es un poco más estable que los reactivos de partida, lo que significa que la formación de 6 puede tener lugar una vez comenzado el proceso. La elevada barrera energética que se tiene que rebasar, hace que se espere la acumulación del intermedio previo, es decir, de 5f^o, lo que se corrobora experimentalmente, puesto que el epóxido 5 ha sido identificado como componente minoritario en algunos experimentos.

✓ De las dos rutas estudiadas para explicar la obtención de **8**, se ha encontrado que la que transcurre a través del intermedio **7** requiere la superación de una barrera de energía muy elevada. Este paso de reacción no resulta muy viable debido a que, por un lado el TS_{7f-8f} es menos estable que los reactivos de partida, mientras que por otro lado este hecho hace prever la acumulación del intermedio $7f$, pero el alqueno **7** no ha sido detectado experimentalmente. Sin embargo, la formación de **8** mediante un único paso de reacción a partir de **2** es mucho más factible, puesto que los puntos estacionarios implicados en dicho proceso poseen menores energías relativas que los reactivos iniciales. La obtención de **8** por este mecanismo alternativo explica por qué no ha sido detectado el intermedio **7** como derivado de la descomposición de la artemisinina. Este mecanismo de reacción supone una aportación al mecanismo planteado inicialmente en la Figura 4.1.

4.3. Estudio de la descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(II)-hemo como agente reductor

Como anteriormente se ha explicado, la actividad de la artemisinina y sus derivados contra el parásito de la malaria se basa en la formación de radicales libres, mediante una reacción redox catalizada. Existe cierta controversia acerca de cuáles son las moléculas que activan la reducción del enlace endoperóxido de la artemisinina. Se han realizado estudios experimentales con diferentes formas redox del grupo hemo, hierro en estado ferroso y hemoglobina (oxi- y desoxi-hemoglobina), en los cuales se han utilizado las mismas condiciones experimentales, es decir, en DMSO, 37°C y pH 5 (se ha simulado el pH de la vacuola digestiva del parásito). Los resultados de estos estudios sostienen que el hemo es la principal molécula que activa la artemisinina, dado que presenta tiempos

medios de reacción muy inferiores al resto de moléculas (25 minutos aproximadamente) y que queda demostrada la formación de un aducto hemo-artemisinina generado mediante un radical centrado en el átomo C4 de la artemisinina. En el caso del hematin (Fe(III)-protoporfirina-IX), la reacción con la artemisinina no tiene lugar. Cuando se lleva a cabo la reacción con moléculas inorgánicas de hierro en estado ferroso, ésta es mucho más lenta, y dichas moléculas no son capaces de interferir con la reacción entre el hemo y la artemisinina, lo mismo sucede con la oxihemoglobina y desoxihemoglobina. De este modo se demuestra que el hemo, libre de la proteína, tiene un rol central en el mecanismo antimalaria.^[38]

En general, las investigaciones concernientes a la reactividad de la descomposición de la artemisinina han sido llevadas a cabo con modelos moleculares simples que simulan la transferencia electrónica del Fe(II) del grupo hemo.^[3, 19, 20, 24, 27, 47-49] Algunos de estos estudios se acercan un poco más al sistema real incluyendo átomos de hierro en el sistema modelo del grupo hemo.^[50, 51] Otros trabajos encauzan el estudio desde otro punto de vista, puesto que utilizan métodos semiempíricos (como el MNDO/d) para estudiar las propiedades de la interacción del grupo hemo y la artemisinina, prescindiendo de modelos simples, pero sin llegar a indagar en la reactividad.^[52, 53]

En este apartado se explica la reactividad relativa a la descomposición de la artemisinina inducida por el grupo hemo (Fe(II)-PPIX, ferroprotoporfirina IX), grupo prostético de la hemoglobina. Para llevar a cabo este estudio, se ha utilizado el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano como modelo de la artemisinina y el grupo hemo completo, con los grupos carboxílicos protonados, debido a que la descomposición de la artemisinina tiene lugar en la vacuola digestiva del parásito, cuyo pH es ácido. Además, se ha situado una molécula de agua en la esfera de

coordinación del hierro del hemo, para completar una esfera de coordinación octaédrica. A este sistema en ocasiones se le denominará por la abreviatura FeP-H₂O. Así pues, se han obtenido los parámetros geométricos de todos aquellos puntos estacionarios que participan en la formación de los C-radicales **4h** y **11h**, y se ha realizado un análisis de la energía de estos procesos. En la Figura 4.3.1 se muestran los mecanismos de estos procesos.

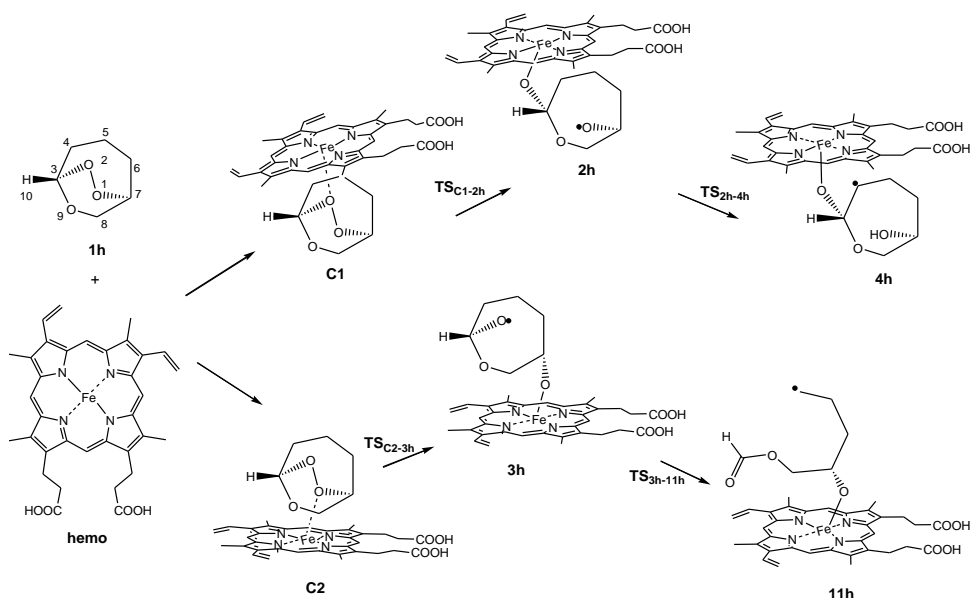


Figura 4.3.1 – Mecanismo de reacción de la descomposición de la artemisinina por reacción con el grupo hemo para dar los C-radicales **4h** y **11h**

Para llevar a cabo este trabajo, se ha hecho uso del programa Gaussian03^[39] y, puesto que se trata de sistemas de capa abierta, se ha aplicado el formalismo UDFT, concretamente UB3LYP.^[21, 22] Los funcionales híbridos DFT cancelan los errores provenientes de funcionales puros, o basados en la metodología Hartree-Fock.^[40, 54] Se ha utilizado la base LANL2DZ para el átomo de hierro, y para el resto de átomos se ha empleado en un principio la base 3-21G, y posteriormente la 6-31G*. Finalmente se ha realizado el estudio con la base 6-311G para

todos los átomos, incluido el hierro. La elección de estas bases se fundamenta en estudios de sistemas similares en los cuales se han empleado con éxito.^[40, 55]

Aunque el estudio se ha llevado a cabo con los modelos mencionados, también se ha realizado una comparativa con el modelo en el que el grupo hemo, en lugar de tener una molécula de agua como ligando, tiene un grupo imidazol que simula la histidina presente en la hemoglobina (FeP(Im)). Estos modelos del grupo hemo se muestran en la Figura 4.3.2.

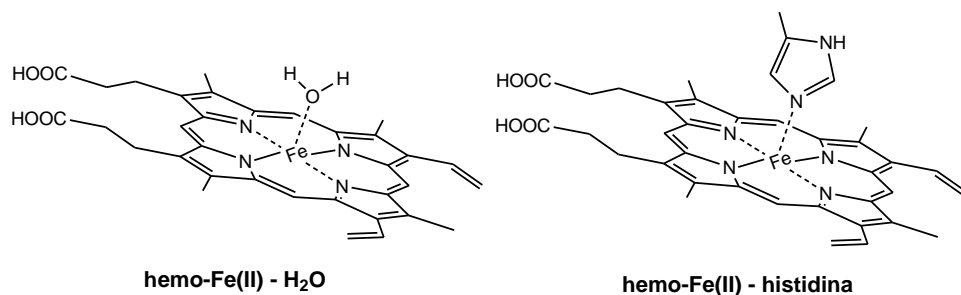


Figura 4.3.2 – Modelos del grupo hemo utilizados

4.3.1. Estados electrónicos de los modelos del grupo hemo

En primer lugar es necesario abordar la cuestión del estado electrónico de los reactivos de partida en estado fundamental. El modelo de la artemisinina no presenta electrones desapareados, por lo que su estado electrónico es singlete. En cambio, los diferentes modelos del hemo-Fe(II), cuya configuración electrónica es d^6 , presentan diferentes estados electrónicos posibles: espín alto (quintuplete), espín intermedio (triplete) y espín bajo (singlete). La energía de estas configuraciones electrónicas depende de la naturaleza de los ligandos. Por ello, en esta parte del estudio se ha incluido el sistema del grupo hemo sin ligandos adicionales que coordinan el átomo de hierro. Mediante una descripción

de las energías relativas de los diferentes estados de espín se puede determinar cuál es el estado electrónico de cada modelo particular del grupo hemo. En la Tabla 4.3.1 se muestran las energías obtenidas con la base LANL2DZ para el hierro y la 3-21G para el resto de átomos. También se proporcionan los datos del valor de S^2 , que demuestra la multiplicidad en cada uno de los casos, evidenciando que no existe contaminación de espín. En la Figura 4.3.3 se muestra la representación de las energías relativas para cada modelo del hemo, en la que se ha tomado como punto de referencia la energía del estado de menor energía en cada caso.

Tabla 4.3.1 – Energías y valor de S^2 de los modelos del grupo hemo con diferentes ligandos para diferentes estados electrónicos. Metodología B3LYP/LANL2DZ(Fe)/3-21G(resto)

		E (Hartrees)	E_{rel} (kcal/mol)	S^2
Hemo	singlete	-1948,247016	31,60	—
	triplete	-1948,297381	0,00	2,02
	quintuplete	-1948,286711	6,70	6,01
Hemo-H ₂ O	singlete	-2024,291693	11,01	—
	triplete	-2024,309233	0,00	2,03
	quintuplete	-2024,302883	3,98	6,03
Hemo-histidina	singlete	-2212,384938	2,75	—
	triplete	-2212,389309	0,01	2,03
	quintuplete	-2212,389327	0,00	6,04

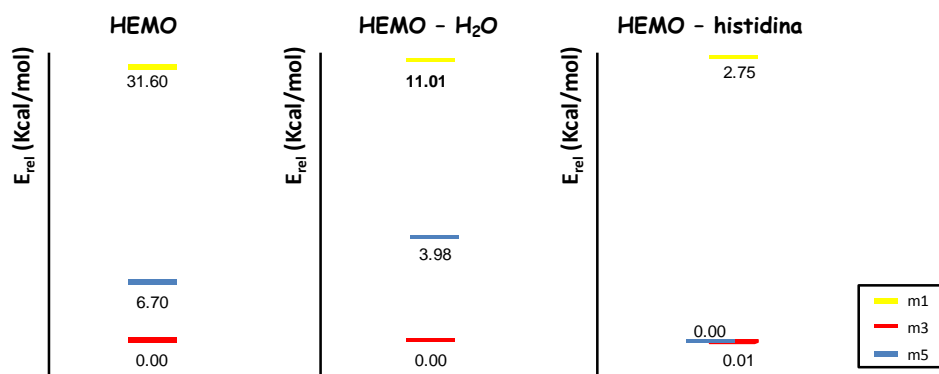


Figura 4.3.3 – Energía relativa (kcal/mol) de diferentes estados electrónicos para el grupo hemo con diferente coordinación. Metodología B3LYP/LANL2DZ(Fe)/3-21G(resto)

Los resultados derivados del mismo estudio, pero ampliando la base de los átomos no metálicos a 6-31G* y manteniendo la base LANL2DZ para el hierro, se muestran en la Tabla 4.3.2, mientras que las energías relativas se representan en la Figura 4.3.4.

Tabla 4.3.2 – Energías y valor de S^2 de los modelos del grupo hemo con diferentes ligandos para diferentes estados electrónicos. Metodología B3LYP/LANL2DZ(Fe)/6-31G*(resto)

		E (Hartrees)	E_{rel} (kcal/mol)	S^2
Hemo	singlete	-1958,288530	31,87	—
	triplete	-1958,339326	0,00	2,02
	quintuplete	-1958,331453	4,94	6,01
Hemo-H ₂ O	singlete	-2034,738348	14,60	—
	triplete	-2034,761614	0,00	2,02
	quintuplete	-2034,751796	6,16	6,00
Hemo-histidina	singlete	-2223,871810	6,06	—
	triplete	-2223,880077	0,88	2,03
	quintuplete	-2223,881472	0,00	6,00

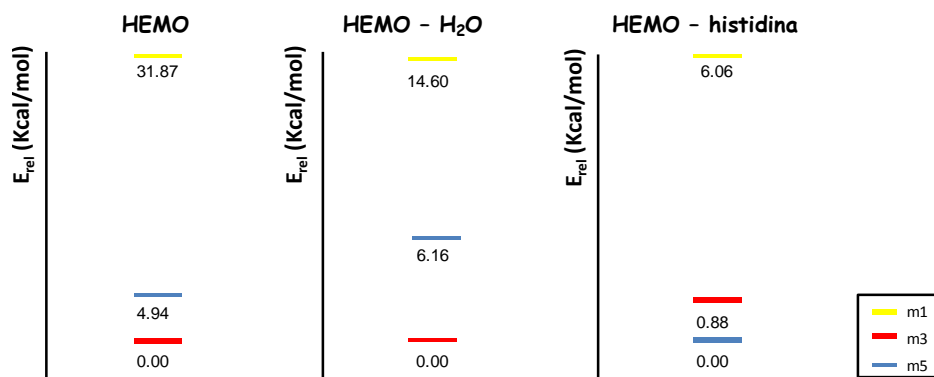


Figura 4.3.4 – Energía relativa (kcal/mol) de diferentes estados electrónicos para el grupo hemo con diferente coordinación. Metodología B3LYP/LANL2DZ(Fe)/6-31G*(resto)

Con ambas metodologías y, tanto para el modelo hemo (FeP) como para el modelo hemo- H_2O (FeP- H_2O), se obtiene que el orden energético es: **triplete** < **quintuplete** < **singlete**. En cambio, para el modelo hemo-histidina (FeP(Im)) este orden es **quintuplete** < **triplete** < **singlete**, aunque los estados quintuplete y triplete están prácticamente degenerados. Trabajos realizados con la metodología DFT con el modelo FeP coinciden en que su estado fundamental es triplete;^[56-58] incluso estudios que utilizan metodologías multireferencia más precisas como CASPT2 o CCSD(T) (aunque con modelos más sencillos) están de acuerdo en que el estado fundamental del FeP es triplete y el del FeP(Im) es quintuplete.^[40, 59] Si se comparan los resultados obtenidos con las diferentes bases para los átomos no metálicos, excepto en el caso del modelo hemo, el gap energético es mayor con la base 6-31G*. En el caso del modelo hemo-histidina, debido a que el imidazol es un ligando axial de campo fuerte, la diferencia energética entre los diferentes estados energéticos es extremadamente pequeña. Este comportamiento ha sido encontrado en otros trabajos que incluyen este sistema.^[56, 59] Esto explica que algunos trabajos hayan catalogado al FeP(Im) como triplete en lugar de quintuplete.^[60]

Las estructuras del hemo con los diferentes ligandos presentan el átomo de hierro fuera del plano de la porfirina, lo que se acentúa más cuando se trata de estados electrónicos de espín alto.

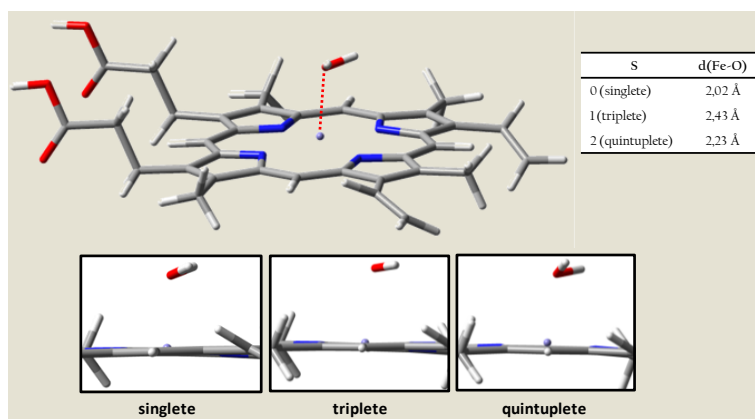


Figura 4.3.5 – Geometría del complejo hemo-H₂O (FeP-H₂O) para diferentes estados de espín

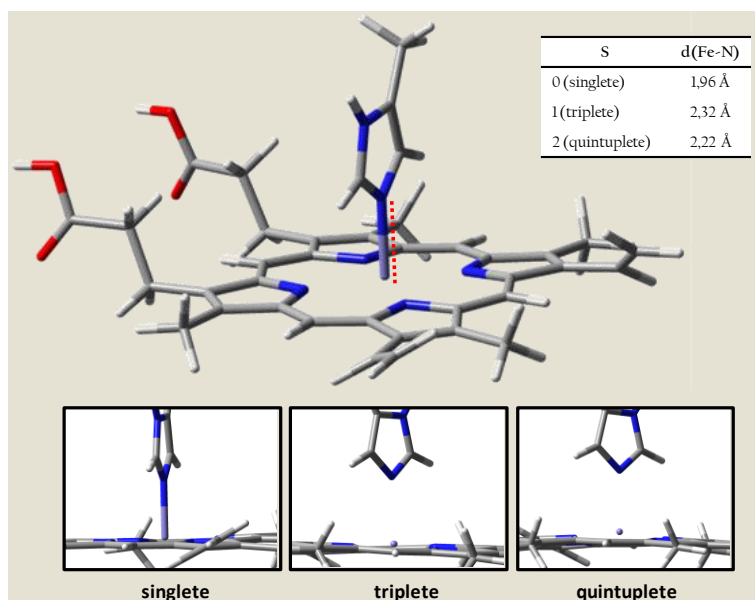


Figura 4.3.6 – Geometría del complejo hemo-histidina (FeP(Hm)) para diferentes estados de espín

La distancia entre el átomo de hierro y el nitrógeno del imidazol es muy sensible al estado electrónico. Debido a la ocupación del orbital d_{z^2} en el enlace Fe-N entre el imidazol y el hemo, el enlace es más fuerte para espín bajo (singlete), mientras que es más débil para espín intermedio (triplete). En el caso del otro modelo, la distancia entre el átomo de hierro y el oxígeno del agua sigue la misma tendencia, aunque las distancias son mayores.

4.3.2. Estudio de la reactividad entre la artemisinina y el Fe(II)-hemo

El mecanismo de reacción de la descomposición de la artemisinina se ha estudiado utilizando el sistema modelo hemo- H_2O (FeP- H_2O) como activador de la reacción, y el 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano como modelo de la artemisinina. Tal como se muestra en la Figura 4.3.1, la reacción comienza con la reducción del enlace endoperóxido del trioxano **1h** por reacción con el grupo hemo, a través de dos reacciones paralelas que dan lugar a la formación de los O-radicales **2h** y **3h**. Éstos, a partir de una transferencia 1,5-H y una escisión C-C, dan lugar a los C-radicales **4h** y **11h**, respectivamente.

Se han localizado los puntos estacionarios tanto para el estado triplete como para el quintuplete, de modo que se tienen las superficies de energía potencial para ambas multiplicidades.

En la Figura 4.3.7 se representa el perfil energético de estos procesos para los estados triplete y quintuplete, obtenido con la base 3-21G para los átomos no metálicos.

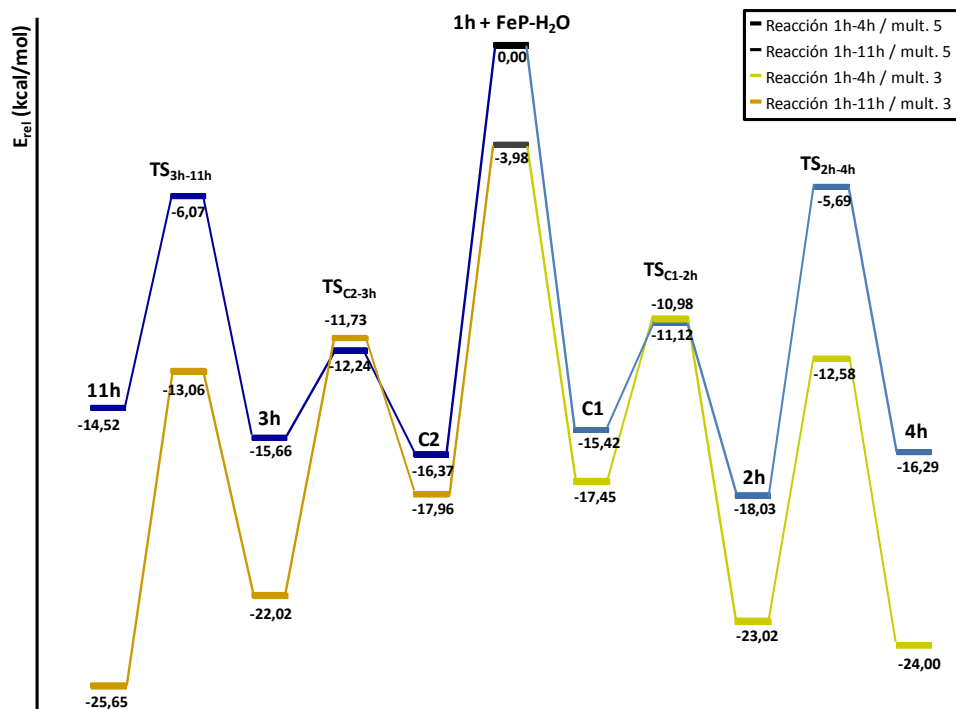


Figura 4.3.7 – Perfil de energía del proceso en estado quintuplete y triplete. Metodología B3LYP/Lanl2dz(Fe)-3-21G(resto)

Una de las primeras conclusiones que destacan del perfil de energía de la Figura 4.3.7 es que el estado triplete es más estable que el quintuplete a lo largo de toda la superficie de energía potencial. Cabría únicamente comentar que los estados de transición iniciales (TS_{C1-2h} y TS_{C2-3h}) presentan el estado quintuplete ligeramente más estable que el triplete, pero esta diferencia es insignificante, por lo que se puede considerar que son estados degenerados. Por este motivo, la explicación energética del proceso se basará en los resultados obtenidos para dicho estado triplete.

Tras la interacción entre FeP-H₂O y 1h, se forma un complejo C1 que es 13,47 kcal/mol más estable que los reactivos de partida. A través del TS_{C1-2h} se forma el O-radical 2h, que se encuentra 19,04 kcal/mol por debajo de

los reactivos de partida en estado triplete. La barrera energética del proceso es de 6,47 kcal/mol. Para la reacción que va de **1h** a **3h**, la variación en la energía es muy parecida, tras la formación del complejo C2, 13,98 kcal/mol más estable que los reactivos iniciales, se forma el O-radical **3h**, que presenta una energía 18,04 kcal/mol menor que los reactivos. En este caso la barrera energética del proceso es 6,23 kcal/mol. La formación del C-radical **4h** implica la disminución de energía de casi 1 kcal/mol respecto al O-radical **2h**, y tiene lugar a través de una barrera de energía de 10,44 kcal/mol. El otro C-radical **11h** se forma por disminución de 3,63 kcal/mol en la energía respecto a **3h**, pasando por una barrera energética de 8,96 kcal/mol. Según estos valores, la formación de **11h** es más favorable que la formación de **4h**, tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético. Esta tendencia coincide con los resultados obtenidos con los otros modelos y metodologías explicados en apartados anteriores. Además, todos los puntos estacionarios son más estables que los reactivos de partida, por lo que una vez iniciado el proceso la formación de los diferentes productos puede tener lugar.

Con la base 6-31G* para los átomos no metálicos, manteniendo la base LANL2DZ para el hierro, se obtienen las energías mostrados en la Figura 4.3.8.

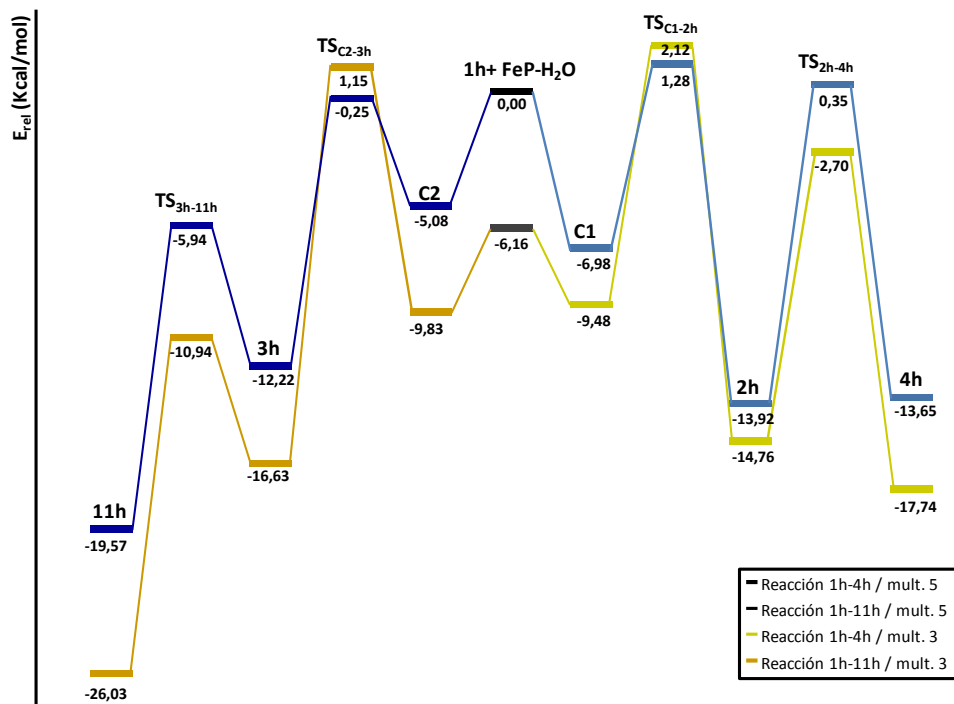


Figura 4.3.8 – Perfil de energía del proceso en estado quintuplete y triplete. Metodología B3LYP/LanL2dz(Fe)-6-31G*(resto)

Al igual que con la otra metodología, la superficie de energía potencial del estado triplete está por debajo de la del estado quintuplete en todos los puntos estacionarios, excepto en las estructuras de transición iniciales, en las que el quintuplete es ligeramente más estable que el triplete. La diferencia energética es de 0,84 y 1,40 kcal/mol para el TS_{C1-2h} y el TS_{C2-3h}, respectivamente, por lo que puede asumirse que son estados degenerados en energía. Una diferencia destacada respecto al perfil obtenido para la base 3-21G es que, en este caso, no todos los puntos estacionarios resultan más estables que los reactivos iniciales. Las estructuras de transición TS_{C1-2h} y el TS_{C2-3h} son del orden de 8,28 y 7,31 kcal/mol, respectivamente, menos estables que los reactivos de partida en estado triplete.

En base a los resultados obtenidos para el estado electrónico triplete, los complejos C1 y C2 formados tras la interacción entre FeP-H₂O y 1h, presentan energías de 3,32 y 3,67 kcal/mol por debajo de los reactivos, respectivamente. Posteriormente, a través del TS_{C1-2h} se forma el O-radical 2h, que presenta una energía relativa de 8,6 kcal/mol menor que los reactivos triplete. La barrera energética del proceso es de 11,6 kcal/mol. A partir del complejo C2, se forma el O-radical 3h, que presenta una energía 10,47 kcal/mol menor que los reactivos. En este caso la barrera energética del proceso es de 10,98 kcal/mol. La formación del C-radical 4h implica la disminución de energía de 2,98 kcal/mol respecto al O-radical 2h, y tiene lugar a través de una barrera de energía de 12,06 kcal/mol. El otro C-radical 11h se forma por disminución de 9,40 kcal/mol en la energía respecto a 3h, pasando por una barrera energética de 5,69 kcal/mol. Como puede observarse, aunque en los pasos de obtención de los complejos C1 y C2, así como de los O-radicales 2h y 3h, el sistema no alcanza tanta estabilidad como se predecía con la otra base de cálculo, en la formación de los C-radicales 4h y sobre todo de 11h si que se da este grado de estabilización.

Dado que hay discrepancias en los resultados obtenidos con las dos bases anteriores, se ha decidido emplear la base 6-311G para todos los átomos al objeto de determinar la fiabilidad de los resultados. En este caso únicamente se ha explorado la superficie triplete ya que en los casos anteriores era la de menor energía. En la figura 4.3.9 se representa el perfil energético de estos procesos.

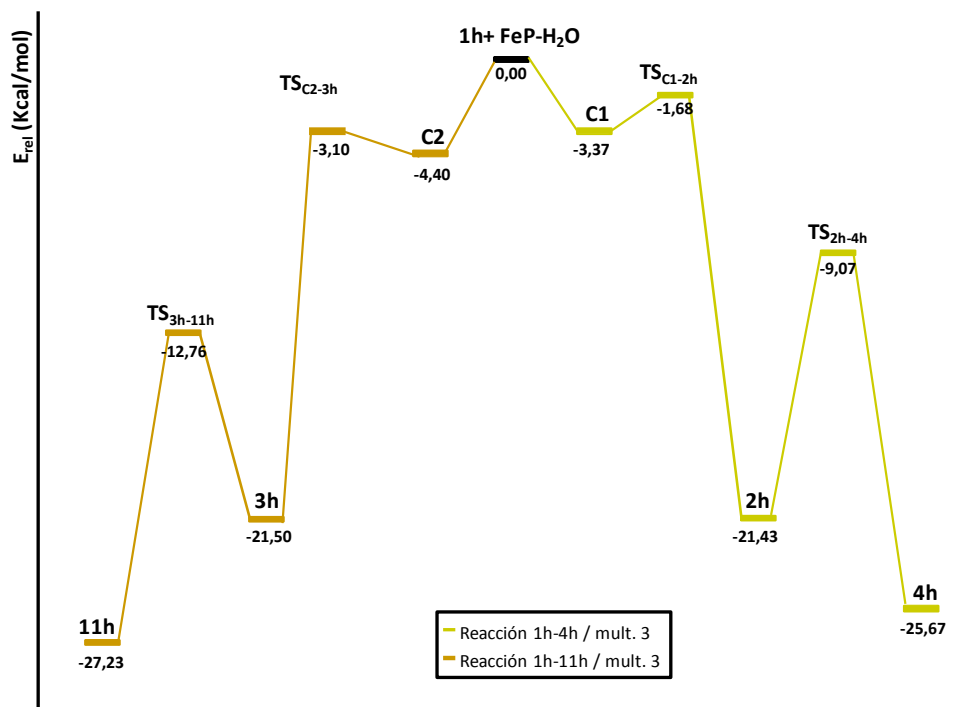


Figura 4.3.9 – Perfil de energía del proceso en estado triplete. Método B3LYP/ 6-311G

Los resultados obtenidos con esta base siguen la misma tendencia que los obtenidos con las base Lan12dz(Fe)/3-21G(resto), ya que todos los puntos estacionarios presentan energías inferiores a los reactivos de partida, por lo que una vez iniciado el proceso la formación de los diferentes productos puede tener lugar. En cuanto a diferencias cuantitativas entre ambas bases, cabe destacar que los complejos C1 y C2 se encuentran menos estabilizados para la base 6-311G.

Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos hasta ahora con otros sistemas y metodologías, por lo que se puede afirmar que la base Lan12dz(Fe)/6-31G*(resto), que da valores anormalmente elevados para las energías de los complejos iniciales C1 y C2, no es tan adecuada para tratar este tipo de sistemas.

A pesar de estas diferencias entre los cálculos obtenidos con las diferentes bases, las principales conclusiones siguen la misma línea, ya que la obtención de **11h** es más estable termodinámica y cinéticamente que la obtención de **4h**, así como que el estado triplete predomina a lo largo de toda la superficie de energía potencial.

En la Tabla 4.3.3 se muestra el valor de S^2 de los diferentes puntos estacionarios, calculados como estado triplete y quintuplete. De este modo se puede comprobar que la multiplicidad de los mínimos y estructuras de transición obtenidos es la que se esperaba, puesto que no existe contaminación de espín. Además, se muestra también el valor de la densidad de espín (S) para los átomos seleccionados, de modo que puede comprobarse sobre qué átomos recaen los electrones desapareados. De este modo, en **2h** y **3h**, la densidad de espín recae sobre el O1 y O2, respectivamente, además de hallarse sobre el átomo de hierro. En **4h** y **11h** queda reflejado el carácter C-radicalario, puesto que la densidad electrónica, además de estar localizada sobre el átomo de Fe, se encuentra sobre el C4.

Tabla 4.3.3 – Valores del operador S^2 y de la densidad de espín para los átomos seleccionados de los puntos estacionarios que participan en la formación de los C-radicales **4h** y **11h**. Metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-3-21G(resto)

	TRIPLETE			QUINTUPLETE		
	S^2		S	S^2		S
hemo-H ₂ O	2,0200	Fe	2,0512	6,0070	Fe	3,7080
Cl	2,0213	Fe	2,0532	6,0220	Fe	3,7522
TS _{Cl-2h}	2,1608	Fe	1,7451	6,3194	Fe	3,8856
		O1	0,4326		O1	-0,3391
2h	2,0399	Fe	0,9592	6,0518	Fe	2,6465
		O1	0,7824		O1	0,3235
TS _{2h-4h}	2,0412	Fe	0,9592	6,0535	Fe	2,6194
		O1	0,4901		O1	0,4904
		C4	0,5320		C4	0,5435
					O2	0,3479

	s^2	TRIPLETE		s^2	QUINTUPLETE	
			s			s
4h	2,0469	Fe	1,0106	6,0532	Fe	2,6727
		C4	0,9955		C4	1,0307
					O1	0,3149
C2	2,0216	Fe	2,0513	6,0071	Fe	3,7240
TS _{C2-3h}	2,1511	Fe	1,7344	6,3090	Fe	3,8750
		O2	0,4174		O2	-0,3238
3h	2,0351	Fe	0,8793	6,0508	Fe	2,5561
		O2	0,7850		O2	0,7643
		O1	0,1591		O1	0,4070
TS _{3h-11h}	2,0424	Fe	0,8841	6,0573	Fe	2,5595
		C4	0,6403		C4	0,6601
		O1	0,1541		O1	0,3982
		O2	0,3536		O2	0,3253
11h	2,0369	Fe	0,9044	6,0507	Fe	2,5882
		C4	1,0713		C4	1,0840
		O1	0,1361		O1	0,3779

Las geometrías de los puntos estacionarios participantes en el proceso, obtenidos con la metodología LANL2DZ(Fe)/3-21G(resto) se presentan en la Figura 4.3.10, en el caso de la ruta radicalaria del radical O1, y en la Figura 4.3.11, en el caso de la ruta radicalaria del radical O2. Estos resultados se muestran para el estado triplete, mostrándose entre paréntesis los valores concernientes al estado quintuplete.

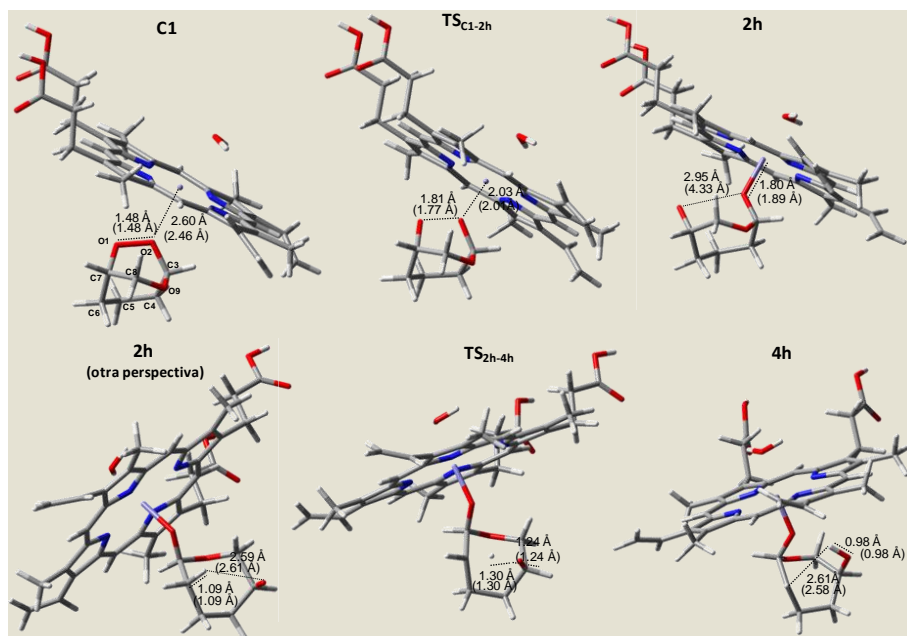


Figura 4.3.10 – Geometrías de los puntos estacionarios de la ruta radicalaria O1 para los estados triplete y quintuplete. Metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-3-21G(resto)

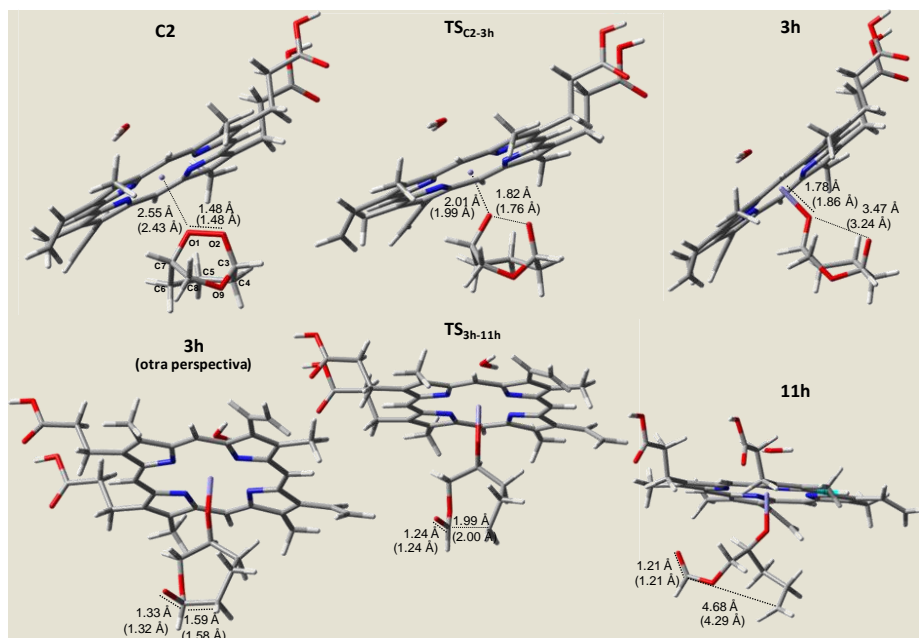


Figura 4.3.11– Geometrías de los puntos estacionarios de la ruta radicalaria O2 para los estados triplete y quintuplete. Metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-3-21G(resto)

Como puede observarse, los complejos formados por interacción del átomo de hierro con el O2 o el O1, C1 y C2 respectivamente, presentan valores parecidos en las distancias de enlace O1-O2 y O1-Fe/O2-Fe. Si se compara con los complejos análogos obtenidos con el modelo Fe(OH)₂ dihidratado, la distancia O1-O2 es prácticamente la misma, pero la distancia Fe-O1/O2 es un poco mayor con el modelo hemo como agente reductor, lo que puede ser debido al impedimento estérico que ejerce una molécula tan voluminosa como el hemo. En las estructuras de transición que llevan a la formación de los O-radicales a partir de los complejos, TS_{C1-2h} y TS_{C2-3h}, esta distancia Fe-O1/O2 es muy parecida a la del otro modelo, aunque la distancia O1-O2 es un poco mayor en este caso. En las estructuras de transición TS_{2h-4h} y TS_{3h-11h}, las distancias implicadas en la reacción, prácticamente no varían respecto al otro modelo más sencillo, esto se debe a que la molécula de hemo no interviene directamente en la reacción, al igual que ocurre con los C-radicales 4h y 11h.

4.3.3. Estudio comparativo de la descomposición de la artemisinina utilizando diferentes modelos del grupo hemo

El mismo estudio de la reactividad concerniente a la descomposición de la artemisinina se ha llevado a cabo utilizando el sistema modelo del hemo FeP(Im) (ver Figura 4.3.2), y el sistema 6,7,8-trioxabicyclo [3.2.2]nonano como modelo de la artemisinina. De manera análoga al estudio con el sistema FeP-H₂O, se ha utilizado la base LANL2DZ para el átomo de hierro y las bases 3-21G y 6-31G* para el resto de átomos.

En la hemoglobina el grupo hemo se encuentra coordinado a una histidina, esto podría afectar a la reactividad, y por ello se ha comprobado los efectos que una molécula de imidazol situada en el entorno de coordinación del grupo hemo puede ejercer con respecto a la reacción con la artemisinina.

El perfil de energía hallado usando la base 3-21G para los átomos no metálicos es el que se muestra en la Figura 4.3.12.

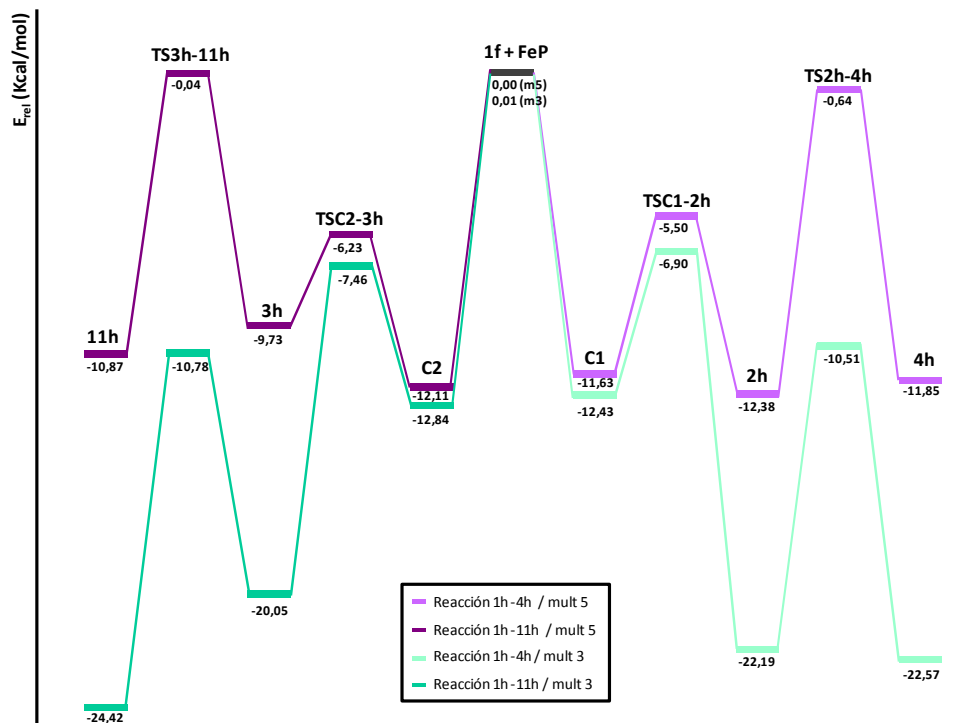


Figura 4.3.12 – Perfil de energía del proceso en estado quintuplete y triplete. Metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-3-21G(resto)

Como ocurría con el modelo FeP-H₂O, el estado triplete predomina como estado fundamental a lo largo de la superficie de energía potencial. Aún así, en aquellas estructuras en las que el átomo de hierro todavía no ha formado el enlace con los átomos O1 o O2, es decir, en aquellos casos en que el hierro está coordinado únicamente por cinco ligandos (FePIm, C1, TSC1-2h, C2 y TSC2-3h), los estados electrónicos triplete y quintuplete se diferencian poco en energía. En el estado triplete, las tendencias energéticas son exactamente las mismas que las obtenidas con el otro modelo: todos los caminos de reacción son posibles una vez iniciado el proceso, puesto que todos los puntos estacionarios son más estables que

los productos de partida; los C-radicales son más estables que los O-radicales; y el C-radical **11h** es la especie más estable y se forma de manera más favorable que **4h** termodinámica y cinéticamente.

Las energías obtenidas utilizando la base 6-31G* para los átomos no metálicos se representan en el perfil de energía de la Figura 4.3.13.

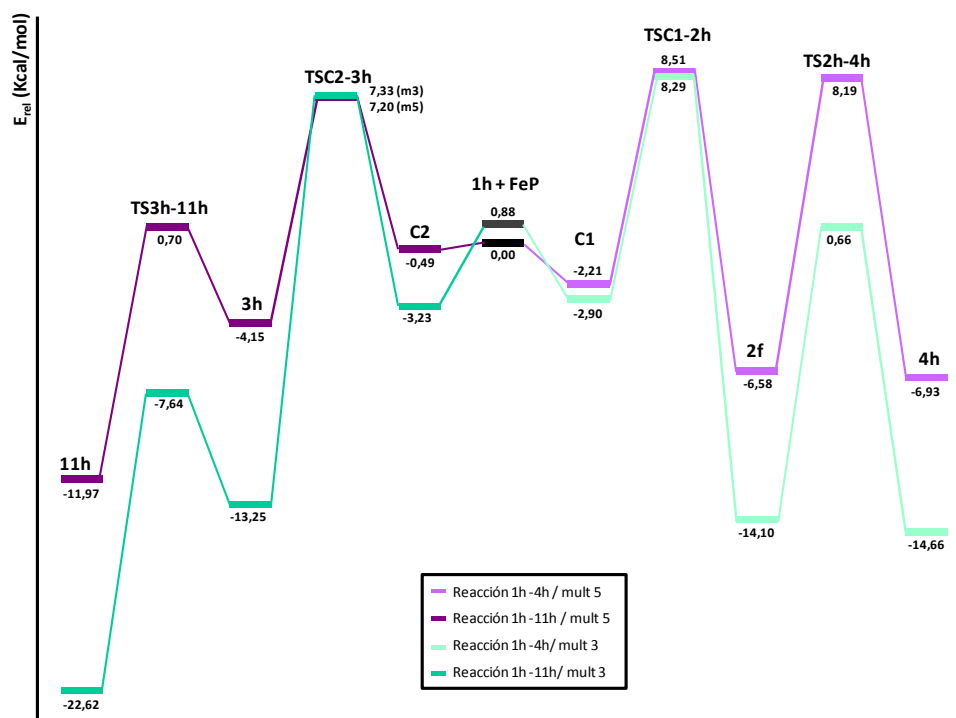


Figura 4.3.13 - Perfil de energía del proceso en estado quintuplete y triplete. Metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-6-31G*(resto)

Con esta base de cálculo se ha obtenido que todos los puntos estacionarios son triplete en el estado fundamental, excepto los reactivos de partida, ya que la molécula de FeP(Im) es quintuplete. Sin embargo, la diferencia del quintuplete y triplete para este punto estacionario no es significativa, por lo que se puede considerar que son estados

degenerados. También los estados de transición iniciales (TS_{Cl-2h} y TS_{C2-3h}) presentan los estados triplete y quintuplete degenerados. Este mismo estudio con la base 3-21G para los átomos no metálicos (ver Figura 4.3.11) también exhibe los estados triplete y quintuplete muy próximos en energía para las moléculas $FePIm$, Cl , TS_{Cl-2h} , $C2$ y TS_{C2-3h} , aunque con esta metodología este efecto se ve más acentuado. Con estas excepciones, las conclusiones a las que se llega con el perfil triplete son las mismas que las que se obtienen utilizando el otro modelo, $FeP-H_2O$ y la misma metodología, y las mismas que se obtienen con este modelo y la otra base de cálculo utilizada:

- Todos los mínimos son más estables que los productos de partida, de modo que todos los caminos de reacción son posibles una vez iniciado el proceso.
- Los C-radicales son más estables que los O-radicales.
- El C-radical **11h** es la especie más estable y se forma de manera más favorable que **4h** termodinámica y cinéticamente.

Conclusiones

✓ El estado fundamental de las moléculas FeP y $FeP-H_2O$ es triplete, mientras que para la molécula $FeP(Im)$ el estado triplete y quintuplete se encuentran degenerados.

✓ El átomo de hierro se encuentra situado fuera del plano de la porfirina para todos los modelos de hemo estudiados. Esta situación se acentúa para los estados electrónicos de espín elevado.

Las conclusiones referentes al estudio de la reactividad de la artemisinina y el FeP-H₂O, son:

✓ A lo largo del perfil de energía potencial de las reacciones que conducen a la formación de los C-radicales se mantiene el estado fundamental triplete.

✓ La formación de **IIIh** es más favorable que la de **4h**, tanto desde un punto de vista termodinámico como cinético, al igual que se ha observado con otras metodologías y modelos utilizados.

✓ Todos los productos (intermedios) de la descomposición de la artemisinina son más estables que los reactivos de partida, por lo que ambas rutas reactivas pueden tener lugar, coincidiendo con las observaciones experimentales.

✓ Comparando las energías obtenidas con diferentes bases, se observa que con la base LANL2DZ/6-31G* los resultados difieren de los obtenidos con las bases LANL2DZ/3-21G y 6-311G en lo que respecta a la formación de los complejos y los O-radicales. Aún así, las tendencias en cuanto a estabilidad y estado electrónico de los diferentes puntos estacionarios son las mismas para todas las bases de cálculo.

Las conclusiones referentes al estudio comparativo de la reactividad de la artemisinina con FeP-H₂O y FeP(Im):

✓ La reactividad es cualitativamente la misma para ambos sistemas modelo, aunque con el modelo FeP(Im) las estructuras en las que el átomo de hierro presenta únicamente cinco ligandos de coordinación presentan los estados triplete y quintuplete degenerados.

✓ El hecho de que el grupo hemo tenga histidina (FeP(Im)) o agua (Fe-H₂O) en la esfera de coordinación no conduce a una reactividad significativamente diferente con la artemisinina, por lo tanto, para explicar por qué se ha encontrado experimentalmente que la artemisinina no reacciona con la hemoglobina debemos fijarnos en el entorno del grupo hemo en la proteína, y en la posibilidad de que existan impedimentos estéricos.

4.4. Introducción del solvente en el estudio de la descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(II)-hemo-H₂O como agente reductor

El estudio teórico de los procesos químicos que tienen lugar en medios condensados ha progresado incesantemente en los últimos años debido al desarrollo de técnicas computacionales específicas. Un paso más en lo que se refiere al estudio del mecanismo de acción de la artemisinina es la inclusión de la fase condensada en la que tiene lugar la reacción biológicamente. En este apartado se estudia la descomposición del modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano catalizado por el grupo hemo con una molécula de agua en el entorno de coordinación del mismo, y en un entorno de moléculas de agua para incluir los efectos del medio.

El esquema de las reacciones estudiadas puede verse en la Figura 4.3.1 y los modelos utilizados en este caso son la molécula 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano como modelo de la artemisinina y como agente reductor el grupo hemo completo, con los grupos carboxílicos protonados y una molécula de agua en la esfera de coordinación (hemo-Fe(II)-H₂O), mostrado en la figura 4.3.2.

Esta fase de la investigación se ha realizado usando dos metodologías de cálculo diferentes: el método continuo PCM (Polarizable Continuum Model) y la metodología híbrida QM/MM, que pertenece al grupo de los métodos discretos.

4.4.1. Estudio con el método PCM

En los modelos continuos de solvatación el disolvente está caracterizado por un medio continuo sin estructura que se polariza por efecto del soluto provocando una respuesta electrostática que afecta a la energía, la estructura y las propiedades del soluto. En este trabajo se ha utilizado el modelo del continuo polarizable (PCM, *Polarizable Continuum Model*) desarrollado originalmente por Tomasi, Miertus y Scrocco.^[61, 62]

En esta tesis doctoral el disolvente que se ha utilizado en el modelo PCM es el agua, ya que presenta una constante dieléctrica (78,39) suficientemente grande como para producir un efecto substancial sobre la molécula de soluto, y a su vez posee una estructura molecular simple que facilita su inclusión explícita en el sistema a la hora de proseguir con el estudio y aplicar la metodología QM/MM, detallada en el próximo apartado.

Las reacciones que se estudian son las que conducen a la formación de los C-radicales **4** y **II** en fase acuosa (ver Figura 4.3.1). Se han localizado los puntos estacionarios implicados para el estado triplete, ya que de los resultados del mismo sistema en vacío (apartado 4.3) se concluye que las especies participantes en estos procesos poseen dos electrones desapareados en su estado fundamental.

En la Figura 4.4.1. se representa el perfil energético de estos procesos para el estado triplete, obtenido con la base LANL2DZ para el átomo metálico y 3-21G para los átomos no metálicos.

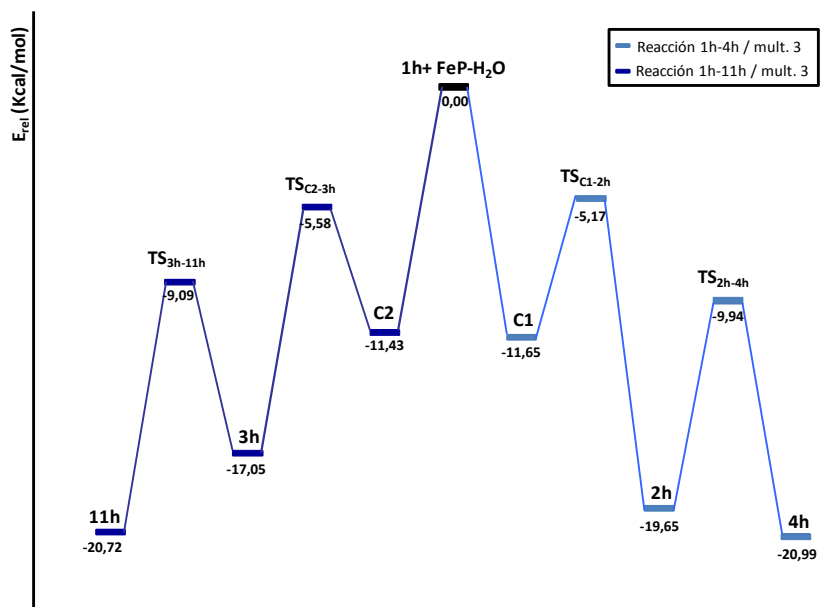


Figura 4.4.1 – Perfil de energía del proceso en estado triplete. Modelo PCM y método B3LYP/ LANL2DZ (Fe)/3-21G(resto)

De este perfil de energía puede deducirse que todas las especies, tanto mínimos como estados de transición, son más estables que los productos de partida; los C-radicales son más estables que los O-radicales. En este caso, los C-radicales **11h** y **4h** presentan la misma estabilidad, aunque desde un punto de vista cinético **11h** es la especie más estable, puesto que su formación implica superar barreras de menor energía, por lo que se forma de manera más favorable que **4h**. La inclusión del disolvente no modifica prácticamente las conclusiones hasta ahora alcanzadas acerca de la reactividad de la artemisinina y el grupo hemo.

Experimentalmente, para las reacciones realizadas en agua/acetonitrilo con sulfato ferroso se obtiene tanto el producto **6** como el **12**, que

transcurren a través de la formación de los C-radicales 4 y II, respectivamente. El hecho que la obtención de 6 sea ligeramente más favorable que la de 12, dejan abierta la posibilidad de que en agua o en disolución básicamente acuosa sea posible la obtención de ambos productos.

Cabe también mencionar que al considerar el efecto del disolvente, el perfil que se obtiene es un poco más suave que el obtenido en vacío.

Las geometrías de los puntos estacionarios participantes en estas reacciones se presentan en la Figura 4.4.2, en el caso de la ruta del radical O1, y en la Figura 4.4.3, en el caso de la ruta del radical O2.

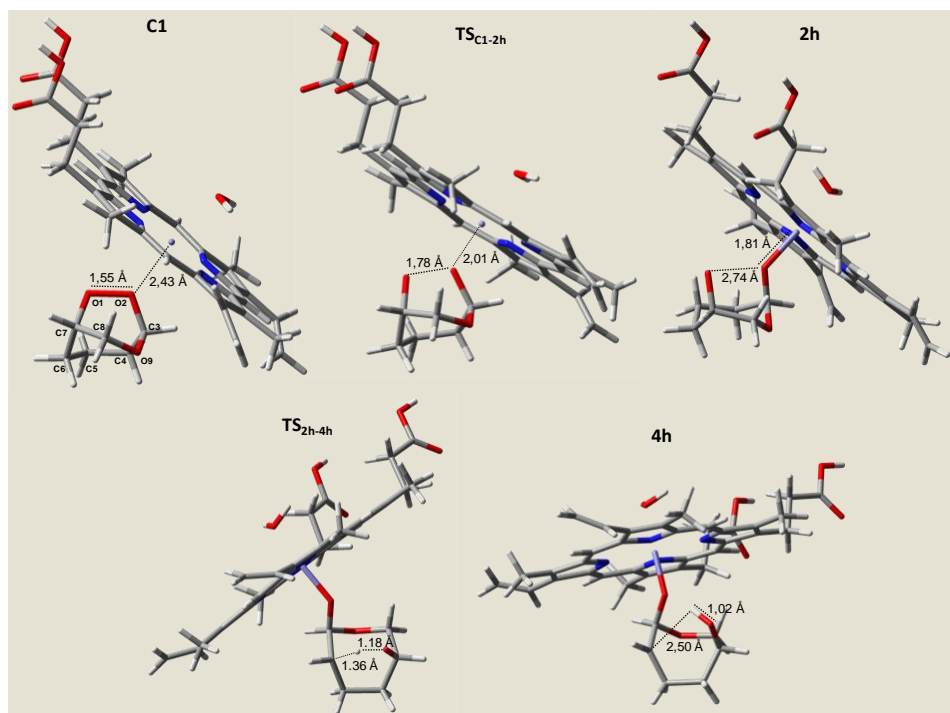


Figura 4.4.2 – Geometrías de los puntos estacionarios de la ruta radicalaria O1 para el estado triplete. Modelo PCM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-3-21G(resto).

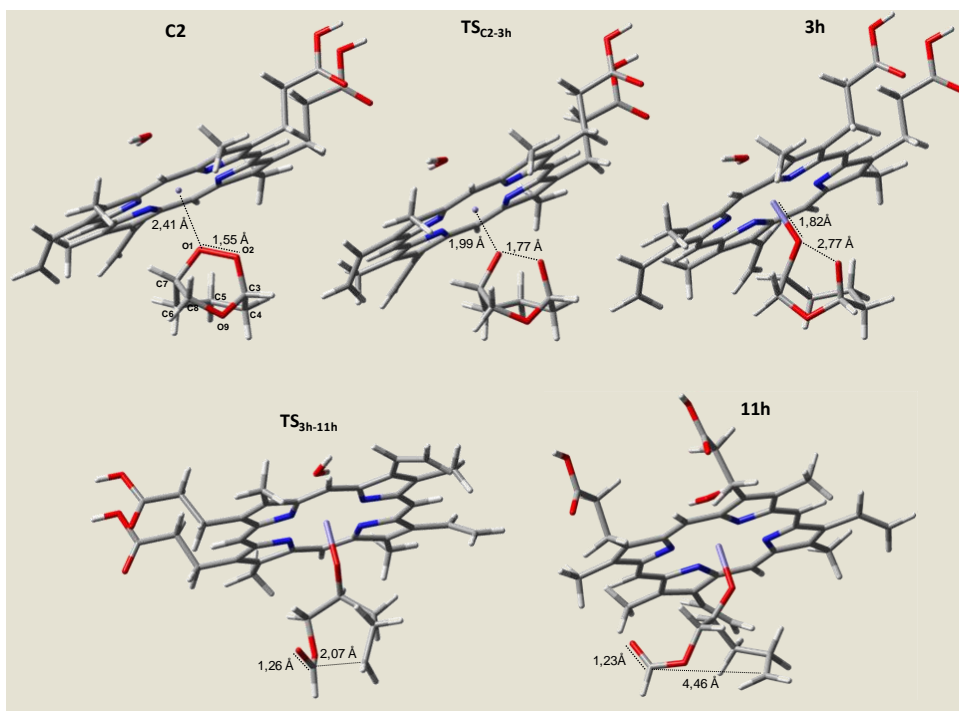


Figura 4.4.3 – Geometrías de los puntos estacionarios de la ruta radicalaria O2 para el estado triplete. Modelo PCM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe)-3-21G(resto).

4.4.2. Estudio con el método QM/MM

Como se ha comentado en el Capítulo 2 de Fundamentos teóricos, el principal problema del estudio de procesos en disolución está asociado al tamaño de los sistemas a considerar, ya que para describir el sistema de manera explícita se requiere un número de átomos muy elevado. Este problema se puede resolver mediante el uso de la metodología híbrida QM/MM, que combina la mecánica cuántica con la mecánica molecular para tratar diferentes regiones del sistema.

El procedimiento que se ha llevado a cabo es que, partiendo de las geometrías de los estados de transición implicados en la formación de los

O-radicales y C-radicales obtenidos para este mismo modelo molecular en fase gaseosa (apartado 4.3 del *Capítulo 4*), se procede a la ampliación del sistema por inclusión del solvente, de manera que dichas estructuras de transición se sitúan dentro de una caja de moléculas de agua pre-equilibradas de 80 Å de arista. Una vez construido el sistema, que cuenta con un número de átomos del orden de cincuenta mil, se minimizan las aguas y, seguidamente, se realiza una dinámica molecular de Langevin-Verlet de 300 ps a 300K. En esta dinámica el sustrato, es decir, la artemisinina y el grupo hemo, está fijo y se describe mediante las cargas calculadas con CHELPG para el sistema en vacío. Tras la dinámica, se minimizan las aguas y, una vez se tiene el sistema con las aguas relajadas, se procede a delimitar las diferentes regiones: la región cuántica (QM), formada por la artemisinina y el hemo (más la molécula de agua que completa la esfera de coordinación del hierro); la región clásica (MM), formada por las moléculas de agua; y se definen también las condiciones de contorno, en este caso condiciones periódicas y que además mantienen fijas todas aquellas moléculas de agua que se encuentran a una distancia mayor de 22 Å del átomo de hierro. Además, para describir las interacciones no enlazantes se han aplicado distancias de corte (*cutoffs*) utilizando el esquema de la función de conmutación (o función *fswitch*) con un rango de radios de 14 a 18 Å para la parte MM y de truncado con lista constante para la parte QM. Con la definición del sistema mencionada, se han localizado las estructuras de transición implicados en la formación de los C-radicales **4h** y **11h**, utilizando la metodología híbrida QM/MM. El hecho de que el sistema contenga metales de transición (el átomo de hierro) condiciona el uso de las metodologías de la parte cuántica, puesto que el nivel de cálculo semiempírico no tiene implementado este tipo de átomos. Recientemente, y en el seno de nuestro grupo de investigación, se han realizado modificaciones de la librería Dynamo que posibilitan el tratamiento de la parte cuántica con

metodologías *ab initio* o DFT. De este modo, la parte cuántica (QM) se ha tratado con la metodología B3LYP, tal como se ha hecho para los estudios anteriores, con las bases de cálculo LANL2DZ para el átomo de hierro, y 3-21G para el resto de átomos. Por otra parte, la región clásica (MM) se ha descrito haciendo uso de los campos de fuerza OPLS-AA y TIP3P. Las iteraciones de la parte cuántica están dirigidas por el algoritmo de BAKER, mientras que las iteraciones de la parte clásica se rigen por las rutinas de minimización L-BFGS-B. Localizadas las estructuras de transición, se realizan cálculos IRC que conducen a zonas cercanas a los mínimos, de modo que realizando optimizaciones a partir de esos puntos se localizan los mínimos: reactivos y productos.

A la hora de realizar este estudio, la manera de proceder ideal hubiera sido buscar un estado de transición en primer lugar, encontrar los mínimos asociados a éste seguidamente y, a partir de estos mínimos, buscar los estados de transición que se suceden en las siguientes etapas de reacción. Sin embargo, dado el elevado tiempo de cálculo que cabría invertir en el caso de proceder de esta manera, se ha realizado la búsqueda de cada estado de transición por separado, junto con sus correspondientes mínimos. De este modo, el sistema utilizado no es el mismo para todas las etapas de reacción, puesto que el número de moléculas de agua consideradas no coincide. A raíz de esto, no es posible presentar todas las etapas de reacción en un único perfil, de manera que se presenta el perfil de energía para cada etapa de reacción por separado. Cabe mencionar que el estudio de cada etapa de reacción se ha realizado para el estado triplete y quintuplete.

Reacción de reducción del enlace endoperóxido

La reducción del 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano (**1h**) evoluciona a través de dos etapas de reacción, dependiendo de cuál de los dos oxígenos del

enlace endoperóxido se una al átomo de hierro del grupo hemo, en una se forma el O-radical **2h**, mientras que en la otra el O-radical **3h** (ver Figura 4.3.1).

• ***Formación del O-radical 2h***

En la Figura 4.4.4 se muestra el perfil de energía para la reacción que da lugar a la formación de **2h** a partir del complejo **C1**, en el cual existe interacción entre el átomo de hierro del grupo hemo y el O₂ del 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano.

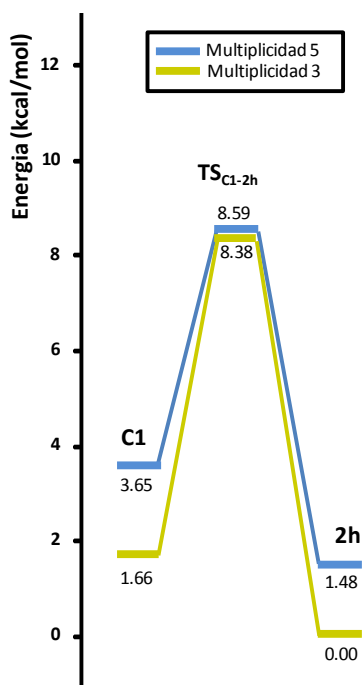


Figura 4.4.4 – Perfil de energía de la ruta radicalaria O₂ para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe) 3-21G(resto).

Como se observa en el perfil, todos los puntos estacionarios implicados en la formación de **2h** presentan estado electrónico triplete, de manera que solamente serán analizados los datos referentes a esta multiplicidad. La barrera de energía de esta etapa es de 6,72 kcal/mol. Si se compara este valor con los valores obtenidos en vacío con las mismas bases de cálculo, se obtenía una barrera de 11,6 kcal/mol, de manera que el perfil es más suave cuando se tienen en cuenta los efectos del medio. El O-radical **2h** resulta 1,66 kcal/mol más estable que el complejo **C1**. La misma tendencia se ha obtenido en vacío, aunque la estabilización de **2f** era de 5,28 kcal/mol en ese caso.

Las geometrías de las especies implicadas, en estado triplete, se muestran en la Figura 4.4.5. Éstas muestran valores muy similares a los obtenidos en vacío con la misma metodología, aunque cabe destacar que en **2h** la distancia O1-O2 es menor en fase condensada, lo que se explica porque existen moléculas de agua que impiden que este enlace se pueda abrir tanto.

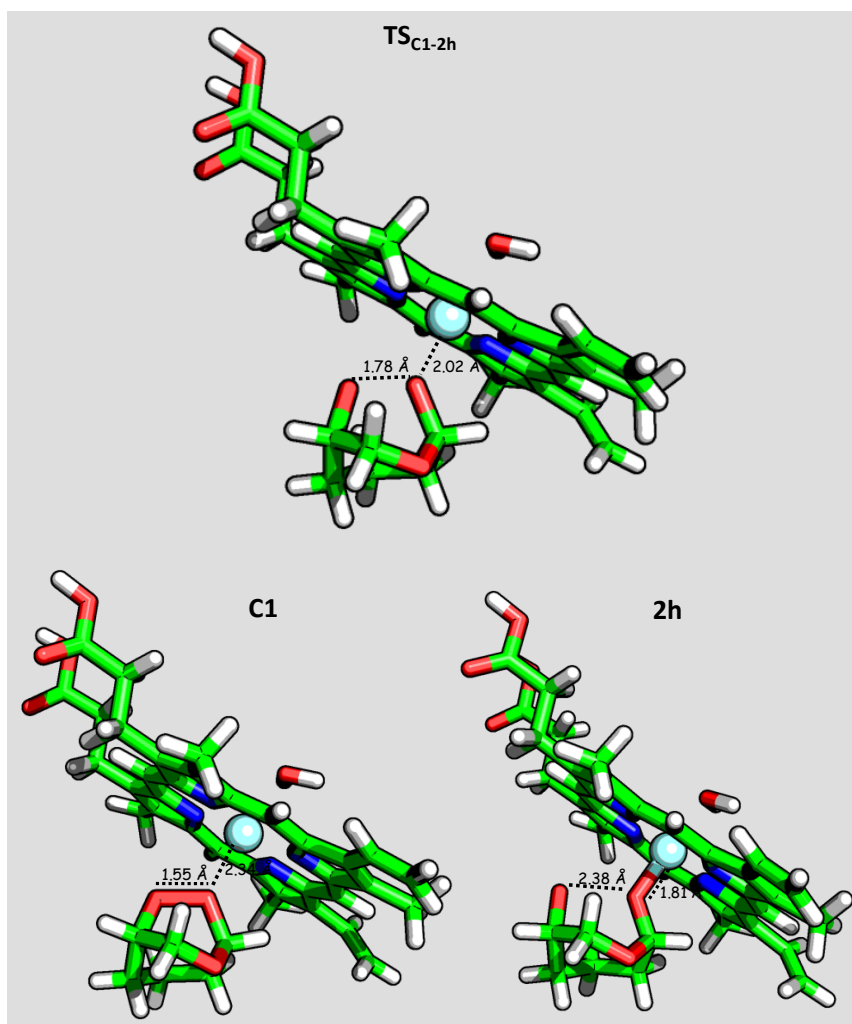


Figura 4.4.5 – Geometrías de los puntos estacionarios de la ruta radicalaria O2 para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe) 3-21G(resto).

• ***Formación del O-radical 3h***

De manera análoga, en la Figura 4.4.6, se presenta el perfil de energía para la reacción que da lugar a **3h** a partir del **C2**, en el cual el átomo de hierro del grupo hemo interacciona con el átomo O1 del 6,7,8-trioxabícico[3.2.2]nonano.

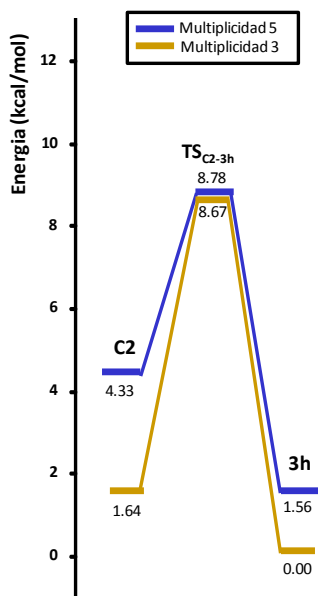


Figura 4.4.6 – Perfil de energía de la ruta radicalaria O1 para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lanl2dz(Fe) 3-21G(resto).

Este perfil presenta energías muy parecidas a las obtenidas para la formación de **2h**. En primer lugar, cabe decir que todos los puntos estacionarios implicados presentan también estado electrónico triplete. La barrera de energía de esta etapa para el estado triplete es de 7,03 kcal/mol. En vacío, para esta misma reacción y con las mismas bases de cálculo, se obtiene una barrera de 10,98 kcal/mol. También en este caso el perfil se suaviza cuando se tiene fase condensada. El O-radical **3h** resulta 1,64 kcal/mol más estable que el complejo.

En la Figura 4.4.7 se muestran las geometrías de las especies implicadas en estado triplete. Al igual que en la otra etapa estudiada, estas geometrías presentan valores muy similares a los obtenidos en vacío con la misma metodología, aunque en este caso en **3h** también se observa una distancia O1-O2 menor en fase condensada debido al impedimento para la separación de estos átomos ejercido por las moléculas de agua.

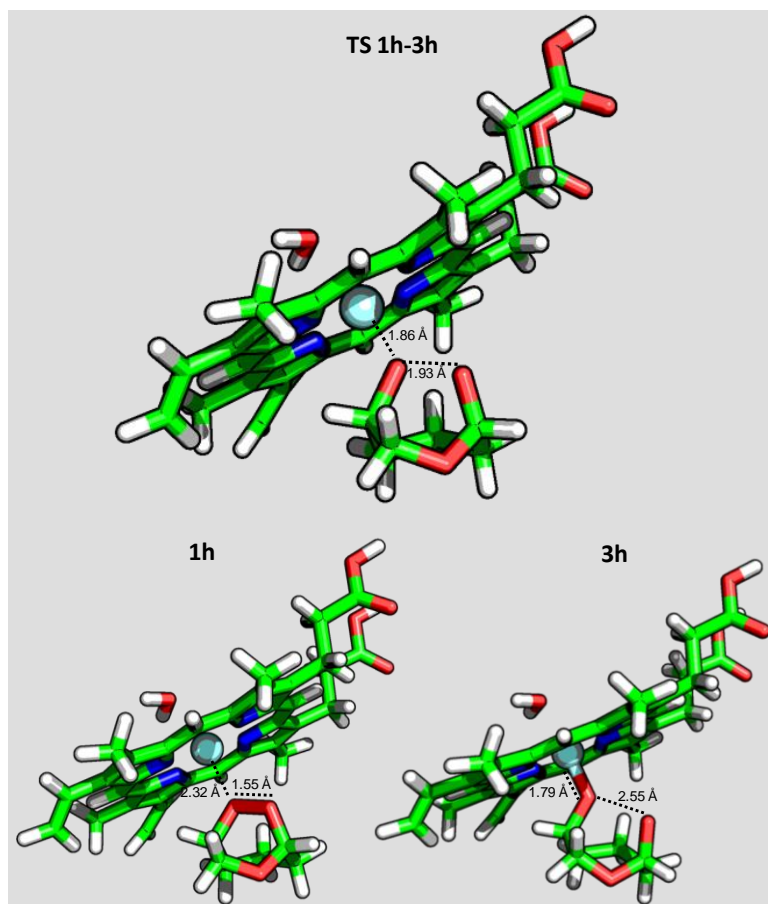


Figura 4.4.7 – Geometrías de los puntos estacionarios de la ruta radicalaria OI para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe) 3-21G(resto).

Reacción de formación de los C-radicales

Las etapas que suceden a la formación de los O-radicales **2h** y **3h** son la formación de los C-radicales **4h** y **11h**. A partir de **2h**, a través de una transferencia de hidrógeno, se forma el C-radical secundario **4h**; mientras que a partir de **3h**, por escisión de un enlace C-C, tiene lugar la formación del C-radical primario **11h** (ver Figura 4.3.1).

• Formación del C-radical 4h

En la Figura 4.4.8 se muestra el perfil de energía para la reacción que da lugar a la formación del C-radical **4h** a partir de **2h**.

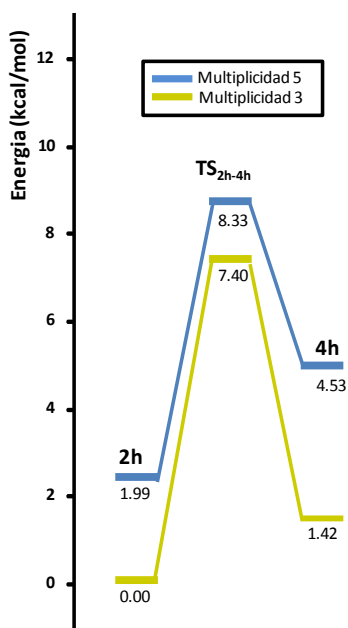


Figura 4.4.8 - Perfil de energía formación de **4h** para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lanl2dz(Fe) 3-21G(resto).

Al igual que en el resto de etapas estudiadas, la reacción es más favorable para el estado triplete. Así, para dicho estado electrónico, la barrera de energía de esta etapa es de 7,40 kcal/mol. En el estudio en vacío, este valor es de 12,06 kcal/mol. De nuevo, el perfil para esta etapa es más suave cuando se tienen en cuenta los efectos del medio. El C-radical **4h** resulta 1,42 kcal/mol menos estable que el O-radical **2h**. Este dato resulta diferente al obtenido en todos los estudios realizados en vacío, en concreto, para la misma base de cálculo, se ha obtenido que **4h** es 2,98 kcal/mol más estable que **2h**.

Las geometrías de las especies implicadas, en estado triplete, se muestran en la Figura 4.4.9. Cabe comentar que tanto en **2h** como en **4h**, las distancias O1-H y H-C4, respectivamente, son menores cuando se consideran los efectos del medio.

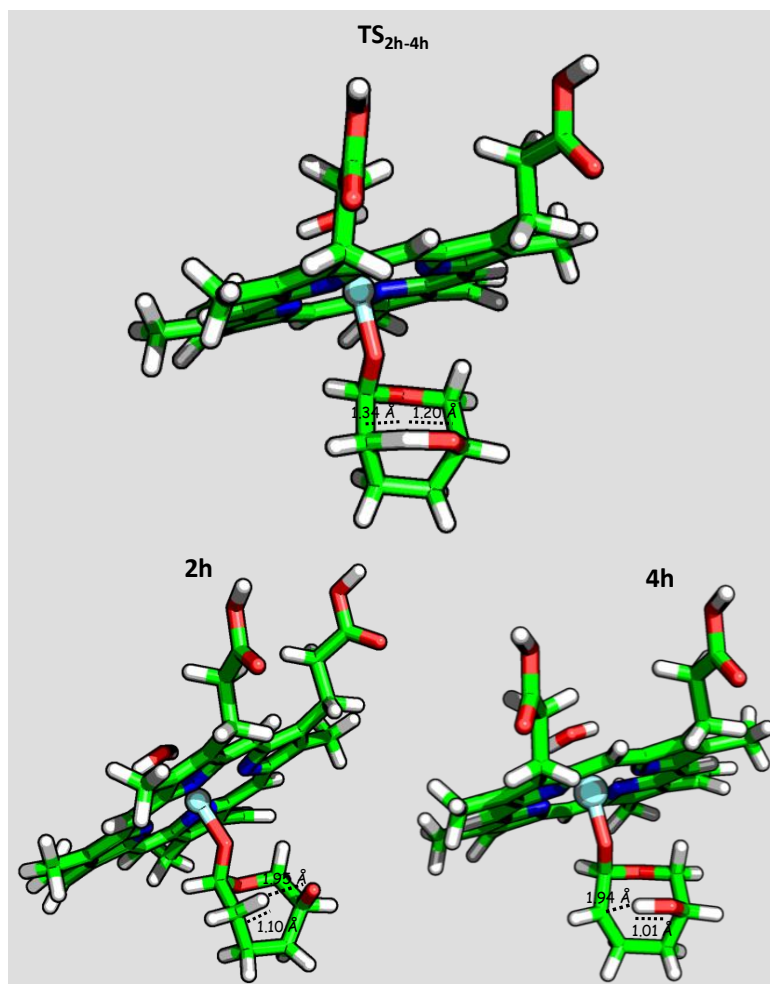


Figura 4.4.9 – Geometrías de los puntos estacionarios de la etapa de formación de 4h a partir de 2h para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe) 3-21G(resto)

• Formación del C-radical 11h

En la Figura 4.4.10 se muestra el perfil de energía para la reacción que da lugar a la formación del C-radical 11h a partir de 3h.

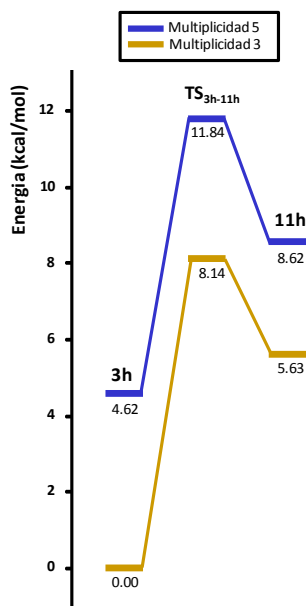


Figura 4.4.10 – Perfil de energía formación de 11h para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lan12dz(Fe) 3-21G(resto).

El estado triplete presenta más estabilidad que el quintuplete en esta etapa de reacción, de manera que se puede afirmar que todas las etapas de reacción implicadas en la formación de los C-radicales tienen lugar en el estado triplete. Para dicho estado electrónico, la barrera de energía de esta etapa es de 8,14 kcal/mol. En el estudio en vacío, este valor es de 5,69 kcal/mol. El C-radical 11h resulta 5,63 kcal/mol menos estable que el O-radical 3h. Igual que ha ocurrido con la formación de 4h, se encuentra que este dato resulta diferente al obtenido en todos los estudios realizados en vacío, en concreto, para la misma base de cálculo, se ha obtenido que 11h es 9,4 kcal/mol más estable que 3h.

Las geometrías de las especies implicadas, en estado triplete, se muestran en la Figura 4.4.11. Las geometrías obtenidas son similares a las halladas para el sistema en vacío, excepto para el C-radical 11h, que presenta una distancia C3-C4 de 2,63 Å cuando se tiene en cuenta el medio de reacción, mientras que esta distancia es mucho mayor (4,68 Å) en vacío.

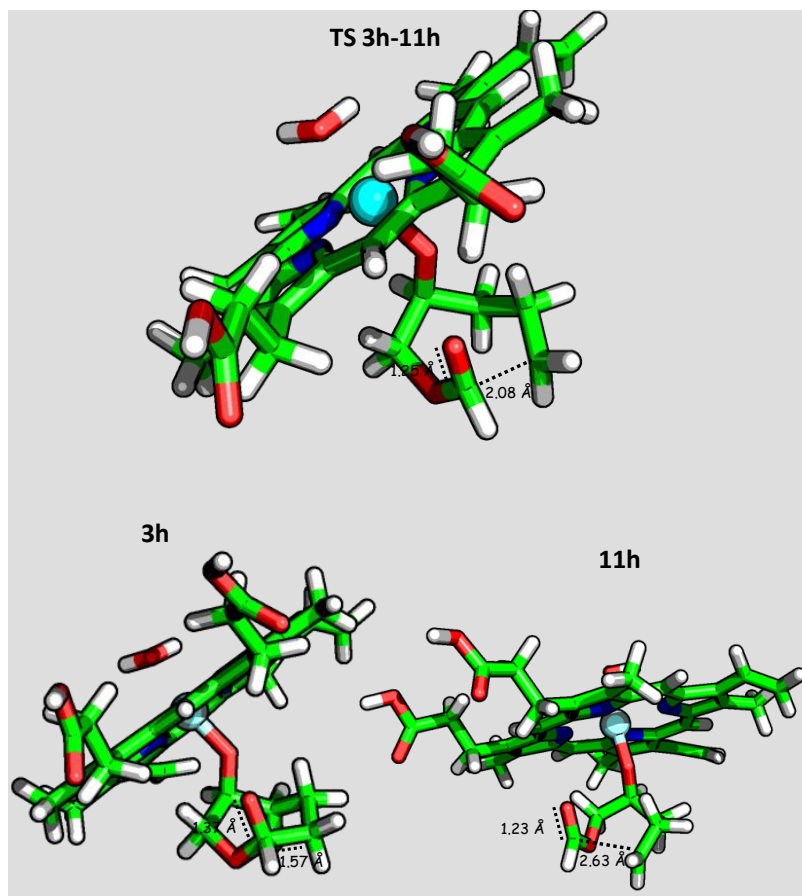


Figura 4.4.9 – Geometrías de los puntos estacionarios de la etapa de formación de 11h a partir de 3h para el estado triplete. Modelo QM/MM y metodología B3LYP/Lanl2dz(Fe) 3-21G(resto)

La diferencia en cuanto a la estabilidad relativa de las especies **3h** y **11h** en vacío y en fase condensada se puede explicar en base a estas geometrías, puesto que en el sistema en fase condensada la distancia C3-C4 es mucho menor, lo que impide la entrada de las moléculas de agua alrededor de toda la molécula. Así pues, la solvatación de **11h** no es completa, lo que hace que éste presente menor estabilidad que **3h**.

En el resto de estudios de formación de los C-radicales se ha encontrado que **IIh** es la especie más estable, y de hecho se han encontrado numerosas pruebas experimentales que dan muestra de su elevada estabilidad relativa. Los resultados obtenidos con la metodología QM/MM no respaldan esta hipótesis, y la explicación de este hecho radica en que, aún tratándose de sistemas con muchos grados de libertad, se han calculado energías potenciales. Para estudiar sistemas en donde se tiene en cuenta el solvente explícitamente, que tienen muchos grados de libertad, resulta más apropiado el cálculo de energías libres. Sin embargo, esto no ha sido posible hasta la fecha, debido a que el sistema estudiado posee átomos de hierro en su estructura, y éstos requieren ser tratados a nivel *ab initio*, no siendo posible calcular energías libres. No obstante, en el seno del grupo de investigación se está trabajando en este sentido.

Conclusiones

✓ La inclusión del solvente con el método PCM no cambia la tendencia de los resultados obtenidos en vacío, lo cual está a favor de la bondad de los resultados previos. Sin embargo debemos señalar que suaviza los perfiles. Esta tendencia es:

- Tanto la ruta que transcurre a través del radical O1 como la que transcurre a través de O2 son viables, puesto que todos los puntos estacionarios son más estables que los reactivos de partida.
- La formación de **IIh** resulta más favorable que la de **4h**, tanto desde una visión cinética. Sin embargo los resultados obtenidos con la metodología PCM sitúan a estas especies en igualdad de estabilidad termodinámica. Con la metodología QM/MM no se pueden comparar ambos C-radicales.

✓ Todas las etapas de reacción implicadas en la formación de los C-radicales **4h** y **11h** transcurren a través de puntos estacionarios que presentan el estado triplete como estado fundamental. Este resultado está de acuerdo con los resultados obtenidos en fase gas para el mismo sistema reactivo.

✓ La inclusión del solvente de manera explícita con la metodología QM/MM ha dado lugar a algunos cambios respecto a los resultados obtenidos en vacío o con la metodología PCM:

- Los perfiles obtenidos para las diferentes etapas se encuentran suavizados respecto a los perfiles en fase gas.
- Los C-radicales **4h** y **11h** resultan menos estables que los O-radicales de los cuales provienen, **2h** y **3h**, respectivamente. Esto se explica por la disposición de las aguas del solvente, ya que éstas dificultan la apertura de los enlaces que se rompen, y por tanto dificultan también la solvatación completa de la molécula. De este modo se explica que la estabilidad relativa de los C-radicales sea menor que la de los O-radicales. Sin embargo, la realización de este estudio con energías libres podría ayudar a elucidar este mecanismo en fase condensada.

✓ Muchos aspectos de las etapas de reducción del enlace endoperóxido se explican de igual manera con el método QM/MM que con el resto de metodologías en vacío. Sin embargo, hemos encontrado algunas discrepancias atribuibles al hecho de no haber podido realizar cálculos QM/MM de energías libres.

Referencias

- [1] S. Kamchonwongpaisan, S. R. Meshnick, *General Pharmacology-the Vascular System* 1996, 27, 587.
- [2] S. R. Meshnick, T. E. Taylor, S. Kamchonwongpaisan, *Microbiological Reviews* 1996, 60, 301.
- [3] J. Gu, K. Chen, H. Jiang, J. Leszczynski, *Journal of Molecular Structure-Theochem* 1999, 491, 57.
- [4] P. L. Olliaro, R. K. Haynes, R. K. Meunier, B. Meunier, Y. Yuthavong, *Trends in Parasitology* 2001, 17, 267.
- [5] W. M. Wu, Y. K. Wu, Y. L. Wu, Z. J. Yao, C. M. Zhou, Y. Li, F. Shan, *Journal of the American Chemical Society* 1998, 120, 13002.
- [6] S. R. Meshnick, A. Thomas, A. Ranz, C. M. Xu, H. Z. Pan, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1991, 49, 181.
- [7] G. H. Posner, C. H. Oh, *Journal of the American Chemical Society* 1992, 114, 8328.
- [8] W. M. Wu, Y. L. Wu, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 2000, 4279.
- [9] A. R. Butler, B. C. Gilbert, P. Hulme, L. R. Irvine, L. Renton, A. C. Whitwood, *Free Radical Research* 1998, 28, 471.
- [10] M. A. Avery, P. C. Fan, J. M. Karle, J. D. Bonk, R. Miller, D. K. Goins, *Journal of Medicinal Chemistry* 1996, 39, 1885.
- [11] G. H. Posner, J. N. Cumming, P. Ploypradith, H. O. Chang, *Journal of the American Chemical Society* 1995, 117, 5885.
- [12] Y. L. Hong, Y. Z. Yang, S. R. Meshnick, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1994, 63, 121.
- [13] A. Robert, J. Cazelles, B. Meunier, *Angewandte Chemie-International Edition* 2001, 40, 1954.
- [14] A. Robert, O. Dechy-Cabaret, J. Cazelles, B. Meunier, *Accounts of Chemical Research* 2002, 35, 167.
- [15] A. Robert, B. Meunier, *Journal of the American Chemical Society* 1997, 119, 5968.
- [16] W. Asawamahsakda, I. Ittarat, Y. M. Pu, H. Ziffer, S. R. Meshnick, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994, 38, 1854.

- [17] A. Robert, F. Benoit-Vical, C. Claparols, B. Meunier, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006, 103, 3943.
- [18] Y. Q. Tang, Y. X. Dong, X. F. Wang, K. Sriraghavan, J. K. Wood, J. L. Vennerstrom, Journal of Organic Chemistry 2005, 70, 5103.
- [19] A. G. Taranto, J. W. D. Carneiro, M. T. de Araujo, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2006, 14, 1546.
- [20] S. Tonmunphean, V. Parasuk, S. Kokpol, Journal of Molecular Structure-Theochem 2005, 724, 99.
- [21] A. D. Becke, Journal of Chemical Physics 1993, 98, 5648.
- [22] C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, Physical Review B 1988, 37, 785.
- [23] B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, Chemical Physics Letters 1989, 157, 200.
- [24] J. D. Gu, K. X. Chen, H. L. Jiang, J. Leszczynski, Journal of Physical Chemistry A 1999, 103, 9364.
- [25] P. M. O'Neill, G. H. Posner, Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47, 2945.
- [26] J. N. Harvey, M. Aschi, H. Schwarz, W. Koch, Theoretical Chemistry Accounts 1998, 99, 95.
- [27] A. G. Taranto, J. W. D. Carneiro, F. G. de Oliveira, M. T. de Araujo, C. R. Correa, Journal of Molecular Structure-Theochem 2002, 580, 207.
- [28] G. H. Posner, S. B. Park, L. Gonzalez, D. S. Wang, J. N. Cumming, D. Klinedinst, T. A. Shapiro, M. D. Bachi, Journal of the American Chemical Society 1996, 118, 3537.
- [29] C. W. Jefford, Current Medicinal Chemistry 2001, 8, 1803.
- [30] J. Cazelles, A. Robert, B. Meunier, Journal of Organic Chemistry 2002, 67, 609.
- [31] G. H. Posner, P. M. O'Neill, Accounts of Chemical Research 2004, 37, 397.
- [32] A. Robert, C. Bonduelle, S. A. L. Laurent, B. Meunier, Journal of Physical Organic Chemistry 2006, 19, 562.
- [33] M. S. C. Pereira, R. Kiralj, M. M. C. Ferreira, Journal of Chemical Information and Modeling 2008, 48, 85.
- [34] R. Kannan, K. Kumar, D. Sahal, S. Kukreti, V. S. Chauhan, Biochemical Journal 2005, 385, 409.

- [35] U. Eckstein-Ludwig, R. J. Webb, I. D. A. van Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, P. G. Bray, S. A. Ward, S. Krishna, *Nature* 2003, 424, 957.
- [36] R. K. Haynes, D. Monti, D. Taramelli, N. Basilico, S. Parapini, P. Olliaro, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003, 47, 1175.
- [37] R. G. Ridley, *Nature* 2003, 424, 887.
- [38] S. M. Zhang, G. S. Gerhard, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008, 16, 7853.
- [39] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, J. A. Pople, Revision A.7 ed., Gaussian, Inc., Pittsburgh P. A., 1998.
- [40] N. Strickland, J. N. Harvey, *Journal of Physical Chemistry B* 2007, 111, 841.
- [41] F. Biegler-Konig, J. Schonbohm, D. Bayles, *Journal of Computational Chemistry* 2001, 22, 545.
- [42] S. K. Noury, X.; Fuster, F.; Silvi, B., *Laboratoire de Chimie Théorique, Université Pierre et Marie Curie. Paris*, 1999.
- [43] B. Konrad-Zuse-Zentrum, and Mercury Computer Systems, 1995-2006.
- [44] J. R. Sambrano, L. Gracia, J. Andres, S. Berski, A. Beltran, *Journal of Physical Chemistry A* 2004, 108, 10850.
- [45] R. Llusar, A. Beltran, J. Andres, S. Noury, B. Silvi, *Journal of Computational Chemistry* 1999, 20, 1517.
- [46] S. Berski, K. Mierzwicki, A. Bil, Z. Latajka, *Chemical Physics Letters* 2008, 460, 559.
- [47] J. D. Gu, K. X. Chen, H. L. Jiang, R. Y. Ji, *Journal of Molecular Structure-Theochem* 1999, 459, 103.
- [48] P. Moles, M. Oliva, V. S. Safont, *Tetrahedron* 2008, 64, 9448.
- [49] P. Moles, N. Oliva, V. S. Safont, *Journal of Physical Chemistry A* 2006, 110, 7144.

- [50] M. G. B. Drew, J. Metcalfe, F. M. D. Ismail, *Journal of Molecular Structure-Theochem* 2004, 711, 95.
- [51] P. Moles, M. Oliva, A. Sanchez-Gonzalez, V. S. Safont, *Journal of Physical Chemistry B* 2010, 114, 1163.
- [52] A. G. Taranto, J. W. D. Carneiro, F. G. Oliveira, *Journal of Molecular Structure-Theochem* 2001, 539, 267.
- [53] J. Q. Araujo, J. W. D. Carneiro, M. T. de Araujo, F. H. A. Leite, A. G. Taranto, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008, 16, 5021.
- [54] D. Khvostichenko, A. Choi, R. Boulatov, *Journal of Physical Chemistry A* 2008, 112, 3700.
- [55] D. Kumar, S. P. de Visser, S. Shaik, *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 8204.
- [56] P. M. Kozlowski, T. G. Spiro, M. Z. Zgierski, *Journal of Physical Chemistry B* 2000, 104, 10659.
- [57] B. Delley, *Physica B* 1991, 172, 185.
- [58] N. Matsuzawa, M. Ata, D. A. Dixon, *Journal of Physical Chemistry* 1995, 99, 7698.
- [59] M. Radon, K. Pierloot, *Journal of Physical Chemistry A* 2008, 112, 11824.
- [60] C. Rovira, K. Kunc, J. Hutter, P. Ballone, M. Parrinello, *Journal of Physical Chemistry A* 1997, 101, 8914.
- [61] S. Miertus, Scrocco, E., Tomasi, J., *Chemical Physics* 1981, 55, 117.
- [62] S. Miertus, Tomasi, J., *Chemical Physics* 1982, 65, 239.



Chapter 5. General Conclusions

*When people conclude that all is futile, then the
absurd becomes the norm.*

Stanley Crouch

This work has dealt with the study of a very complex biological system: the action of a family of drugs (artemisinin and its derivatives) against malaria. The research has been focused on the study of the reaction mechanisms of artemisinin from a theoretical point of view.

This study is interesting because it has uncovered many aspects of the reaction mechanism of these drugs, so far, not known or controversial.

The reaction mechanisms of the decomposition of artemisinin by reduction with hydrogen radical, that lead to the formation of final products, have been studied using two molecular models (6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane and artemisinin). Both models have reproduced the mechanism proposed in the literature from experimental data with very few discrepancies. It follows therefore, that the smaller model is valid to study the reactivity of this system, so this model derived from artemisinin has been used in the subsequent research.

The reducing agent model has become more complex as the study progressed, with the objective of using a model closer to reality. In all cases it was found that the overall process is irreversible, and that the first reaction step has a strong irreversible character, as the O-radicals formed after the breakdown of the peroxide bridge of artemisinin are much more stable than this. Moreover almost all the stationary points involved in the formation of the final products are more stable than artemisinin. Thus, once initiated the reaction, the final products are formed, at a rate determined by the experimental conditions. It has also demonstrated the existence of reaction pathways which inter-relate O1 and O2 radical routes.

Experimental studies have found evidence of specific proteins of the malaria parasite alkylated by C-radicals derived from artemisinin as well as heme-artemisinin adducts. According to this data, in our study C-radical species formed have proved stable enough to give rise to these processes of alkylation. Furthermore, the results exclude the epoxide 5 as responsible for the antimalarial action, given its relative instability.

Among the reaction pathways studied, there is not one that is clearly preferred, since the differences in energies and energy barriers are not very significant. However, from all studies in the gas phase it has been obtained that both from a thermodynamic and kinetic point of view, reactive routes that take place through the intermediate 3 are more favorable than those that go through the intermediate 2.

In addition, a new research perspective has been given by using $\text{Fe}(\text{OH})_2$ dihydrated as a reducing agent. A study has been done on the topological aspects of the reaction between heme and artemisinin. Using the ELF methodology, a quantitative analysis has been undertaken on the

reorganization of the electron density in the course of the reactions. With the AIM theory the bond critical points (BCP) have been localized, making it possible to explain different properties of bonds, thus describing the reactivity. This methodology has proven the affinity between the iron atom of heme and peroxide bond of artemisinin, which is defined as a 'protocovalent bond', *i.e.* as a bond of low relative stability. It has been observed that the bond cleavage starts electronic reorganization of the endoperoxide of artemisinin, leading to the formation of O-radicals to give later the C-radicals. This fact is in agreement with experimental data, which show that the bond is essential for antimalarial action. It has also been conducted comparing the reaction of the Fe(II) model with molecular oxygen, and the results lead to the conclusion that the ferrous model reacts preferably with peroxide-containing species. In consequence, artemisinin interrupts the heme detoxification process, since it avoids the Fe(II) to Fe(III) initial oxidation. Artemisinin competes with molecular oxygen in the first step of the formation of hemozoin, ending with the life of the malaria parasite.

In research conducted with the heme group, the fact that one of the coordinating ligand is a histidine (FeP(Im)) or a water molecule (Fe-H₂O) does not lead to a significantly different reactivity with artemisinin. Therefore, to explain why it has been found experimentally that artemisinin does not react with the hemoglobin, we should look at the surroundings of heme in the protein, and explore the possibility of steric restrictions.

In other studies of the same mechanisms, using the Fe-H₂O reducing agent in solution but applying the continuous method PCM, it should first be said that there is high stabilization after the first reaction step, which confirms the irreversibility of the overall process. In this study,

the species **4** and **II** have the same stability but, from a kinetic point of view, the C-radical **II** is obtained more favorably than **4**.

The same reactions studied with PCM were carried out with the QM/MM methodology for the triplet and quintet states. It must be said that all reaction steps involved in the formation of C-radicals take place in triplet electronic state. The obtained energy profiles are softer than those obtained in a vacuum. One difference from other studies is that the C-radicals are less stable than the O-radicals. This can be due to the fact that more conformations could have been explored and that the C-radicals solvation is not the most favorable. Free energy calculations, instead of potential energy, would solve this problem and could lead to more accurate results to be able to draw more significant conclusions.

Chapter 6. Summary and outlook

*Camins, que ara s'esvaeixen
Camins, que has de fer sol
Camins, vora les estrelles
Camins, que ja són nous.
Camins - Sopa de Cabra*

*La science ne sert guère qu'à nous donner une idée
de l'étendue de notre ignorance.*

Félicité de Lamennais

Summary and outlook

6.1. Summary	275
6.2. Outlook.....	279
6.2.1. Free energy calculations	279
6.2.2. Studies focused on later stages of artemisinin decomposition	280

6.1. Summary

Malaria is a disease, produced by the members of the *Plasmodium* parasite gender and transmitted via the bite of the *Anopheles* female mosquito, which spreads out mainly throughout the tropical and subtropical regions, causing more than one million deaths yearly, and especially affecting childhood. The endemic malarial regions are Africa, Central and South America, and South Asia, and current projections suggest that if global warming remains unchecked, it could be re-established itself in Europe and North America.

The malaria parasite synthesizes its own proteins, and it obtains amino acids mainly from the digestion of the host hemoglobin. However, digestion of hemoglobin also releases free heme (Fe (II) protoporphyrin-IX), which is toxic to the parasite. Therefore, the parasite needs a parallel process to eliminate the toxic heme that the digestion of the host hemoglobin produces.

The main mechanism by which the parasite eliminates heme is the formation of hemozoin, or malaria pigment. In this process, heme is oxidized (by oxygen) to hemin (Fe (III) protoporphyrin-IX); then, hemin dimers are formed and finally assemble to form hemozoin, an insoluble crystalline material.

Different drugs can be used in the malaria treatment, and many of them act by avoiding the detoxification process, therefore preventing the heme elimination. In this way, the parasite dies by accumulation of free heme. However, the malaria parasite has developed resistance to many of these drugs. Due to this fact, artemisinin-based combination therapies are nowadays the recommended and most used anti-malarial agents.

Artemisinin (see Figure 1.7) is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group, and its unusual 1,2,4-trioxane ring system has been proven to be essential for the anti-malarial activity.

The mechanism of action of artemisinin is not clear and is still under debate. However, a quite wide agreement exists in that artemisinin decomposes in the presence of heme, generating several reactive intermediates, which would be the agents directly or indirectly responsible for the malaria parasite death. Hence, the study of the artemisinin decomposition prompted by the presence of heme iron has a great importance in understanding the details of the anti-malarial action that artemisinin and its derivatives exert.

In the present PhD thesis, we report a complete theoretical study that thoroughly investigates several aspects concerning the artemisinin decomposition process, including the formation of some intermediate species that could be the responsible of the anti-malarial properties of

artemisinin. We have also proposed new mechanisms of action, unsuspected to date, that help us to understand such anti-malarial properties.

We have suggested that artemisinin instead of oxygen can react with heme, avoiding in this way the heme to hemin oxidation, with the subsequent disruption of the detoxification process. On the other hand, when artemisinin interacts with heme, carbon-centered radicals that are able to alkylate heme itself are formed, and we have identified the species that most probably act as heme alkylation agent. From our results it can be concluded that artemisinin acts as heme-oxidation blocking, and as heme alkylating agent as well. Both actions complement each other and yield the same result: the hemozoin formation is prevented, the alkylated heme accumulates inside the parasite, and therefore, the parasite dies.

By using proper molecular models and methods, of increasing complexity and accuracy, the steps from the reactants initially separated to the final products obtained in the experimental studies reported in the literature, have been described and analyzed. These steps include the formation of the carboradicals postulated as heme alkylation agents.

The study has been made from two points of view: on one side, we have characterized the geometric and energetic parameters of the obtained species, and on the other side, we have conducted a topological study based on the electron localization function (ELF) and the atoms in molecules (AIM) methodology, with the objective of analyzing the details concerning the electronic redistribution taking place in the processes under study. In this way, we have demonstrated that the peroxide bond can be described as a protovalent bond that can be easily broken in the presence of Fe(II) species, and that its breaking initiates the electronic reorganization taking place along the whole

decomposition process, and hence the peroxide bond is essential for the anti-malarial action of artemisinin.

Also, we have explained in a very satisfactory way all the mechanistic steps suggested in the literature, and we have discovered new steps, like the two connections between the O1 and O2 radical routes, the new mechanistic proposal explaining the experimentally determined outcome of deoxiartemisinin, or the alternative paths between intermediates along the artemisinin decomposition process.

The solvent effects on the initial key steps of the processes have been studied by means of the polarizable continuum model (PCM) and, in a preliminary study, by the use of hybrid QM/MM calculations. The PCM results satisfactorily explain the product distribution observed when the decomposition takes place in aqueous media. On the other hand, the preliminary QM/MM results can be considered as promising, although some additional work is needed in this respect, as will be stated below.

As a final summary, it should be stressed that the results obtained in the present PhD thesis nicely agree with the experimental data known to date, and hence it can be assessed that our work has given a sound explanation of the observed facts relative to the anti-malarial mode of action of artemisinin and its derivatives.

6.2. Outlook

Once this PhD thesis is finished there are still many avenues of exploration left open. On one hand, it will be attempted to study the free energy for the system in solution. In addition, as mentioned in the introduction, artemisinin has anti-malaria properties by reacting with parasite essential biomolecules. Therefore, determining these processes allows us to take another step towards the design of new drugs.

6.2.1. Free energy calculations

The decomposition of artemisinin study by reaction with the heme group has been carried out in the condensed phase by calculating potential energy. However, these systems have a large number of degrees of freedom, which is why the calculation of free energy would be of great interest. It seeks to continue the study of the reactions analyzed by calculating their free energy. To do this, firstly it is necessary to implement semiempirical methods, such as FP6, in the Dynamo program, the one used in this study. This method should be implemented to deal with iron systems, since it is impractical (extremely expensive) to make dynamic calculations with *ab initio* or DFT methods with some metal atoms as iron. Furthermore, semiempirical methods implemented to date do not include some transition metals such as iron.


The fulfillment of this goal will result in improvements of the quality of the results, as well as the ability to address new research challenges by having a method for calculating free energy for metal atom systems.

6.2.2. Studies focused on later stages of artemisinin decomposition

The study of the later stages of artemisinin decomposition is very important for a complete understanding of the mechanism of action of artemisinin. After the artemisinin decomposition some radicals are formed and they react with biomolecules which are essential for the life of the malaria parasite, therefore they are key to fighting the disease. The processes under investigation are the following:

- Alkylation of hemoglobin heme.
- Alkylation of the TCTP (translationally Controlled Tumor Protein) parasite protein.
- Other processes that are postulated as responsible for the anti-malarial activity.

Obviously, these studies are thought to be conducted in the condensed phase, first by calculating potential energy and then by evaluating the free energy of each process. Thus, identifying which are the targets of the artemisinin derived radicals can help to design new drugs.



Anexo I.
Frecuencias imaginarias

En este anexo se presentan los valores de frecuencias imaginarias (f , cm^{-1}), el valor propio negativo (eig., a.u.), los principales componentes del vector de transición (C , a.u.) y los parámetros de las geometrías correspondientes (G , distancias en Å, ángulos y diedros en grados) de las estructuras de transición participantes en los procesos descritos.

Descomposición de la artemisinina utilizando el radical hidrógeno como agente reductor

Estos datos se muestran para los resultados obtenidos en el apartado 4.1., llevados a cabo con la metodología HF y, mostrados entre paréntesis, los realizados con la metodología B3LYP, para ambos modelos moleculares.

Reacción de reducción del enlace endoperóxido

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

	f	eig.		C	G
TS_{1m-2m}	813,74i	-0,18466	O1-O2	0,967 (-0,434)	1,57 (1,57)
	(1096,49i)	(-0,06791)	H-O2	0,001 (0,884)	2,96 (1,65)
TS_{1m-3m}	344,86i	-0,09321	O1-O2	0,954 (-0,471)	1,57 (1,56)
	(953,93i)	(-0,05188)	H-O1	0,007 (0,865)	2,89 (1,69)
$TS_{2m'-3m'}$	5631,71i	-1,82515	H-O2	0,837 (0,862)	1,20 (1,15)
	(1707,98i)	(-0,22001)	O1-O2	-0,366 (-0,396)	2,32 (2,30)
			H-O2-C5-	0,251 (-0,038)	186,67 (200,39)
			C6-C5-C4-	0,163 (0,079)	-50,18 (-51,69)
TS_{2m-4m}	2886,40i	-0,67618	Ht-O1	0,831 (0,948)	1,17 (1,25)
	(1542,16i)	(-0,14443)	O1-C7-C4	-0,395 (-0,132)	63,98 (64,76)
			Ht-O1-C7	0,193 (-0,115)	110,08 (100,00)
$TS_{3m'-11m}$	764,19i	-0,09382	C4-C3	0,902 (0,921)	2,02 (1,97)
	(388,80i)	(-0,04133)	O2-C3	-0,208 (-0,119)	1,26 (1,25)
			HC3-C3-C4	-0,273 (-0,214)	94,36 (93,26)

Modelo artemisinina

	f	eig,		C	G
TS ₁₋₂	1087,55i	-0,08346	O1-O2	-0,52	1,565
			H-O2	0,82	1,648
TS ₁₋₃	995,48i	-0,05921	O1-O2	-0,49	1,576
			H-O1	0,84	1,693
TS _{2'-3'}	1633,27i	-0,23128	H-O2	0,94	1,156
			O1-O2	-0,23	2,290
			O1-O2-C3	0,12	104,74
TS _{2'-4}	1341,38i	-0,10161	H-O1	0,95	1,276
			O9-C3-C4-C5	-0,10	-28,01
			H _{C5} -C5-C4-H _{C4}	-0,10	103,27
			H _{C4} -C4-C3-O9	0,13	-167,67
TS _{3'-11}	479,82i	-0,05680	C3-C4	0,94	2,034
			O2-C3	-0,16	1,240
			H _{C4} -C4-C1	-0,13	97,37
			H _{C5} -C5-C4-H _{C4}	0,11	64,54
TS _{3'-4'}	1944,15i	-0,40777	O2-C3	-0,15	1,417
			H _{C4} -O2	0,81	1,272
			O2-C3-C4	-0,36	90,76
			H _{C4} -O2-O9	-0,34	102,02
			O2-C3-C4-C5	-0,14	98,66
			H _{C4} -O2-O9-C8	-0,12	-32,76

Reacción de formación de 3 α -hidrodeoxi-artemisinina (6)

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

	f	eig.		C	G
TS _{4m-5m}	551,98i (1252,13i)	-0,06978 (-0,12790)	O2-C4	0,938 (0,617)	1,84 (1,67)
			H _{O2} -O2	-0,099 (-0,750)	2,21 (1,50)
			O2-C4-C3	-0,213 (-0,133)	49,44 (52,54)
TS _{5m-6m}	278,97i (815,92i)	-0,27889 (-0,19278)	H _{O1} -O2	0,269 (0,491)	1,37 (1,28)
			H _{O1} -O2-C3	0,238 (0,254)	74,41 (73,49)
			C6-C5-C4	0,219 (0,227)	111,07 (112,01)
			H _{C7} -C7-C6-H _{C6}	0,372 (0,128)	-40,90 (-42,42)
			O2-C4-C5-C6	0,365 (0,378)	-43,47 (-49,47)
			H _{C4} -C4-C3-O9	-0,364 (-0,404)	-127,05 (-124,04)
			C7-C6-C5-C4	0,343 (0,139)	-45,34 (-39,10)
			O1-C8-C7-C5	0,274 (0,326)	73,38 (71,63)
			O9-C8-C7-C6	-0,218 (-0,081)	88,15 (93,90)
			C8-C7-C6-C5	0,017 (0,169)	-46,63 (-50,11)
			H _{O1} -O2-C3-C4	0,003 (-0,215)	125,59 (121,30)

Modelo artemisinina

	f	eig.		C	G
TS ₄₋₅	1264,62i	-0,09311	O2-C4	-0,50	1,670
			O2-H _{O2}	0,78	1,508
			O2-C3-O9-C8	-0,15	142,06
			O2-C3-C15-H _{C15}	0,10	-49,86
			O2-C3-C15-H _{C15}	0,10	69,57
			O2-C3-C15-H _{C15}	0,10	-171,22
TS ₅₋₆	708,53i	-0,09592	H _{O1} -O2	0,58	1,261
			C5-C4-C3	0,11	117,48
			C6-C5-C4	0,18	115,20
			H _{O1} -O2-C3	0,26	75,26
			H _{C4} -C4-C3	0,13	104,45
			C6-C5-C4-C3	-0,13	68,34
			C7-C6-C5-C4	0,13	-37,05
			C8-C7-C6-C5	0,14	-50,72
			O2-C4-C5-C6	0,31	-49,75
			O1-C7-C6-C5	0,23	69,20
			H _{O1} -O2-C3-C4	-0,18	117,91
			H _{C4} -C4-C3-O9	-0,47	-129,02
			C15-C3-C4-C5	-0,11	-190,00

Reacción de formación de la deoxi-artemisinina (8)

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

	f	eig.		C	G
TS _{4m-7m}	587,14i (208,6li)	-0,09603 (-0,02946)	O2-C3	0,923 (0,274)	1,93 (2,80)
			C4-C3	-0,201 (-0,026)	1,39 (1,35)
			O2-C3-C4	-0,030 (0,396)	104,63 (94,80)
			H _{O2} -O2-H _{O1} -C3	-0,031 (0,846)	142,87 (183,68)
TS _{7m-8m}	1159,85i (793,85i)	-0,15568 (-0,19269)	H _{O1} -O1	0,622 (0,501)	1,54 (1,72)
			C4-C3	0,153 (0,189)	1,43 (1,45)
			C6-C5-C4	-0,116 (0,174)	109,56 (110,77)
			H _{C4} -C4-C3-O9	0,483 (0,530)	-152,30 (-155,03)
			H _{O1} -O1-C7-C6	0,356 (0,434)	-27,85 (-33,28)
			H _{C3} -C3-C4-C5	0,308 (0,125)	-200,59 (-206,89)
			C6-C5-C4-C3	-0,137 (0,186)	77,54 (75,88)
			H _{C5} -C5-C4-C3	-0,124 (-0,145)	197,84 (197,45)
TS _{9m-8ma}	306,64i (247,8li)	-0,11677 (-0,12331)	O2-C3	0,367 (0,404)	2,37 (2,42)
			H _{O1} -O1	0,180 (0,281)	1,46 (1,52)
			O1-C7-C4	-0,356 (-0,292)	79,59 (84,68)
			H _{O1} -O1-C3	0,348 (0,340)	63,13 (60,22)
			O2-C3-C4	0,136 (-0,187)	88,82 (92,78)
			O9-C3-C4-C5	0,369 (0,367)	74,90 (75,73)
			O2-C3-C4-C5	-0,326 (-0,265)	-60,60 (-58,14)
			H _{C4} -C4-C3-O9	0,239 (0,245)	-47,35 (-47,09)
			C8-C7-C6-C5	-0,189 (-0,149)	-85,90 (-80,76)
			H _{C3} -C3-C4-C5	0,187 (0,154)	-126,42 (-129,83)
			H _{C7} -C7-C6-H _{C6}	-0,177 (-0,129)	-74,68 (-66,97)
			O1-C7-C4-C3	-0,171 (-0,196)	58,78 (59,07)
			H _{C8} -C8-C7-H _{C7}	0,150 (0,187)	-40,78 (-38,77)
			H _{C4} -C4-C5-C6	0,149 (0,125)	180,98 (181,10)
C7-C6-C5-C4	-0,146 (-0,128)	55,83 (51,70)			
TS _{9m-8mb}	562,89i (336,8li)	-1,23806 (-0,26958)	O1-C7	-0,347 (0,542)	2,14 (2,28)
			O2-C3-C7	0,577 (-0,424)	57,32 (65,51)
			C7-C6-C5	0,217 (-0,032)	116,39 (117,74)
			H _{O2} -O2-C7	-0,216 (0,427)	67,27 (61,29)

C8-C7-C6-C5	0,315 (-0,282)	-82,25 (-75,18)
C7-C6-C5-C4	0,296 (-0,110)	59,14 (55,65)
C6-C5-C4-C3	-0,206 (0,138)	-49,09 (-49,68)
H _{C7} -C7-C6-H _{C6}	0,206 (-0,072)	-103,35 (-105,22)
O1-C7-C4-C5	-0,186 (0,160)	-64,65 (-68,13)
H _{C3} -C3-C4-C5	0,160 (0,232)	-165,13 (-169,20)

Modelo artemisinina

	f	eig.		C	G
TS _{4^a-7}	140,76i	-0,00580	C3-C4	-0,12	1,361
			O2-C3	0,88	2,226
			O2-C3-C4	-0,20	83,00
			H _{O2} -O2-O9	-0,27	69,50
			H _{O1} -O1-C7-C6	-0,11	-92,41
			C15-C3-C4-C5	0,23	176,97
TS ₇₋₈	710,69i	-0,07897	C3-C4	0,16	1,455
			H _{O1} -O1	0,65	1,687
			C6-C5-C4	-0,10	112,42
			C6-C5-C4-C3	-0,12	77,85
			C7-C6-C5-C4	-0,17	-31,79
			H _{O1} -O1-C7-C6	0,37	-34,19
			H _{C4} -C4-C3-O9	0,53	-158,12
			H _{C5} -C5-C4-C3	-0,12	199,00
			C15-C3-C4-C5	0,12	-206,24
TS _{9-8a}	116,28i	-0,01330	O2-C3		
			H _{O1} -O1	0,79	2,666
			H _{O1} -O1-C3	0,20	1,494
			H _{O2} -O2-	0,14	55,81
			H _{O1} -C3	0,39	146,79
			H _{O1} -C3	0,25	-126,95
			C15-C3-C4-C5	0,13	-24,99
			H _{C15} -C15-C3-H _{O1}	0,17	216,94
TS _{9-8b}	288,30i	-0,12789	H _{O2} -O2	0,26	1,460
			H _{O2} -O2-C7	0,39	60,29
			O1-C7-C4-C5	0,17	-67,92
			C15-C3-C4-C5	0,16	-166,92
			H _{C4} -C4-C5-C6	0,13	187,64

O1-C7	0,57	2,322
O2-C3-C7	-0,36	64,95
H _{C8} -C8-C7	0,13	100,02
H _{O1} -O1-C7	0,19	116,98
C6-C5-C4-C3	0,20	-52,96
C7-C6-C5-C4	-0,13	48,42
C8-C7-C6-C5	-0,19	-65,93
O9-C3-C4-C5	0,11	84,27

Reacción de formación del tetrahidrofurano (12)

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

	f	eig.		C	G
TS _{11m'-12m}	1970,73i (1515,19i)	-2,66517 (-1,22257)	Ht-O1	-0,328 (-0,658)	1,33 (1,30)
			C7-C6	0,148 (0,113)	1,55 (1,54)
			C7-C6-C5	0,616 (0,417)	106,57 (105,39)
			O1-C7-C6	0,460 (0,368)	108,62 (106,87)
			C5-C4-C3	-0,187 (-0,191)	103,55 (92,57)
			C6-C5-C4	0,185 (0,184)	104,11 (103,90)
			O9-C3-C4	0,134 (0,147)	24,65 (12,05)
			C7-C6-C5-C4	0,345 (0,196)	41,16 (43,89)

Modelo artemisinina

	f	eig.		C	G
TS _{11'-12}	1495,11i	-0,60037	C6-C5	-0,13	1,536
			H _{O1} -O1	0,64	1,315
			C5-C4-C3	0,15	91,87
			C6-C5-C4	-0,27	103,49
			C7-C6-C5	-0,28	105,00
			C8-C7-C6	0,10	113,92
			O9-C3-C4	-0,11	80,10
			O1-C7-C6	-0,28	101,80
			C6-C5-C4-C3	0,18	89,83
			C8-C7-C6-C5	-0,19	-69,71
			O2-C3-C4-C5	-0,14	-309,02

O1-C7-C6-C5	-0,29	46,99
H _{O1} -O1-O2-C3	0,20	10,33

Reacción de formación del O-radical 14

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

	f	eig.		C	G
TS _{3m^o-13m}	846.00i (478.80i)	-1.22847 (-0.65804)	O2-C3	0.435 (0.424)	1.31 (1.27)
			O9-C8	0.054 (0.171)	1.46 (1.40)
			C7-C6-C5	-0.348 (-0.235)	114.49 (116.01)
			C6-C5-C4	-0.308 (-0.323)	115.77 (115.94)
			C5-C4-C3	-0.255 (-0.062)	114.27 (115.58)
			O9-C8-C3	-0.188 (-0.492)	34.76 (32.12)
			C6-C5-C4-C3	0.408 (0.197)	-64.89 (-66.85)
			C8-C7-C6-C5	0.277 (0.227)	-84.28 (-81.96)
			H _{C3} -C3-C4-H _{C4}	0.263 (0.278)	-63.42 (-63.33)
			O2-C3-C4-C5	-0.224 (-0.305)	-35.50 (-34.92)
H _{C4} -C4-C3-C5	-0.119 (-0.153)	121.61 (121.01)			
TS _{13m^o-14m}	693.13i (618.22i)	-0.06139 (-0.47293)	O13-C8	0.866 (0.649)	1.89 (2.02)
			O9-C8	-0.214 (-0.102)	1.30 (1.22)
			C8-C7	0.013 (-0.149)	1.52 (1.62)
			O13-C8-C12	-0.076 (0.175)	28.98 (23.85)
			O9-C8-C7	0.061 (0.221)	118.11 (117.29)
			C11-C10-C7	0.059 (0.219)	113.66 (116.83)
			O14-C12-C11	-0.040 (0.179)	126.67 (123.87)
			H _{O1} -O9-C8	-0.035 (-0.162)	70.33 (72.99)
			C10-C7-C8-H _{C8}	-0.218 (-0.124)	162.24 (158.67)
			C11-C10-C7-C8	-0.160 (0.176)	-64.62 (-36.53)
			H _{C10} -C10-C7-C8	-0.133 (0.164)	56.00 (85.38)
			H _{C8} -C8-C6-H _{C6}	-0.105 (-0.184)	-26.51 (54.94)
			O9-C8-C7-C6	0.088 (0.244)	188.04 (185.80)
C12-C11-C10-C7	0.006 (0.204)	54.37 (-29.97)			

Modelo artemisinina

	f	eig.		C	G
TS _{3⁷-13}	466,54i	-0,62893	C15-C3-C4-H _{C4}	0,33	-56,62
			O9-C8	0,21	1,355
			O2-C3	0,43	1,298
			C6-C5-C4	-0,28	118,61
			C7-C6-C5	-0,31	114,37
			C8-C7-C6	-0,11	112,79
			O9-C8-C7	-0,36	29,03
			C6-C5-C4-C3	0,23	-69,70
			C8-C7-C6-C5	0,23	-76,86
			O2-C3-C4-C5	-0,31	-33,14
			O1-C7-C6-C5	0,14	47,67
			H _{C4} -C4-C3-C5	-0,20	119,71
			TS ₁₃₋₁₄	770,42i	-0,13460
O13-C8	0,88	1,862			
O9-C8-C7	0,12	118,73			
O9-C8-C7-C6	0,27	126,56			
C10-C7-C8-H _{C8}	0,13	97,96			

Reacción de formación del dioxodecanodial (15)

Modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano

	f	eig.		C	G
TS _{13m'-16m}	4866,2li	-2,31802	H _{O1} -O9	-0,537	1,19
			O9-C8-C7	0,585	102,72
			O1-C7-C8	0,366	102,22
			H _{O1} -O9-C8	0,363	102,18
TS _{16m-17m}	546,60i (299,46i)	-0,09932 (-0,02435)	C8-C7	0,898 (0,911)	2,12 (2,03)
			O1-C7	-0,227 (-0,127)	1,28 (1,26)
			C10-C7-C8	-0,180 (-0,170)	96,87 (96,18)
			O9-C8-C7	-0,075 (-0,186)	105,80 (105,54)
TS _{13m'-18m}	683,38i (262,66i)	-0,06401 (-0,05253)	C12-C11-C10-C7	-0,164 (-0,134)	-77,45 (-65,58)
			C8-C7	0,915 (0,837)	2,06 (1,88)
			O9-C8	-0,193 (-0,122)	1,26 (1,26)
			O1-C7-C8	-0,177 (-0,165)	105,51 (103,14)
			H _{C8} -C8-C6	-0,140 (-0,161)	68,02 (72,85)
TS _{18m-17m}	2417,43i (1372,37i)	-0,36347 (-0,13461)	C11-C10-C7	0,024 (0,145)	113,84 (117,12)
			O13-C12-C11-C10	-0,009 (0,169)	38,61 (43,01)
			Ht-O1	0,863 (0,929)	1,24 (1,24)
			O1-C7	-0,304 (-0,206)	1,30 (1,29)
			O9-C8	0,202 (0,224)	1,29 (1,28)
TS _{17m-15m}	1591,24i (1306,13i)	-0,11686 (-0,06827)	O1-C7-C8	-0,153 (-0,087)	89,88 (87,12)
			C10-C7-C8	-0,145 (-0,050)	94,88 (92,52)
			H _{O9} -O9	0,945 (0,982)	1,47 (1,50)
			O9-C8	-0,254 (-0,138)	1,26 (1,23)


Modelo artemisinina

	f	eig.		C	G
TS ₁₃₋₁₈	191,34i	-0,00898	C8-C7	0,78	1,749
			O9-C8	-0,15	1,289
			O1-C7	-0,10	1,407
			O9-C8-C7	-0,17	106,55
			O1-C7-C8	-0,11	106,67
			H _{C8} -C8-C7	-0,19	101,89
			O13-C8-C7	-0,15	111,09
			O2-C3-C4-C5	0,13	-4,89
			H _{C6} -C6-C5-H _{C5}	0,15	271,75
			H _{C8} -C8-C7-C6	-0,11	8,11
			H _{O1} -O1-C7-C6	-0,23	-130,22
			C15-C3-C4-H _{C4}	0,14	-63,72
			C10-C7-C6-C16	0,14	-45,68
			O14-C12-O13-C8	0,16	-156,68
TS ₁₈₋₁₇	1331,96i	-0,11021	H _{C8} -C8-C7	0,13	104,56
			O9-C8	0,21	1,281
			O1-C7	-0,19	1,285
			H _{O1} -O1	0,92	1,237
TS ₁₇₋₁₅	1324,87i	-0,07166	O9-C8	-0,14	1,235
			H _{O9} -O9	0,97	1,483
TS ₁₆₋₁₇	369,68i	-0,02031	C8-C7	0,75	1,813
			O9-C8	-0,10	1,372
			O1-C7	-0,16	1,309
			O13-C8	-0,12	1,381
			O1-C7-C8	-0,19	100,87
			C8-C7-C6	-0,11	110,05
			H _{C8} -C8-C7	-0,19	102,67
			O13-C8-C7	-0,11	112,59
			C7-C6-C5-C4	0,12	153,22
			H _{O9} -O9-C8-C7	-0,36	-13,05
			C10-C7-C6-C16	0,19	-42,79
			C12-C11-C10-C7	-0,13	-73,36
			O14-C12-O13-C8	0,12	-154,02

Descomposición de la artemisinina con el modelo 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonano y el Fe(OH)₂ dihidratado como agente reductor

Los resultados concernientes a este estudios se han realizado con la metodología B3LYP/Lanl2dz(Fe)-6-31G*(resto) y se muestran para el estado electrónico triplete.

	f	eig.		C	G
TS _{C1-2h}	598,34i	-0,12694	O1-O2	0,824	1,81
			Fe-O2	0,469	2,03
TS _{2h-4h}	1618,17i	-0,14034	O1-H	0,953	1,24
			O1-C3-C4-H _{C4}	0,155	59,85
TS _{C2-3h}	581,44i		O1-O2		
			Fe-O1		
TS _{3h-11h}	446,4li	-0,04423	O2-C3	-0,136	1,24
			H _{C3} -C3-O9-C8	0,168	175,25



Anexo II.
Programas utilizados

Los programas de cálculo y de representación gráfica utilizados en la elaboración de esta tesis doctoral se presentan a continuación.

1. Programas de cálculo

Gaussian (03)

El programa Gaussian03^[1] está diseñado para modelizar un gran abanico de sistemas moleculares bajo una amplia variedad de condiciones y realiza sus cálculos partiendo de las leyes básicas de la mecánica cuántica.

Con este programa se pueden predecir energías, estructuras y frecuencias vibracionales, etc. a través de numerosas propiedades moleculares de los compuestos o moléculas objeto de estudio. De ese modo, el programa puede facilitar enormemente el trabajo de los químicos al permitir la exploración de fenómenos químicos y sus efectos derivados, así como los mecanismos de reacción y estados de transición.

<http://www.gaussian.com>

En el presente trabajo, el programa Gaussian se ha utilizado para obtener los resultados de los apartados 4.1, 4.2 y 4.3 del Capítulo 4, con las siguientes finalidades:

- Calcular la naturaleza de los mínimos (reactivos, productos o intermedios) y TSs.
- Realizar los análisis vibracionales para confirmar si cada punto estacionario es un mínimo local o un punto de silla de primer orden.
- Caracterizar el vector de transición, es decir, el vector propio asociado al único autovalor negativo de la matriz de constantes de fuerza.^[2]

- Comprobar la conexión de los TSs con los correspondientes mínimos, empleando el algoritmo IRC (Intrinsic Reaction Coordinate).^[3-5]
- Evaluar las densidades de espín de Mulliken.

Programa de localización de Minimum Energy Crossing Points (MECP)

Este programa permite localizar el punto de cruce de mínima energía (MECP, *Minimum Energy Crossing Point*) entre dos superficies de energía potencial con distinta multiplicidad. Esta técnica de localizar MECPs se basa en la combinación de las energías de dos superficies de energía potencial y sus correspondientes gradientes (respecto a sus coordenadas nucleares), para dar dos gradientes efectivos ortogonales y que tienden a cero en el punto de cruce. Uno de estos gradientes es ortogonal a la hiperlínea de cruce, mientras que el otro es paralelo y se dirige hacia el mínimo. Las expresiones de estos gradientes se han presentado en el apartado 4.1.3 del Capítulo 4.^[6-10]

<http://www.chm.bris.ac.uk/pt/harvey/organometallic.htm>

ADF (Amsterdam Density Functional)

El programa ADF^[11] es un programa fortran que utiliza la aproximación de Kohn-Sham de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para la realización de cálculos en átomos y moléculas.^[12, 13] Las principales ventajas del programa son que proporciona conjuntos de funciones de base especiales para cálculos relativistas realizados con la aproximación de ZORA (Zero Order Regular Approximation)^[14-18] y para cálculos que requieren funciones difusas adicionales; y que se facilitan conjuntos de base que contienen átomos de core congelados para un mejor tratamiento

de los electrones más internos. El tratamiento relativista es muy interesante para los cálculos en que se utilizan metales de transición.

Este programa utiliza orbitales tipo Slater (STOs) como funciones de base y realiza una aproximación que consiste en la construcción de los sistemas poliatómicos por fragmentos, de modo que los orbitales moleculares monoeléctricos se calculan por combinación de orbitales de los fragmentos y analiza la energía de enlace en términos de las propiedades de los fragmentos. Estos fragmentos pueden ser átomos simples o conjuntos de estos. La evaluación de los elementos de la matriz del operador de Fock se basa en la integración numérica altamente optimizada.

<http://www.scm.com>

En el presente trabajo, el programa ADF se ha utilizado para las mismas funciones que se han descrito para el programa Gaussian03 para el sistema que utiliza el $\text{Fe}(\text{OH})_2$ dihidratado como agente reductor. Sin embargo, los resultados alcanzados con este programa no se describen, puesto que se han utilizado como punto de partida de los cálculos realizados con Gaussian03.

TopMoD y AIM2000

Estos programas permiten el análisis de la distribución de la densidad electrónica, lo que permite calcular las propiedades de los átomos dentro de la entidad molecular o los enlaces entre éstos. La importancia del concepto de densidad electrónica radica en que ésta es una función que se puede medir en el espacio real, a diferencia de lo que ocurre con la función de onda, que carece de sentido físico y no puede medirse experimentalmente.

El programa TopMoD a través de las trayectorias del gradiente de la función ELF, definida por Becke y Edgecombe,^[19, 20] divide el espacio molecular en cuencas que, dependiendo del tipo de carga (electrones de capas internas o de valencia) permite establecer una clasificación de dichas cuencas con su población correspondiente.^[21]

<http://www.cpfs.mpg.de/ELF/>

La Teoría de Átomos en moléculas (AIM, Atoms in Molecules)^[22, 23] explora la topología de la densidad electrónica, permitiendo la localización de puntos críticos de enlace, de los cuales se puede extraer información, tanto cualitativa como cuantitativa, muy útil acerca de la naturaleza del enlace (densidad electrónica, energía de la densidad electrónica, valor de la laplaciana, etc.).

<http://www.chemistry.mcmaster.ca/aim/>

Estos programas han sido empleados para calcular las poblaciones y propiedades de los puntos críticos de enlace de las cuencas pertenecientes a los átomos que participan en las reacciones estudiadas en el apartado 4.2 del Capítulo 4.

Dynamo (2)

Librería de cálculo implementada en Fortran90^[24-27] y de ámbito genérico que permite realizar la localización y caracterización tanto de mínimos como de estructuras de transición, dinámicas moleculares, cálculos Monte Carlo y potenciales de fuerza media. Combina el campo de fuerza OPLS-AA con métodos semiempíricos o *ab initio*, por lo que resulta completamente idóneo para realizar estudios teóricos tanto de reacciones en disolución como en entornos enzimáticos.

<http://www.win.tue.nl/dynamo/DLdoc.html>

En el presente trabajo se ha utilizado para el estudio de reacciones de la artemisinina con el grupo hemo en disolución, lo que corresponde al apartado 4.4 del Capítulo 4.

Otros programas

ChemDraw Ultra (9.0)

Permite realizar dibujos esquemáticos de estructuras moleculares, que pueden ser exportados en formato Encapsulated PostScript, y por tanto embebidos en documentos Word.^[28]

<http://www.cambridgesoft.com/>

Molden (3.8)

Programa de representación molecular capaz de interpretar, entre otros, resultados de cálculos realizados con Gaussian, Gamess o Mopac.^[29]

<http://www.cmbi.kun.nl/~schaft/molden/molden.html>

GaussView (3.07)

Programa de representación molecular con funciones similares al Molden.

http://www.gaussian.com/gv_plat.htm

VMD (1.8.7)

Programa de representación molecular apropiado para sistemas con cientos o miles de átomos. Entre otros formatos es capaz de leer PDB, y de exportar escenas para su posterior tratamiento con PovRay o con PyMol.

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

PovRay (3.02)

Programa “Persistence of Vision Ray-Tracer” que posibilita la creación de imágenes fotográficas empleando la técnica llamada *ray-tracing*.

<http://www.povray.org>

PyMOL (1.1r1)

Programa de visualización molecular que permite realizar dibujos de estructuras moleculares en 3D, crear figuras artísticamente, producir animaciones dinámicamente, etc.

<http://www.pymol.org>

Gimp (2.0)


El GIMP (the GNU Image Manipulation Program” se usa para editar y manipular imágenes que pueden ser leídas y exportadas en una gran variedad de formatos de imágenes. Este programa también se puede utilizar para dibujar y pintar.

<http://www.gimp.org>

Referencias

- [1] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. Montgomery, J. A., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Revision B.04 ed., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004, 2004.
- [2] J. W. McIver, *Accounts of Chemical Research* 1974, 7, 72.
- [3] K. Fukui, *Journal of Physical Chemistry* 1970, 74, 4161.
- [4] C. Gonzalez, H. B. Schlegel, *Journal of Chemical Physics* 1989, 90, 2154.
- [5] C. Gonzalez, H. B. Schlegel, *Journal of Physical Chemistry* 1990, 94, 5523.
- [6] J. L. Carreon-Macedo, J. N. Harvey, *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 5789.
- [7] T. R. Cundari, *Computational organometallic chemistry*, Ed. Marcel Dekker, Inc. ed., New York, 2001.
- [8] J. N. Harvey, *Physical Chemistry Chemical Physics* 2007, 9, 331.
- [9] J. N. Harvey, M. Aschi, H. Schwarz, W. Koch, *Theoretical Chemistry Accounts* 1998, 99, 95.
- [10] J. N. Harvey, R. Poli, K. M. Smith, *Coordination Chemistry Reviews* 2003, 238, 347.
- [11] ADF.
- [12] F. M. Bickelhaupt, E. J. Baerends, *Reviews in Computational Chemistry, Vol 15* 2000, 15, 1.

- [13] M. Gruning, O. V. Gritsenko, S. J. A. van Gisbergen, E. J. Baerends, *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 652.
- [14] E. van Lenthe, A. Ehlers, E. J. Baerends, *Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 8943.
- [15] E. Vanlenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *Journal of Chemical Physics* **1993**, *99*, 4597.
- [16] E. Vanlenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *Journal of Chemical Physics* **1994**, *101*, 9783.
- [17] E. vanLenthe, J. G. Snijders, E. J. Baerends, *Journal of Chemical Physics* **1996**, *105*, 6505.
- [18] E. vanLenthe, R. vanLeeuwen, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *International Journal of Quantum Chemistry* **1996**, *57*, 281.
- [19] A. D. Becke, K. E. Edgecombe, *Journal of Chemical Physics* **1990**, *92*, 5397.
- [20] B. Silvi, A. Savin, *Nature* **1994**, *371*, 683.
- [21] S. K. Noury, X.; Fuster, F.; Silvi, B., Laboratoire de Chimie Théorique, Université Pierre et Marie Curie. Paris, **1999**.
- [22] R. F. W. Bader, **1990**.
- [23] R. F. W. Bader, *Chemical Reviews* **1991**, *91*, 893.
- [24] M. J. Field, *A Practical Introduction to the Simulation of Molecular Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, **1999**.
- [25] M. J. Field, M. Albe, C. Bret, F. Proust-De Martin, A. Thomas, *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 1088.
- [26] M. J. Field, P. A. Bash, M. Karplus, *Journal of Computational Chemistry* **1990**, *11*, 700.
- [27] S. Marti, V. Moliner, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2005**, *1*, 1008.
- [28] ChemDraw.
- [29] G. a. J. H. N. Schaftenaar, *J. Comput.-Aided Mol. Design* **2000**, *14*.



*Anexo III.
Publicaciones*

Modeling the Decomposition Mechanism of Artemisinin

Pamela Moles, Mónica Oliva, and Vicent S. Safont

J. Phys. Chem. A 2006, 110, 7144-7158

Modeling the Decomposition Mechanism of Artemisinin

Pamela Moles, Mónica Oliva, and Vicent S. Safont*

Departament de Ciències Experimentals, Universitat Jaume I, 12080 Castelló, Spain

Received: December 20, 2005; In Final Form: March 13, 2006

A theoretical study on artemisinin decomposition mechanisms is reported. The calculations have been done at the HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) theoretical levels, by using 6,7,8-trioxobicyclo[3.2.2]nonane as the molecular model for artemisinin, and a hydrogen atom, modeling the single electron transfer from heme or Fe(II) in the highly acidic parasite's food vacuole, as inductor of the initial peroxide bond cleavage. All relevant stationary points have been characterized, and the appearance of the final products can be explained in a satisfactory way. Several intermediates and radicals have been found as relatively stable species, thus giving support to the current hypothesis that some of these species can be responsible for the antimalarial action of artemisinin and its derivatives.

Introduction

Malaria is one of the most worrying infectious diseases currently affecting the human race. Forty percent of the world's population is at risk of malaria infection, and each year 100 million people experience a malarial illness that kills about 2.7 million of them (primarily African children).¹ There are four members of the *Plasmodium* genus that infect humans, via transmission through the bite of the Anopheles female mosquito.²

The parasite responsible for the majority of fatal malaria infections, *Plasmodium falciparum*, can kill patients in a matter of hours. Most strains of *P. falciparum* have now become resistant to chloroquine and other traditional antimalarials,^{3,4} and this fact provides the reason for research for new drugs.

Artemisinin (qinghaosu 1, Scheme 1), which was isolated by Chinese chemists in the early 1970s from the ancient *Artemisia annua* sweet wormwood Chinese herbal remedy for fevers,⁵ is the most relevant advance in the treatment of malaria disease in the last 20 years; artemisinin and some derivatives are the most potent and rapidly acting antimalarial drugs at hand nowadays.⁶ Artemisinin is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group, and their unusual 1,2,4-trioxane ring system has been proven to be critical for the antimalarial activity.^{1,7}

The mechanism of action of artemisinin is not clear, and it is still under debate.^{3,8,9} Artemisinin and endoperoxide-based drugs have the ability to generate a range of different reactive intermediates, and many of these have been proposed as the mediators of the antimalarial activity of this class of drugs:

(a) The activation of the artemisinin peroxidic bond by iron(II)–heme can generate oxygen-centered radicals that could kill the parasite; this drug-mediated oxidative stress has been proposed on the basis of *in vitro* experiments with infected human red blood cells or with parasite membranes.¹⁰ However, it has also been proposed that the parasite death in the presence of artemisinin is probably not due to nonspecific or random cell damage caused by freely diffusing oxygen radicals but might involve specific radicals and targets.^{11,12}

(b) An acid-mediated opening of the peroxidic function of artemisinin, generating a hydroperoxide that would be the source of electrophilic oxygenating species, has also been suggested.¹³ However, other authors have argued against an initial heterolytic cleavage mechanism on the basis of spin-trapping experiments that show that homolysis is the only route of artemisinin

degradation with no evidence of heterolytic retro-Michael addition of the endoperoxide bridge.¹⁴

(c) The transfer of an oxygen atom from the peroxide function of artemisinin to a chelated iron ion to generate an Fe(IV)=O toxic species has also been proposed,¹⁵ but several groups have contested this chemical mechanism.^{16–18}

(d) The reductive cleavage of the peroxide bond in artemisinin, prompted by ferrous iron (in the form of heme or iron(II) salts) can form oxygen-centered radicals¹⁹ which, in turn, can lead to the formation of carbon-centered radicals.²⁰ These are now widely accepted (although sometimes questioned^{16,21}) as key intermediates in a series of chemical reactions leading from antimalarial trioxane to various intermediates, one or more of which could kill the malaria parasites.⁴ Definitive evidence for the generation of carbon radical intermediates during ferrous-mediated endoperoxide degradation of artemisinin and its derivatives has been provided by EPR spin-trapping techniques,^{22–24} but the question if these radicals are simply intermediates to other species, like carbocations, responsible for the observed alkylation of proteins, still remain unresolved.^{3,25}

On the other hand, several molecular targets have been proposed for the reactive intermediates generated from artemisinin and its derivatives:

(a) Alkylation of heme to form heme–artemisinin adducts has been proposed to result in the prevention of heme polymerization to nontoxic hemozoin, thus leading to the parasite death by a mechanism similar to that proposed for the chloroquine-based antimalarials.^{16,26–28} However, it is not clear if the inhibition of the heme polymerization is related to the antimalarial mode of action of this class of drugs, and some recent studies suggest that the activity of artemisinins does not require heme.^{12,29–31}

(b) Alkylation of some specific parasite proteins when artemisinin or other active trioxanes were incubated within human red blood cells infected by *P. falciparum* has also been reported.^{32–34} Another possible target protein is the translationally controlled tumor protein.^{35,36}

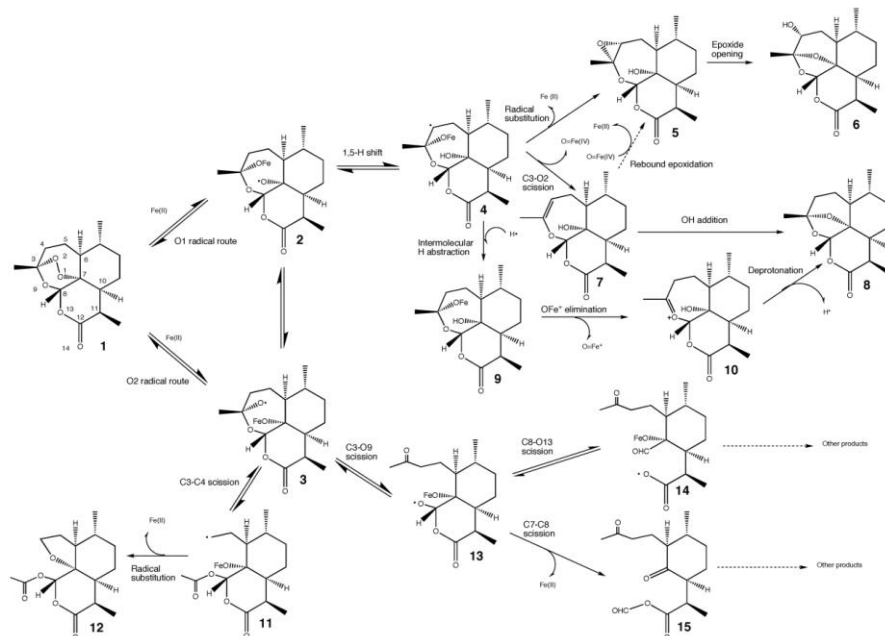
(c) Artemisinin has also been proposed to be involved in the specific inhibition of malarial protease activity.³⁷

(d) Recently, compelling evidence has been provided that artemisinin acts by inhibiting PfATP6, the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) orthologue of *P. falciparum*.¹²

Artemisinin Decomposition Mechanisms

J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006145

SCHEME 1



Overall, the weight of evidence and the fact that resistance has not yet developed to the artemisinins suggest that the drugs do not exert their antimalarial effects by hitting a single biological target but rather by simultaneously hitting several targets with very high precision and efficiency.^{3,30}

In the past 2 decades, a large number of papers have been published dealing with the artemisinin antimalarial activity, and a significant progress has been made in the elucidation of the chemical mechanisms of action. Among the published papers, some pioneering theoretical investigations can be found.

The first theoretical investigation on the mechanism of decomposition of trioxanes was made by Gu et al.⁷ within the unified mechanistic framework for the Fe(II) induced cleavage of artemisinin^{15,23} (Scheme 1). The mechanism sketched in Scheme 1, adapted from ref 23, is nowadays generally accepted for the ferrous ion induced cleavage of 1,2,4-trioxanes. Gu et al. studied the intramolecular 1,5-hydrogen shift (from 2 to 4) and the homolytic C–C cleavage (from 3 to 11) steps by using the molecular model 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane (1m, Scheme 2) at the B3LYP/6-31G(d,p) level. Recently, Drew et al. have used artemisinin itself (1) to study the same steps at the same theoretical level,³⁸ and Tommunphean et al.³⁹ reported also these steps at IMOMO (B3LYP/6-31G(d,p)/HF/3-21G), by using artemisinin, dihydroartemisinin, and deoxyartemisinin as molecular models. On the other hand, Taranto and co-workers^{8,40} studied the processes at the semiempirical AM1 and PM3 levels by using 1 as a model, and the structures and energies of 2, 4, 5, 6, 3, 11, 12, 13, 14, and 15 were obtained. Besides the different model size used in these studies, it is worth noting that, in some of them,^{7,38,39} a hydrogen atom is used instead of

the ferrous ion so that the oxygen- and carbon-centered model radicals are neutral, while in the Taranto's work^{8,40} an electron is chosen so that the oxygen- and carbon-centered model radicals are anionic. This difference affects also the subsequent steps in the sense that to reach the proposed final species appearing in the mechanism (cf., 5, 6, 7, 8, 12, and 15, see Scheme 1), either a hydrogen atom,⁷ or an electron,⁸ has to be eliminated from the model molecules.

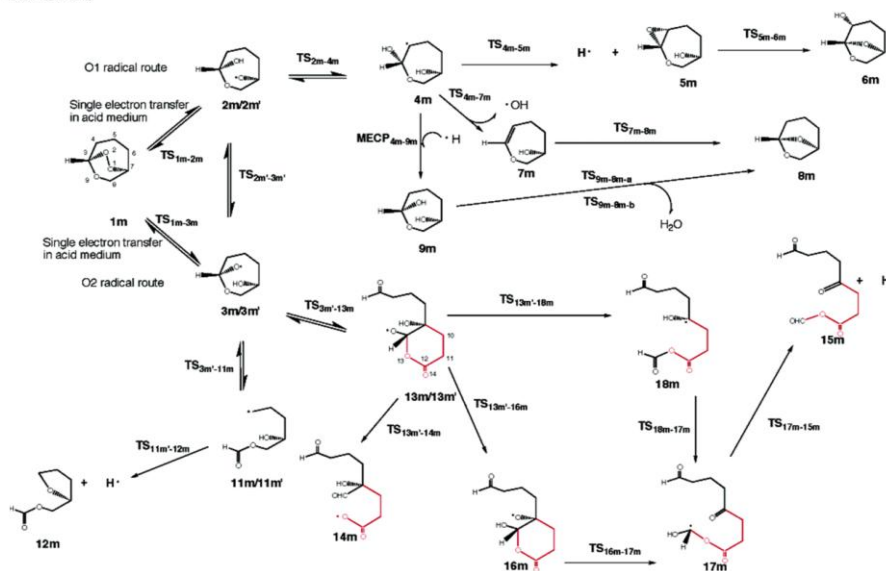
Very recently, a work by Taranto et al.⁴¹ has appeared reporting geometries at B3LYP/6-31G(d), and energies at B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) levels, of structures 2, 4, 3, 11, and the two corresponding transition structures (TSs), and also some information on the energetics of 5 and 6. The authors use 1 as the molecular model and an H atom instead of the iron(III). An electron is also used: the authors calculate neutral radicals as well as anion radicals, although the results better agree with experiment when using the neutral ones, which is not surprising because of the highly acidic media in which the processes take place, that favors protonation of the putative anions as they are formed.

In the present paper, we report a theoretical study modeling the whole proposed mechanism for the decomposition of artemisinin^{15,23} with the aim of revealing the details of the structures, stability, and processes involved in the postulated steps, and contributing to a better understanding of the rearrangement of endoperoxides at the molecular level that may lead to the development of more potent and therapeutically efficient drugs than those already available.

7146 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

SCHEME 2



Computational Methods and Models

Following the work of Gu et al.,⁷ we have used 1m as the molecular model and an H atom to induce the initial peroxide cleavage. In the real system a single electron transfer prompts for the peroxide bond cleavage. However, due to the high acidity in the parasite's food vacuole, the putative radical anions formed should be protonated as they are formed. Hence, the use of an H atom modeling the Fe(II) approaching the O—O bridge and forming an O—H bond after peroxide cleavage accounts for the actual situation.^{39,41} We have characterized all relevant stationary points, minima, and TSs shown in Scheme 2, at the HF/3-21G theoretical level. It is worth noting that the small model used is not adequate for some later steps in the mechanism (cf., steps from 13m onward), because the neighbor atoms have to be taken into account at those steps. Hence, we have conveniently enlarged the molecular model as can be seen in Scheme 2, to complete the investigations of those later steps. Then, we have further refined the calculated structures at the B3LYP/6-31G(d,p) level, to check the accuracy of the HF approach and to obtain more reliable values for the energetic parameters.

All stationary points have been characterized as minima or TSs by means of a vibrational analysis. All the wavenumbers obtained for the minima are positive, while in the case of the TS, one and only one wavenumber is imaginary. This unique imaginary frequency, associated to the transition vector (TV),⁴² that is, the eigenvector associated with the unique negative eigenvalue of the force constant matrix, describes the atomic motion at the TS and can be used to trace the intrinsic reaction coordinate (IRC)⁴³ pathway that connects reactants and products. The Gaussian98⁴⁴ program package was used for all the calculations.

The unrestricted (UHF, UB3LYP) formalisms were used for the species with unpaired electrons. The doublet nature of the

radicals was confirmed by the values of the S^z operator. All calculated radicals showed S^z values before annihilation of the first spin contaminant (B3LYP/6-31G(d,p) level) between 0.7739 and 0.7527, which are very close to the true doublet state S^z value of 0.75. Spin densities were obtained summing up the diagonal terms of the spin density matrix for each atom.

Results and Discussion

The cleavage of 1 with FeSO₄ in aqueous CH₃CN gave two major products, 6 and 12, in 67% and 25% yields, respectively, while 5 has been identified as a minor component (1–2% yield).²³ On the other hand, if the cleavage of 1 is conducted by using FeBr₂ in THF/1,4-cyclohexadiene, three major products were obtained, namely, 8, 12, and 6, in 71%, 16.7%, and 4.2% yields, respectively.⁴⁵

To account for these and many other experimental observations, the unified decomposition mechanism shown in Scheme 1^{15,23} has been proposed for the artemisinin decomposition process. It begins with the Fe(II)-mediated cleavage of the endoperoxide bridge, through a single electron transfer from the Fe(II) ion to the peroxy bond, yielding two radical anions ion-paired with the resulting Fe(III): 2 (O1 radical) and 3 (O2 radical). Each one of the radicals has its own routes, the O1 radical route starting from 2 and the O2 radical route starting from 3, to evolve further and give the final products.

The O1 radical route has been suggested to render the products, 5, 6, 7, and 8. The O2 radical route can explain the appearance of 12, among other possible decomposition products. The radicals 2 and 3 were postulated to be rapidly interchangeable, and we have for the first time obtained a TS modeling such interconversion, see below.

From the Starting 1,2,4-Trioxane to the Carbon-Centered Radicals. As stated above, we have used 1m as the molecular

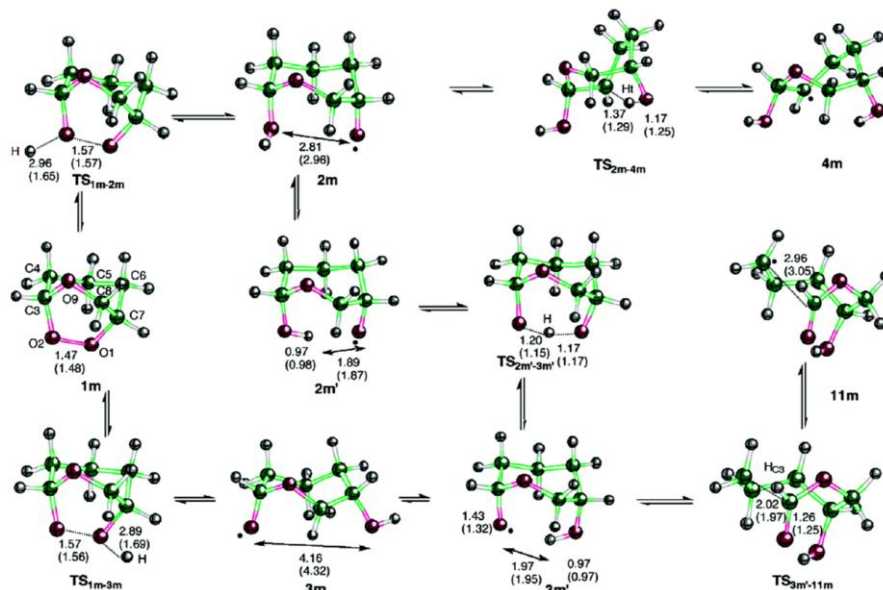


Figure 1. Stationary points 1m, 2m, 2m', 3m, 3m', 4m, 11m, TS_{1m-2m}, TS_{1m-3m}, TS_{2m-3m}, TS_{2m-4m}, and TS_{3m-11m}. Selected geometric parameters at HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) (in parentheses) are shown. The atom numbering is also indicated.

model for 1 (Scheme 2). The peroxide opening induced by a hydrogen atom can give either 2m or 3m, from which the O1 and O2 radical routes, respectively, can be modeled. From 2m, an intramolecular 1,5-hydrogen shift produces a secondary carbon-centered radical 4m which may have several pathways for further reaction. From 3m, via C3–C4 scission, radical 11m can be attained.

In Figure 1 the stationary points 1m, 2m, 2m', 3m, 3m', 4m, and 11m, as well as TS_{1m-2m}, TS_{1m-3m}, TS_{2m-3m}, TS_{2m-4m}, and TS_{3m-11m}, are depicted, and some geometric parameters are indicated. The energetics of these structures are reported as Supporting Information. We have calculated the reference energy as the sum of the energies of 1m and the H atom that, as commented above, accounts for the single electron transfer in the acidic parasite's food vacuole. In Figure 2, energy profiles are drawn from the energetic values.

As the H atom modeling the Fe(II) approaches O1 or O2, the O1–O2 distance in 1m smoothly increases and the energy of the system slightly rises until TS_{1m-2m} or TS_{1m-3m} are reached. From TS_{1m-2m}, the O1 radical 2m is found. The O1–O2 bond has been broken, and the unpaired electron is localized mainly at the O1 atom. Thereafter, a 1–5 H shift, via TS_{2m-4m} with a small energy barrier of ca. 10 kcal/mol (B3LYP value, HF renders a barrier of ca. 32 kcal/mol), can yield the secondary C4 radical 4m, that is found to be slightly more stable than 2m when the B3LYP approach is used.

In addition, we have found that a small conformational change is possible from 2m, yielding 2m'. From this point, a hydrogen exchange between O2 and O1, via TS_{2m'-3m}, gives rise to the O2-centered radical 3m'. This TS is the first theoretical evidence that the O1 and O2 radical routes can be interconnected, giving

support to the previous proposals about this fact. In the real system, the Fe(III) ion has to move from one oxygen to another, instead of an H atom. Preliminary calculations from our group, not shown here, including the ferric ion, suggest that a TS describing this interchange process does exist. The O2 pathway is thermodynamically favored according to the results of the calculations at the B3LYP level on the model system, suggesting an initial preference for such a route.

The species 3m' can also be attained starting from 1m, via TS_{1m-3m} and 3m, after a conformational change. Finally, the C3–C4 scission of 3m', via TS_{3m'-11m}, leads to the primary C4 carbon radical 11m, which is the more stable structure within these initial steps.

The two computational approaches used, B3LYP/6-31G (d,p) and HF/3-21G, render quite similar geometries, the main difference being the calculated distances of the H entering atom to O1 or O2 at TS_{1m-2m} or TS_{1m-3m}, respectively. However, the energy description is different: HF results show 2m' as the more stable species. A smoother profile is found by using the DFT-based approach; as it includes electron correlation, the B3LYP results can be given more confidence. The whole process from 1m to either 4m or 11m is found to be highly exothermic, thus giving support to the proposed C-centered radical formation.

In Table I, the *S*' operator values and the spin density on selected atoms are reported for the stationary points found. It is apparent that the B3LYP calculations are more adequate for describing the radicals than the HF ones, because the former show a significantly lower spin contamination and properly describe such species as doublets. The HF wave function is less accurate, and some residual spin contamination is found, mainly for the TS_{1m-2m}, TS_{1m-3m}, and TS_{3m'-11m}. The B3LYP values

7148 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

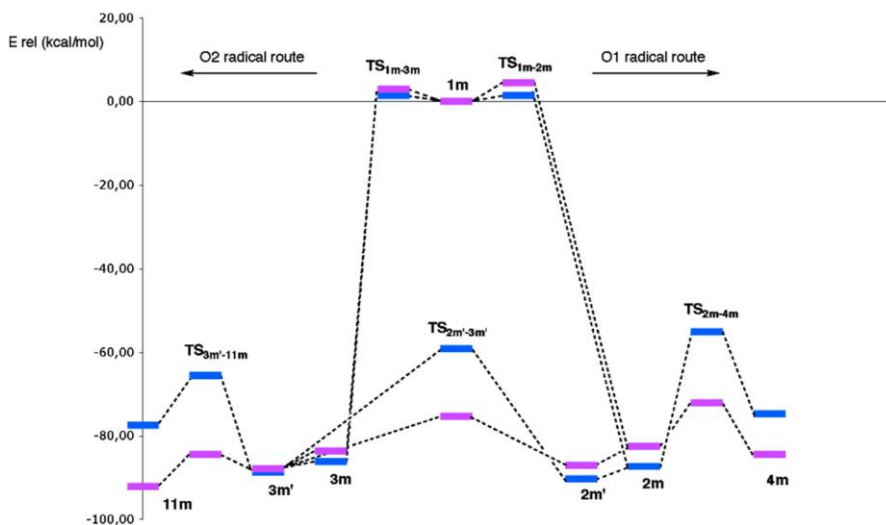


Figure 2. Energy profiles for the steps leading from 1m to 4m and 11m HF and B3LYP results are indicated in blue and pink colors, respectively.

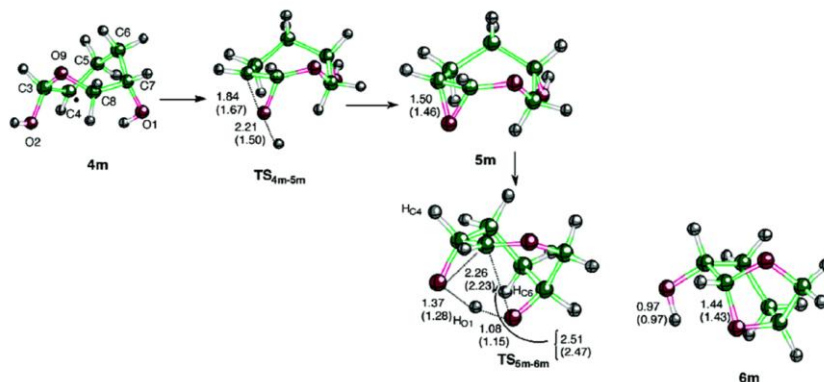


Figure 3. Stationary points 4m, 5m, 6m, TS_{4m-5m} , and TS_{5m-6m} . Selected geometric distances (Å) at HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) (in parentheses) are shown. The atom numbering is also indicated.

show the spin density at TS_{1m-2m} and TS_{1m-3m} on the H atom being incorporated to the model molecule, with some delocalization to the O1 and O2 atoms, respectively. At 2m and 2m' the unpaired electron is mainly found on the O1 atom, while at 3m and 3m' it is mainly localized on the O2 atom. At $TS_{2m'-3m'}$ the spin density is found on both O1 and O2 atoms and not on the H atom being transferred. The TS_{2m-4m} show a situation with the radical character partitioned between C4 and O1, and at 4m the unpaired electron is localized on C4, as expected. At $TS_{3m'-11m}$ a larger spin density is found on C4 than on O2, and hence this TS has a late character. Finally, at 11m the unpaired electron is found on C4.

The imaginary frequencies, the negative eigenvalues, and the main components of the TVs for the TSs found are reported as

Supporting Information. The TS_{1m-2m} and TS_{1m-3m} are associated to the O1–O2 breaking bond and H–O1 or H–O2 forming bonds, as expected. The two theoretical approaches used render a different fluctuation pattern: the HF results describe a situation in which the O1–O2 breaking dominates, because the H atom is still located far from the oxygen atom, while the B3LYP calculations describe a later situation, with the H atom closer to the corresponding oxygen. Accordingly, the imaginary frequencies are higher for the B3LYP results, because the H motion dominates.

For $TS_{2m'-3m'}$, TS_{2m-4m} , and $TS_{3m'-11m}$, a very similar fluctuation pattern is described by the two theoretical approaches. The TSs are associated to the expected atom motions, and hence $TS_{2m'-3m'}$ describes the H exchange between O1 and

TABLE 1: S^2 Operator Values for the Stationary Points Indicated^a

	S^2	S	S		S^2	S	S
TS _{1m-2m}	0.9930 (0.7739)	H O1 O2	1.00 (0.82) 0.50 (0.19) -0.50 (-0.05)	TS _{1m-3m}	0.9893 (0.7705)	H O2 O1	1.00 (0.84) 0.49 (0.18) -0.49 (-0.05)
2m	0.7563 (0.7533)	O1 C7 H _{C7}	1.05 (0.87) -0.15 (-0.05) 0.06 (0.11)	2m'	0.7570 (0.7545)	O1 C7 C8	1.06 (0.73) -0.15 (-0.02) 0.03 (0.14)
3m	0.7560 (0.7541)	O2 C3 C4	1.04 (0.79) -0.14 (-0.05) 0.06 (0.14)	3m'	0.7563 (0.7548)	O2 C3 C4	1.04 (0.68) -0.14 (-0.04) 0.07 (0.20)
TS _{2m-3m'}	0.8039 (0.7563)	O2 O1 H	0.65 (0.42) 0.63 (0.51) -0.21 (-0.03)	TS _{2m-4m}	0.7962 (0.7565)	C4 O1 Ht C5	0.85 (0.49) 0.59 (0.52) -0.23 (-0.04) -0.12 (-0.03)
4m	0.7632 (0.7538)	C4 C5 C3 Hnt	0.85 (0.98) -0.20 (-0.07) -0.16 (-0.05) -0.10 (-0.04)	TS _{3m'-11m}	0.8788 (0.7591)	C4 O2 C3 C5	0.92 (0.62) 0.64 (0.32) -0.44 (-0.04) -0.12 (-0.03)
11m	0.7630 (0.7538)	C4 C5 H _{C4} H _{C4'}	0.92 (1.05) -0.20 (-0.07) -0.11 (-0.05) -0.10 (-0.05)	TS _{4m-5m}	1.2317 (0.7663)	C4 H _{O2} O2 C5	0.91 (0.36) 0.98 (0.77) -0.69 (-0.10) -0.14 (-0.02)
TS _{4m-7m}	1.0447 (0.7534)	C4 O2 C3 C5	1.08 (0.11) 0.83 (0.85) -0.79 (-0.01) -0.16 (-0.01)	11m'	0.7628 (0.7538)	C4 C5 H _{C4} H _{C4'}	1.30 (1.08) -0.20 (-0.08) -0.11 (-0.05) -0.10 (-0.05)
TS _{11m-12m}	0.9082 (0.7609)	C4 Ht O1 C5	0.82 (0.42) 0.72 (0.63) -0.39 (-0.06) -0.11 (-0.02)	TS _{3m'-13m}	0.9627 (0.7662)	O2 O9 C3	0.81 (0.39) 0.76 (0.60) -0.62 (-0.11)
13m	0.7572 (0.7551)	O9 C8 C7	1.05 (0.72) -0.15 (-0.03) 0.01 (0.16)	13m'	0.7562 (0.7548)	O9 C8 C7 H _{C8}	1.02 (0.67) -0.13 (-0.02) 0.06 (0.16) 0.05 (0.10)
TS _{13m-14m}	1.1387 (0.7661)	O9 O13 O14 C8 C12 C7	0.81 (0.29) 0.80 (0.34) 0.45 (0.27) -0.69 (-0.06) -0.49 (-0.05) 0.10 (0.11)	14m	0.7564 (0.7559)	O13 O14	1.04 (0.56) -0.03 (0.51)
TS _{13m-16m}	0.8112	O9 O1 H _{O1}	0.65 0.67 -0.23	16m	0.7565 (0.7545)	O1 C7 C8	1.05 (0.76) -0.15 (-0.03) 0.01 (0.14)
TS _{16m-17m}	0.926 (0.7598)	C8 O1 C7	0.76 (0.46) 0.70 (0.36) -0.57 (-0.02)	17m	0.7612 (0.7527)	C8	1.00 (0.84)
TS _{17m-15m}	0.9717 (0.7639)	H _{O9} C8 O9	0.81 (0.77) 0.78 (0.32) -0.54 (-0.11)	TS _{13m'-18m}	0.8850 (0.7572)	C7 O9 C8 C6	0.80 (0.35) 0.66 (0.42) -0.44 (0.00) -0.11 (-0.02)
18m	0.7606 (0.7534)	C7 C6 C10 O1	1.11 (0.82) -0.17 (-0.06) -0.15 (-0.04) 0.01 (0.09)	TS _{18m-17m}	0.7703 (0.7550)	C7 C8	0.52 (0.37) 0.50 (0.41)

^a Spin densities (S) on selected atoms. The HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) values, in parenthesis, are shown.

O2; TS_{2m-4m} is associated to the Ht migration from C4 to O1, and TS_{3m'-11m} accounts for the C3-C4 breaking to render 11m.

The O1 Radical Route: Obtention of 6m. Starting from the C4 secondary radical 4, a two-step path has been proposed to render 6, one of the major products experimentally obtained in the artemisinin decomposition (see Scheme 1). In the first

step, the Fe(II) ion is released to obtain the epoxide species 5, identified as a minor component in the products mixture in some artemisinin cleavage experiments. Then, the epoxide opening concerted with the lactone ring closure and the H migration from O1 to O2 would render the product 6. We have theoretically modeled this pathway (Figure 3) from 4m, via TS_{4m-5m}

7150 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

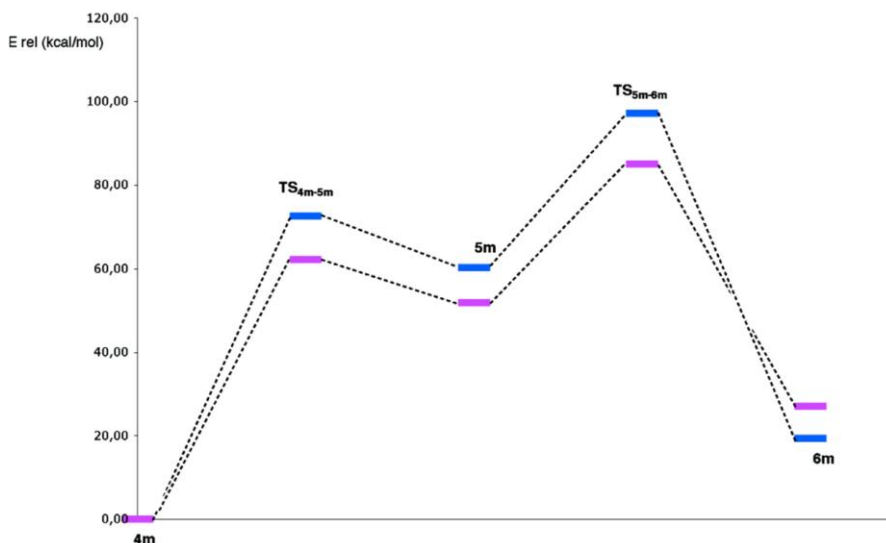


Figure 4. Energy profiles for the steps leading from 4m to 6m. HF and B3LYP results are indicated in blue and pink colors, respectively.

to obtain the epoxide intermediate 5m, and then, through the TS_{5m-6m} describing the lactone closure and H_{O1} migration, 6m is finally obtained.

The energetics of the calculated steps are detailed in the Supporting Information and depicted in Figure 4. The energy barrier for the first step is calculated to be quite high, around 62 kcal/mol (72.6 kcal/mol for the HF approach), which is not surprising because the epoxide intermediate plus an H atom was found to be ca. 52 kcal/mol (60 kcal/mol with HF) more unstable than the secondary radical 4m. The epoxide intermediate opening, coupled to the H_{O1} shift from O1 to O2, occurs through a considerably lower energy barrier (around 33 kcal/mol), and the final product 6m is hence attained. These results suggest that the epoxide intermediate would probably not be responsible for the antimalarial activity, because the O-centered and C-centered radicals are found to be more stable species. This observation is in agreement with the recent work by Taranto et al.⁴¹

The main components of the TV associated to TS_{4m-5m}, reported as Supporting Information, describe the H_{O2} departure and O2-C4 closure. At the B3LYP level these two motions participate similarly, albeit antisymmetrically, in the TV. However, at the HF theoretical level, the H_{O2}-O2 distance is found to be very large, 2.21 Å, and hence the TV is dominated by the O2-C4 bond formation. It is worth noting that the H_{O2} that is eliminated from the model molecule is the H atom that entered at O2 in the first step of the global process and, hence, represents the Fe(II) ion in the real system. On the other hand, the TV associated to the TS_{5m-6m} does not show a clearly dominant component. Although the particular TV components values depend on the coordinates defined, the whole molecule participates in the epoxide opening and the final ring closure to yield 6m.

The spin density at TS_{4m-5m} concentrates at H_{O2} and C4 (see Table 1, B3LYP values), and the species is properly described as having a doublet spin multiplicity. However, the HF/3-21G

calculated wave function shows a large spin contamination, with an S^2 operator value of 1.2317, thus reinforcing the above observation that the B3LYP wave function offers a more accurate description of the calculated radicals.

The O1 Radical Route: Obtention of 8m. To account for the outcome of 8, two alternative paths were proposed starting from 4, see Scheme 1. One of them begins with the C3-O2 scission with O=Fe(IV) release, to yield the alkene 7, that can be isomerized to render 8. The other would start with a hydrogen abstraction from the media to render 9, which, via the consecutive OFe⁺ elimination and deprotonation, could give 8. We have modeled the first proposed alternative (see Figure 5) with the TS_{4m-7m}, which would account for the OH elimination (representing the O=Fe(IV) release), the 7m alkene intermediate, and the isomerization to 8m via the TS_{7m-8m}.

However, we were not able to obtain a TS connecting 4m and 9m. Instead, we have taken into account that 4m plus a hydrogen atom is a system with a global triplet multiplicity, while 9m is a singlet. Thus, we have conducted a search for the minimum energy crossing point (MECP) between the triplet and singlet hypersurfaces in the vicinities of the structures of interest by means of the Harvey algorithm, that minimizes a generalized gradient obtained from the combination of the energies and gradients of the two potential energy surfaces that cross each other.⁴⁶ In such a way we have found the MECP reported in Figure 5, which can be taken as a representative point in the 4m-9m step. From this MECP, an optimization in the singlet state renders 9m which, via two alternative TSs describing the water elimination coupled with the ring closure (cf., TS_{9m-8ma} and TS_{9m-8mb}) yields finally 8m (plus water). It is worth noting that a species modeling 10 (see Scheme 1) could not be found within our model: the 9m-8m conversion can be described by a single step with two alternatives depending on which oxygen is eliminated from the system to form the

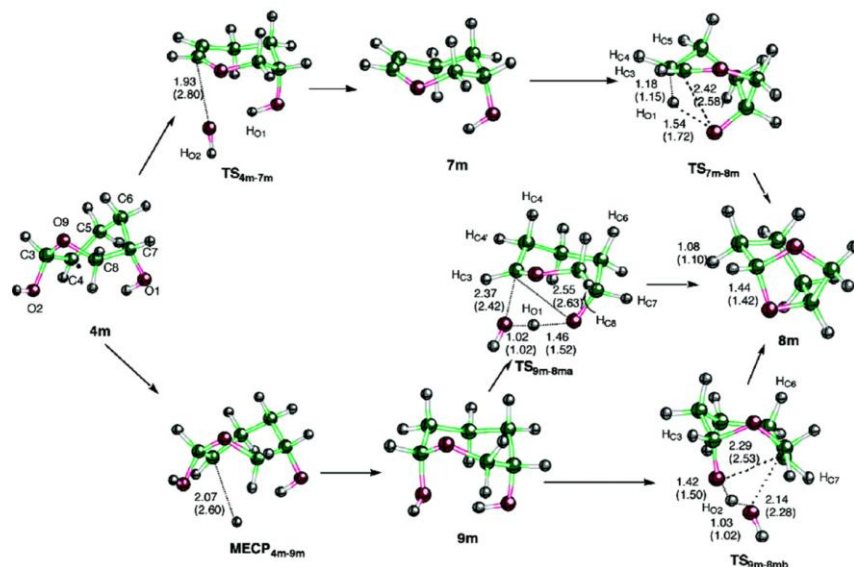
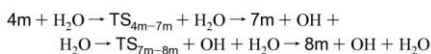


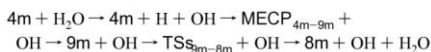
Figure 5. Structures obtained for 4m, 7m, 8m, 9m, TS_{4m-7m}, TS_{7m-8m}, MECP_{4m-9m}, TS_{9m-8ma}, and TS_{9m-8mb}. Selected geometric distances (Å) at HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) (in parentheses) are shown. The atom numbering is also indicated.

water molecule (see Scheme 2). These two alternative steps would model an Fe(III)OH release to give the final product 8.

It must be taken into account that the first pathway connects 4m with 8m plus a hydroxyl radical, while the second corresponds to the process from 4m plus a hydrogen radical abstracted from the media, to give 8m plus a water molecule. To make possible a comparison among the energetics of these points, we have added a water molecule representing the media from which an H atom is abstracted. In such a way, the two sequences would begin and end at the same points and comparisons can be done. The first step sequence would be as follows:



and the second sequence would be



In the first sequence the water molecule does not participate, and hence the relative energies have been calculated with respect to that of 4m, without taking into account the water energy. At the beginning of the second sequence the water molecule is split into H and OH radicals, and the relative energies have been calculated with respect to that of 4m plus a water molecule. In Figure 6 the energetic values obtained for these pathways are depicted. The highest point in the pathways from 4m to 8m is the MECP_{4m-9m} at the two calculation levels. This indicates that the first alternative path, via 7m, would be preferred from a kinetic point of view, although the 9m intermediate is more stable than the 7m alkene and the TSs connecting 9m with 8m are also less energy demanding than the TS_{7m-8m}. If there is a

source of H in the medium the two proposed paths can compete, provided there is enough energy to surmount the barrier heights and reach 9. The existence of two alternative paths ensures that 8 will be reached, as observed experimentally.

According to the main components of the TV (see the Supporting Information), the TS_{4m-7m} describes the OH release from the molecule, coupled with the C3-C4 double bond formation. The two theoretical levels render a rather different description: at the HF level the TV is largely dominated by the O2-C3 breaking bond, with a small contribution of the C3-C4 shortening. At B3LYP, on the contrary, a much larger O2-C3 distance is found so that the orientation of the OH fragment dominates the TV. Despite this different description, the IRC calculation from TS_{4m-7m} connects with the two proposed minima (4m and 7m) at both theoretical levels. The TS_{7m-8m} shows a global fluctuation of the molecule, that is being rearranged to the bicyclic 8m structure, and the H_{o1}-O1 distance as well as several dihedral angles describing the conformational change from the alkene to the bicycle contribute significantly to the TV.

As stated above, in the way from 4m to 9m, no TS is found. From 9m, two alternative TSs can yield 8m, depending on which oxygen leaves. The fluctuations are not limited to a particular fragment, but almost all the atoms in the molecule participate with its motions to the H₂O leaving to reach 8m. Accordingly, the imaginary frequency values are low for TS_{9m-8ma} and TS_{9m-8mb}.

As can be seen in Table 1, B3LYP results, the spin density at TS_{4m-7m} is mainly located at O2, because the OH fragment has almost been released from the molecule.

The O2 Radical Route: Obtention of 12m. Starting from the C4 primary radical 11, a one-step path has been proposed

7152 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

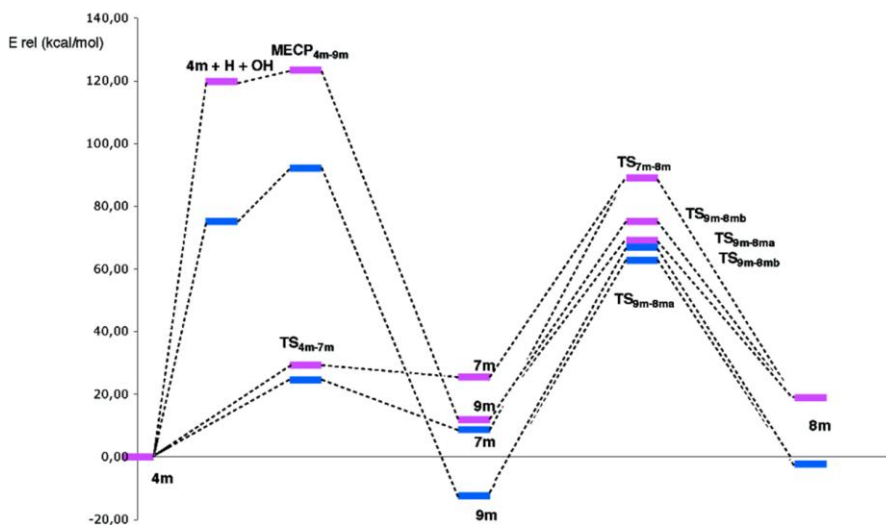


Figure 6. Energy profiles for the steps leading from 4m to 8m. HF and B3LYP results are indicated in blue and pink colors, respectively.

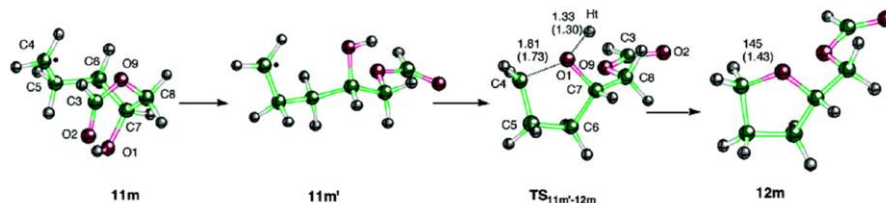


Figure 7. Structures obtained for 11m, 11m', 12m and $TS_{11m'-12m}$. Selected geometric distances (Å) at HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) (in parentheses) are shown. The atom numbering is also indicated.

to render 12, another product experimentally obtained in the artemisinin decomposition (see Scheme 1). In this step, the Fe(II) ion is released. We have modeled this pathway (Figure 7) from 11m via its conformer 11m', and $TS_{11m'-12m}$ to obtain 12m. The conformational change between 11m and 11m' implies the loss of the weak intramolecular hydrogen bond between O1 and O2. Consequently, a slight energy increase of around 1 kcal/mol can be sensed. The $TS_{11m'-12m}$ is associated to the Ht (representing the Fe(II) ion) release from O1 and the coupled closure of the furane ring. The energetics of the calculated steps are detailed in the Supporting Information and depicted in Figure 8. The energy barrier for the step is calculated to be around 49 kcal/mol.

At the two theoretical levels, the main TV components for $TS_{11m'-12m}$ are the Ht–O1 distance and the C7–C6–C5 and O1–C7–C6 bond angles, thus reflecting the coupling between the closure of the ring and the Ht release. As expected, 11m and 11m' present a similar spin density distribution (see Table 1), with the unpaired electron localized at C4. At $TS_{11m'-12m}$, the spin density appears on Ht and C4, with a minor participation of O1.

The O2 Radical Route: from 3m to 14m. An alternative for the 3 radical decomposition was proposed to start with a

C3–O9 scission, thus rendering the O9 radical 13 (see Scheme 1). Such species will be the intermediate to explain the appearance of 15 and other products derived either from 15 itself or from the oxygen radical 14. Although these species are not the main products of the artemisinin decomposition, they have been sometimes detected in artemisinin derivatives decomposition studies.⁴⁷

The first step, obtention of 13 from 3, has been modeled to occur via 3m' and $TS_{3m'-13m}$. In Figure 9 the structures of 3m', $TS_{3m'-13m}$, and 13m are presented. The barrier height is quite low, around 14 kcal/mol, and thus this step would be a competitive pathway inside the O2 radical route. The energy values are reported as Supporting Information, and the energy profiles are depicted in Figure 10.

From 13m onward the small molecular model used is not adequate, and it is necessary to enlarge it to include the neighbor six-membered ring, as can be seen in Scheme 2 (in which this neighbor ring is depicted in red color) and in Figure 9. The new model for 13 has been noted as 13m'. The breaking of the O13–C8 bond, via $TS_{13m'-14m}$, would render the O radical 14m. The barrier height associated to this step is around 22 kcal/mol.

The $TS_{3m'-13m}$ is clearly associated to the opening of the ring,

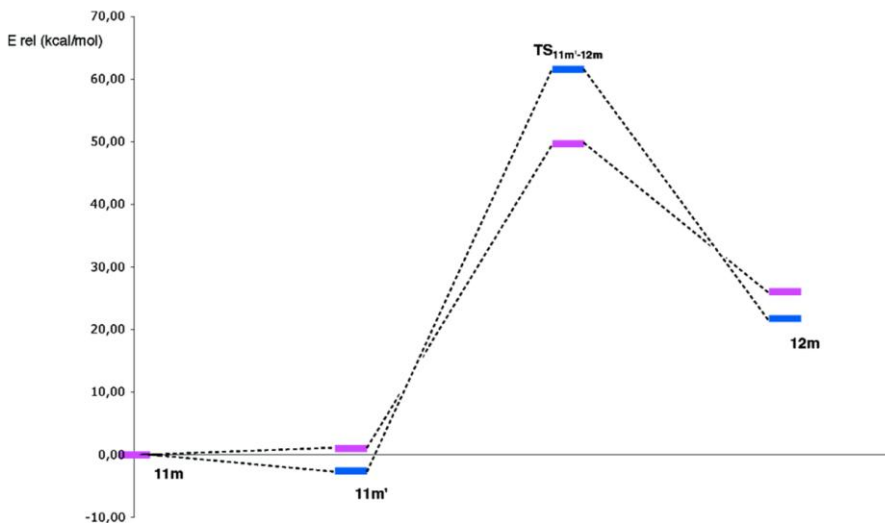


Figure 8. Energy profiles for the steps leading from 11m to 12m. HF and B3LYP results are indicated in blue and pink colors, respectively.

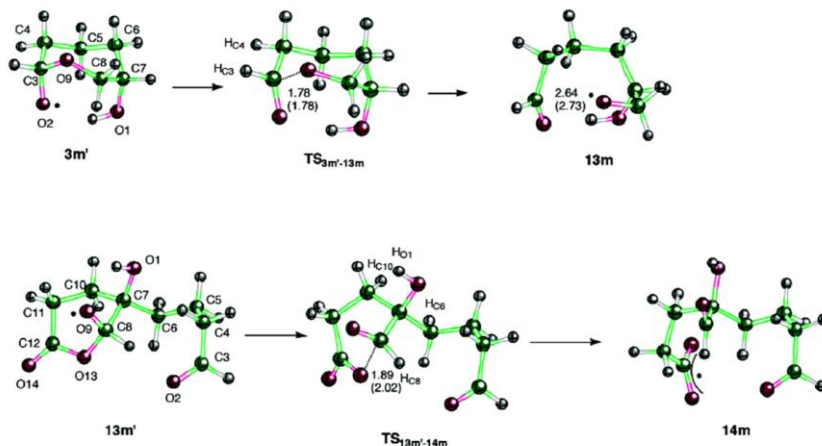


Figure 9. Structures obtained for 3m', 13m, 13m', 14m, TS_{3m'-13m}, and TS_{13m'-14m}. Selected geometric distances (Å) at HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) (in parentheses) are shown. The atom numbering is also indicated.

with a significant participation of the O2–C3 bond, that evolves to a double bond in 13m, and angles and dihedrals related with the ring opening. The main component in the TV associated to TS_{13m'-14m} is the O13–C8 bond distance that is being broken, with some angles and dihedrals participating also in the TV because of the second ring opening taking place at this point.

At TS_{3m'-13m} the spin density can be found partitioned between O2 and O9 (see Table 1), with some negative participation of C3. Once 13m is reached, the unpaired electron is located on O9 with a small delocalization to C7. At 13m' the

same trend is found, with the only difference that H_{C8} also participate in the electron delocalization. Then, at TS_{13m'-14m}, a strong delocalization of the unpaired electron is found, and the spin density is widespread on O9, O13, O14, and C7. C8 and C12 are found to have some (negative) spin density, especially at the HF level. Finally, at 14m, the unpaired electron is delocalized between O13 and O14 (B3LYP results; at the HF level this electron is wrongly assigned to O13).

The O2 Radical Route: Obtention of 15m. From 13, another pathway has been proposed: a C7–C8 scission with

7154 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

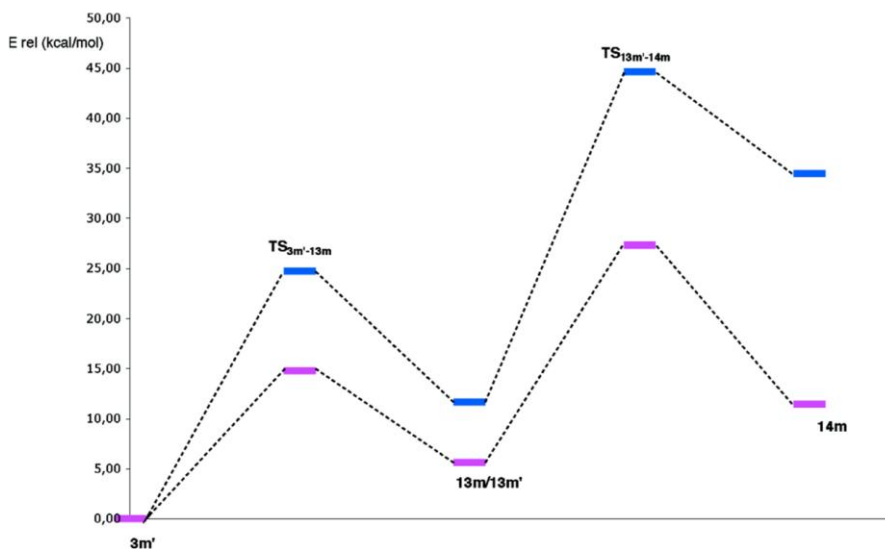


Figure 10. Energy profiles for the steps leading from $3m'$ to $14m$. HF and B3LYP results are indicated in blue and pink colors, respectively.

Fe(II) release would render the final species 15 and derived products (Scheme 1). However, we have found that this pathway is not a single step. Instead, two alternative pathways have been calculated starting from $13m'$ and ending up at $15m$ (Scheme 2): the first one would start with the C7–C8 breaking (via $TS_{13m'-18m}$) to render the C7 radical $18m$, which in turn would suffer an intramolecular hydrogen transfer between O1 and O9 through $TS_{18m-17m}$ yielding the C8 radical $17m$. It is worth noting that the H motion from O1 to O9 represents the Fe(III) motion in the real system. The second one would start with the H migration from O1 to O9 through the $TS_{3m'-16m}$ yielding the O1 radical $16m$. Then the C7–C8 bond breaking would take place, via $TS_{16m-17m}$, and in this way $17m$ is obtained again. This second alternative pathway was not completely characterized by using the B3LYP/6-31G(d,p) calculation level, because all efforts to find the $TS_{13m'-16m}$ were unsuccessful. However, the $TS_{16m-17m}$ has also been obtained by using the B3LYP approach. Once $17m$ was reached, the H release from O9, representing the Fe(II) release, via $TS_{17m-15m}$ would give the final product $15m$.

These structures are depicted in Figure 11, and the corresponding energies are reported as Supporting Information and drawn in Figure 12. It is apparent that the pathway through $18m$ is preferred, according to the B3LYP results. However, the HF/3-21G calculations suggest an initial preference for the pathway through $16m$ despite the higher energy barrier via $TS_{3m'-16m}$ if compared with the transit through $TS_{13m'-18m}$, because the second step from $18m$ to $17m$ is more energy demanding. At the two theoretical levels, the highest point in the energy profiles is found to be $TS_{17m-15m}$, and hence if $15m$ is to be reached, the two pathways will compete.

The main TV components correlate well with the expected atom motions in all cases: $TS_{13m'-18m}$ is mainly associated with the C8–C7 bond breaking, and the TV associated with $TS_{18m-17m}$ is dominated by the Ht–O1 distance and, to a lesser

extent, by the O1–C7 and O9–C8 bonds evolving from single to double and from double to single, respectively. The $TS_{17m-15m}$ describes the H_{O9} departure coupled with the O9–C8 bond that evolves to a carboxylic bond at $15m$. On the other hand, at the $TS_{13m'-16m}$ it can be sensed that the H_{O1} –O9 distance that is being shortened and the angles describing the conformation around the C7–C8 bond participate significantly in the associated TV. The $TS_{16m-17m}$ is mainly associated with the C8–C7 bond breaking.

The results shown in Table 1 for $TS_{13m'-16m}$ describe a partitioning of the spin density between O9 and O1, with a smaller and negative value for the H_{O1} being transferred. At $16m$ the unpaired electron is found at O1, as expected, and at $17m$ the spin density is found at C8. The $TS_{16m-17m}$ shows an intermediate situation with the unpaired electron delocalized between O1 and C8. On going from $17m$ to $15m$ the unpaired electron moves to H_{O9} , that will be released as a hydrogen atom in our model system.

The second pathway from $13m'$ begins with $TS_{13m'-18m}$, in which the unpaired electron is moving from O9 to C7. At $18m$ the spin density is found at C7, as expected, and the $TS_{18m-17m}$ shows a delocalization of the unpaired electron between C7 and C8, with no remarkable spin density found on O9, O1, or Ht.

Overall Overview: The Whole Set of MechanismsUp to this point, we have reported the results step by step. To obtain a global view of the processes studied, it is very convenient to assemble the fragments. In Figure 13, a global energy profile is drawn starting from $1m$, describing the O1 radical route up to the final products $6m$ and $8m$, as obtained by using the B3LYP/6-31G(d,p) theoretical level. This view reveals that the two products are very close in energy to each other, and the same can be said about the points of maximum energy in the pathways of minimum energy connecting the reactants to each one of the products, cf., TS_{5m-6m} and TS_{7m-8m} for the routes to $6m$ and $8m$, respectively. Also, it is interesting to note that

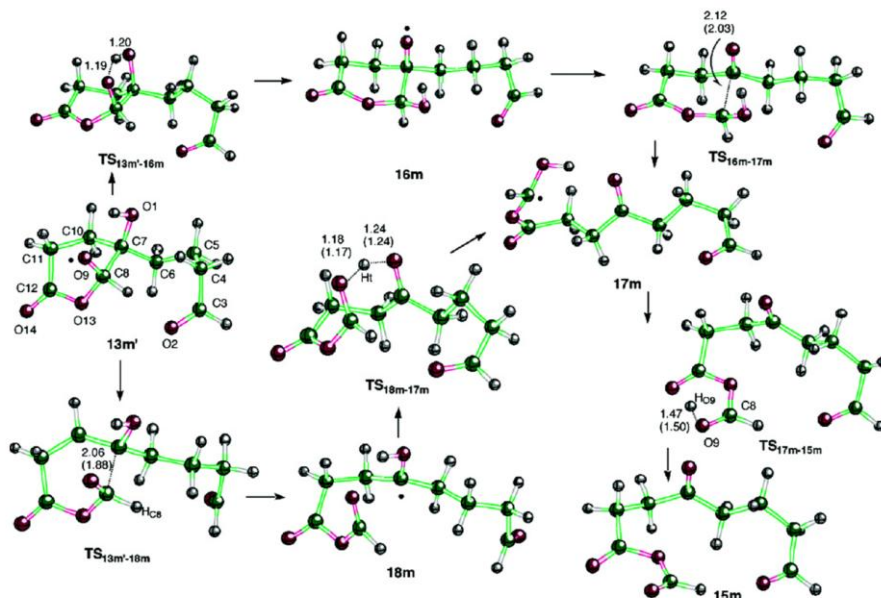


Figure 11. Structures obtained for 13m', 16m, 17m, 18m, 15m, TS_{13m'-16m}, TS_{16m-17m}, TS_{13m'-18m}, TS_{18m-17m}, and TS_{17m-15m}. Selected geometric distances (Å) at HF/3-21G and B3LYP/6-31G(d,p) (in parentheses) are shown. The atom numbering is also indicated.

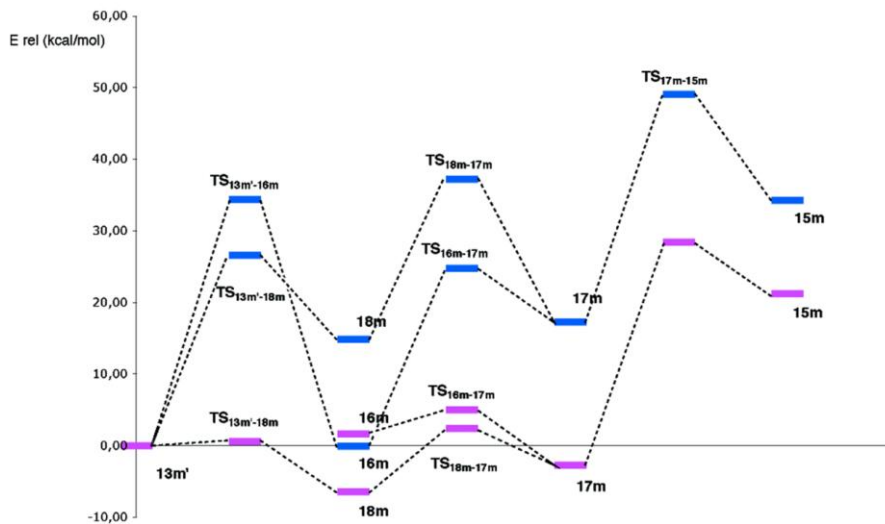


Figure 12. Energy profiles for the steps leading from 13m' to 15m. HF and B3LYP results are indicated in blue and pink colors, respectively.

almost all points in the reported routes lie under the energy value of the initial TS, thus ensuring the products formation if

the reaction is initiated: the competition between the paths will be resolved mainly as a function of the experimental conditions,

7156 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

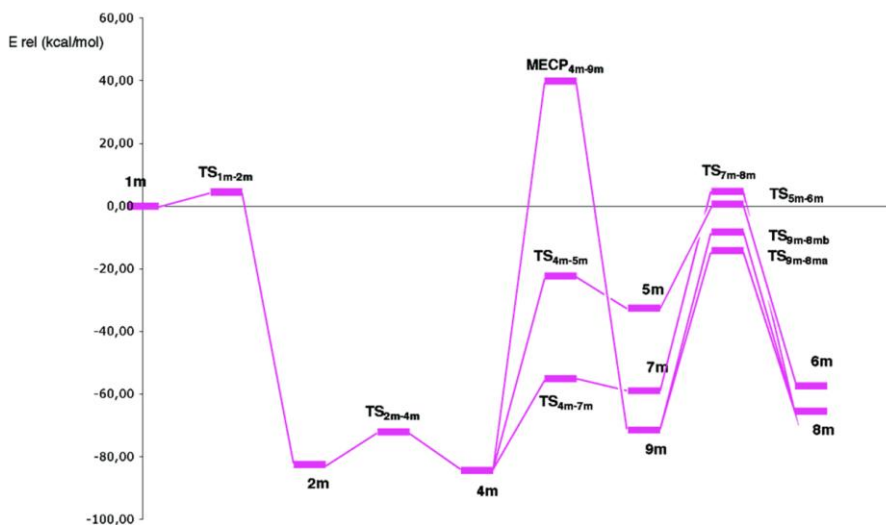


Figure 13. Energy profiles for the O1 radical route, calculated at the B3LYP/6-31 G(d,p) level.

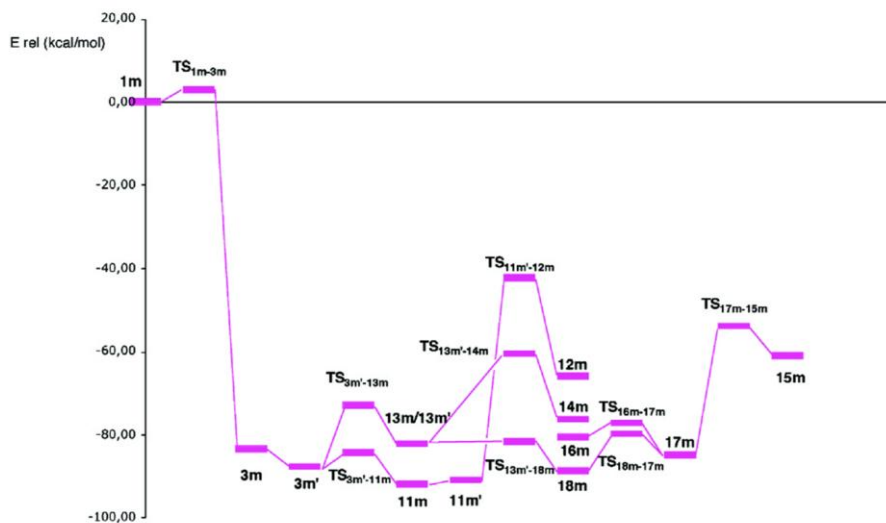


Figure 14. Energy profiles for the O2 radical route, calculated at the B3LYP/6-31 G(d,p) level.

and hence one or the other product will be found as the major one. As can be seen, the MECP_{4m-9m} point lies at a relatively high energy, and as stated above the obtention of 8m is better explained via 7m and TS_{7m-8m}.

In Figure 14, the global energy profile is drawn starting from 1m, describing this time the O2 radical route up to the final products 12m and 15m. It must be said that 14m is not a final

product, but a radical that would further evolve to other species not studied here. Again it is revealed that the two products are very close in energy to each other, although in this case there is a larger difference between the energies of the points of maximum energy in the pathways of minimum energy connecting the reactants to each one of the products, cf., TS_{11m'-12m} and TS_{17m-15m} for the routes to 12m and 15m, respectively.

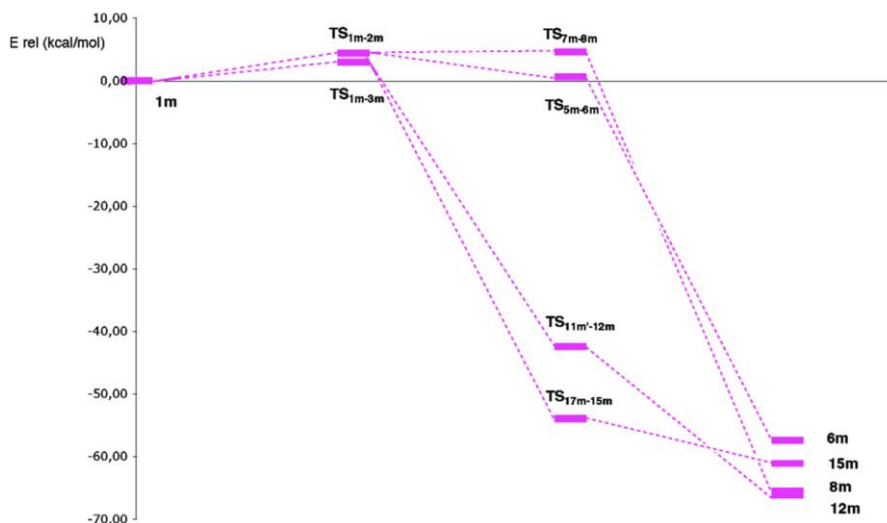


Figure 15. Comparative energies of the reactants, the initial TSs, the stationary points of highest energy found along the minimum energy pathways studied, and the species modeling the experimentally obtained products, as calculated by means of the B3LYP/6-31G(d,p) theoretical level.

All points in the reported routes lie under the energy value of the initial TS, and the products formation and the competition between the paths would take place, as before.

The aforementioned observations are even clearer in Figure 15, in which only the starting reactants, the initial TSs, the TSs of maximum energy along the minimum energy O1 and O2 radical routes, and the final products are sketched. From this figure it can be seen that the products 12m and 15m are predicted to be formed in an easier way, and that the formation of 8m and 6m is also straightforward once the reaction is initiated, because the highest point to surmount is the initial TS for all cases except the 8m obtention, for which a very small increase in energy of only 0.20 kcal/mol is found until TS_{7m-8m} is reached.

Conclusions

The main goal of the work herein reported was to substantiate from a theoretical point of view the suggested molecular mechanisms for the artemisinin decomposition. By using a relatively simple molecular model and two theoretical approaches, we have found that the appearance of the final products can be explained in a satisfactory way. Furthermore, several intermediates and radicals have been found as relatively stable species, thus giving support to the current hypothesis that some of such species can be responsible for the antimalarial action of artemisinin and its derivatives, either by hitting specific targets within the parasite or by disrupting the hemozoin polymerization process and causing in this way the *Plasmodium* death.

Further work is guaranteed in what concerns the description of the model system, and our group is conducting calculations on the artemisinin decomposition process with more accurate models, including on one hand the Fe(II) ion that initiates the cascade of reactions from the artemisinin to the final products

and on the other the solvent effects that can be determinant in discriminating between the possible pathways. The way by which the potentially antimalarial intermediates hit the putative targets, and the effect of the different substituents in the artemisinin derivatives, are also under study.

Despite the simple model and moderate theoretical levels used, some specific conclusions can be derived from this work:

- The products formation is assured once the reaction is initiated, and the different paths will compete depending on the experimental conditions.
- We have for the first time obtained a TS modeling the previously postulated interconversion between the initial O-centered radicals. With this finding, it has been demonstrated that the O1 and O2 radical routes are intimately related.
- The epoxide intermediate is probably not responsible for the antimalarial activity, because other intermediates are found to be more stable and potentially more active as alkylating agents. This is in agreement with the recent work by Taranto et al.⁴¹
- The formation of 8(m) can take place via two different mechanisms, but the preferred pathway will be the one passing through 7(m).
- The formation of 15(m) is a process more complex than originally suggested and involves three different steps from the oxygen-centered radical 13(m).
- Although the two theoretical approaches used render similar values for the geometric parameters, some significant differences are found in what concerns the energies and fluctuation patterns, as well as the description of the spin distribution in the molecule. The B3LYP/6-31G(d,p) calculations are preferred for a reasonable calculation of the last properties.
- One of the stationary points ($TS_{13m-16m}$) was found at the HF/3-21G level, but not by using the B3LYP/6-31G(d,p)

7158 J. Phys. Chem. A, Vol. 110, No. 22, 2006

Moles et al.

calculations. This fact could suggest that actually only one of the paths herein studied connecting 13m¹ with 18m takes place.

The present paper has to be understood as an extension of the pioneering works by Gu et al.⁷ and Taranto et al.⁸ in this field and opens a broad investigation project to further efforts that will hopefully contribute to a better understanding of the antimalarial activity of artemisinin and its derivatives.

Acknowledgment. Financial support by the Generalitat Valenciana (Project GV04B-029) and Fundació Bancaixa-UJI (P1 IA2002-04 and P1 IB2005-15) is gratefully acknowledged. P.M. acknowledges the Generalitat Valenciana for the Grant TS/05/UJI/02.

Supporting Information Available: Tables containing the absolute and relative energies of the stationary points found at both theoretical levels used; Tables containing the imaginary frequencies, the unique negative eigenvalues, and the main components of the TVs for the TSs obtained at both theoretical levels used; selected geometric parameters. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Meshnick, S. R.; Taylor, T. E.; Kamchonwongpaisan, S. *Microbiol. Rev.* 1996, 60, 301.
- (2) Pinheiro, J. C.; Kiralji, R.; Ferreira, M. C. *QSAR Comb. Sc* 2003, 22, 830.
- (3) O'Neill, P. M.; Posner, G. H. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 2945.
- (4) Posner, G. H.; O'Neill, P. M. *Acc. Chem. Res.* 2004, 37, 397.
- (5) Klayman, D. L. *Science* 1985, 228, 1049.
- (6) Haynes, R. K.; Ho, W.-Y.; Chan, H.-W.; Fugmann, B.; Stetter, J.; Croft, S. L.; Vivas, L.; Peters, W.; Robinson, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2004, 43, 1381.
- (7) Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* 1999, 103, 9364.
- (8) Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. d. M.; de Oliveira, F. G.; de Araujo, M. T.; Correa, C. R. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 2002, 580, 207.
- (9) Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 167.
- (10) Krungkrai, S. R.; Yuthavong, Y. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987, 81, 710.
- (11) Meshnick, S. R. *Lancet* 1994, 344, 1441.
- (12) Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. *Nature* 2003, 424, 957.
- (13) Haynes, R. K.; Pai, H. H.-O.; Voerste, A. *Tetrahedron Lett* 1999, 40, 4715.
- (14) Cazelles, J.; Robert, A.; Meunier, B. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 6776.
- (15) Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Posner, G. H. *Adv. Pharmacol.* 1996, 37, 253.
- (16) Robert, A.; Meunier, B. *Chem. Soc. Rev.* 1998, 27, 273.
- (17) Jefford, C. W.; Vicente, M. G. H.; Jacquier, Y.; Favarger, F.; Mareda, J.; Millason-Schmidt, P.; Brunner, G.; Burger, U. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1475.
- (18) Jefford, C. W. *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 1803.
- (19) Meshnick, S. R.; Thomas, A.; Ranz, A.; Xu, C. M.; Pan, H. Z. *Mol. Biochem. Parasitol* 1991, 49, 181.
- (20) Posner, G. H.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 8328.
- (21) Wu, Y. *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 255.
- (22) Butler, A. R.; Gilbert, B. C.; Hulme, P.; Irvine, L. R.; Renton, L.; Whitwood, A. C. *Free Radical Res* 1998, 28, 471.
- (23) Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 3316.
- (24) O'Neill, P. M.; Bishop, L. P.; Searle, N. L.; Maggs, J. L.; Ward, S. A.; Park, B. K.; Mabbs, F. J. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 1578.
- (25) Szpilman, A. M.; Korshin, E. E.; Hoos, R.; Posner, G. H.; Bachi, M. D. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 6531.
- (26) Zhang, F.; Gosser, D. K.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* 1992, 43, 1805.
- (27) Robert, A.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2001, 40, 1954.
- (28) Cazelles, J.; Robert, A.; Meunier, B. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 609.
- (29) Olliaro, P.; Haynes, R. K.; Meunier, B.; Yongyuth, Y. *Trends Parasitol* 2001, 17, 123.
- (30) Ridley, R. G. *Nature* 2003, 424, 887.
- (31) Haynes, R. K.; Monti, D.; Taramelli, D.; Basilico, N.; Parapini, S.; Olliaro, P. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003, 47, 1175.
- (32) Yang, Y. Z.; Asawamahakada, W.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* 1993, 46, 336.
- (33) Yang, Y. Z.; Little, B.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 48, 569.
- (34) Asawamahakada, W.; Ittarat, I.; Pu, Y. M.; Ziffer, H.; Meshnick, S. R. *Antimicrob. Agents Chemother* 1994, 38, 1854.
- (35) Bhisuthibhan, J.; Philibert, M. A.; Fujikawa, H.; Aikawa, M.; Meshnick, S. R. *Eur. J. Cell. Biol.* 1994, 78, 665.
- (36) Bhisuthibhan, J.; Meshnick, S. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 2397.
- (37) Pandey, A. V.; Tekwani, B. L.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 19383.
- (38) Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Ismail, F. M. D. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 2004, 711, 95.
- (39) Tommunphan, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 2005, 724, 99.
- (40) Arantes, C.; de Araujo, M. J.; Taranto, A. G.; de Carneiro, J. W. *Int. J. Quantum Chem* 2005, 103, 749.
- (41) Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. d. M.; de Araujo, M. T. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 1546.
- (42) McIver, J. W., Jr. *Acc. Chem. Res.* 1974, 7, 72.
- (43) Fukui, K. *J. Phys. Chem.* 1970, 74, 4161.
- (44) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, revision A.7 ed.; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.
- (45) Posner, G. H.; Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5885.
- (46) Harvey, J. N.; Ascgi, M.; Schwarz, H.; Koch, W. *Theor. Chem. Acc.* 1998, 99, 95.
- (47) Avery, M. A.; Fan, P.-C.; Karle, J. M.; Bonk, J. D.; Miller, R.; Goins, D. K. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1885.

A theoretical study on the decomposition mechanism of artemisinin

Pamela Moles, Mónica Oliva, and Vicent S. Safont

Tetrahedron 2008, 64, 9448–9463



A theoretical study on the decomposition mechanism of artemisinin

Pamela Moles, Mónica Oliva, Vicent S. Safont*

Departament de Química Física i Analítica, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2008

Received in revised form 18 July 2008

Accepted 18 July 2008

Available online 24 July 2008

Keywords:

Malaria

DFT calculations

Trioxane chemistry

C-Radical intermediates

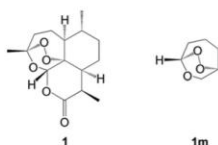
ABSTRACT

A theoretical study on the artemisinin decomposition mechanism is reported. The suggested pathways have been reproduced and the appearance of the final products can be explained in a satisfactory way. In addition, several intermediates and radicals have been found as relatively stable species, thus giving support to the current hypothesis that some of these species can be responsible for the antimalarial action of artemisinin and its derivatives.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The interest of unraveling the details of the decomposition mechanism of artemisinin (*qinghaosu*, **1**, Scheme 1) arises from the fact that artemisinins are the most potent and rapidly acting antimalarial drugs at hand nowadays.¹ Malaria remains as the foremost cause of mortality among infectious diseases currently affecting mankind.² The endemic malarial regions are Africa, Central and South America, and South Asia, and current projections suggest that if global warming remains unchecked, it could be re-established itself in Europe and North America.³ Malaria causes more than 1 million deaths yearly and kills a child every 30 s.^{4–7}



Scheme 1.

There are four members of the *Plasmodium* genus that infects humans, transmitted through the bite of the Anopheles female mosquito,⁸ being the *Plasmodium falciparum* the responsible for the severe malarial infections. Combinations of an artemisinin with

other antimalarial drugs are now recommended treatments for *P. falciparum* malaria in most endemic areas,⁹ because such combinations might be useful in delaying the emergence of artemisinin resistance.¹⁰

Artemisinin is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group and its unusual 1,2,4-trioxane ring system has been proven to be critical for the antimalarial activity.^{7,11} The mechanism of action of artemisinin is not clear and is still under debate.^{12,13,14–17} It has been suggested that different reactive intermediates are generated in the artemisinin and endoperoxide-based drugs decomposition, and that some of these could be the mediators of the antimalarial activity of this class of drugs.

The reductive cleavage of the peroxide bond in artemisinin, prompted by ferrous iron (in the form of heme or iron(II) salts), can form oxygen-centered radicals,¹⁸ which, in turn, can lead to the formation of carbon-centered radicals.¹⁹ These are now widely accepted (although sometimes questioned^{20,1}) as key intermediates in a series of chemical reactions leading to various intermediates, one or more of which could kill the malarial parasites.⁶ Definitive evidence for the generation of carbon radical intermediates during ferrous-mediated endoperoxide degradation of artemisinin and its derivatives was provided by EPR spin-trapping techniques.^{21–23} Such carbon radicals have been reported as heme alkylating agents either in vitro or in vivo in infected mice,^{14,24} being this alkylating activity related to the presence of the parasite in infected animals. It has also been established that artemisinin reacts much faster with heme in hemoglobin than with the free heme.²⁵ Alkylation of heme to form heme–artemisinin adducts has been proposed to result in the prevention of heme polymerization to non-toxic hemozoin, thus leading to the parasite death by a mechanism similar to that proposed for the chloroquine-based antimalarials.^{26–29} Although

* Corresponding author. Tel.: +34 964728085; fax: +34 964728066.
E-mail address: safont@qfa.uji.es (V.S. Safont).

some studies suggested that the activity of artemisinins does not require heme,^{30–33} it has been pointed out that these studies used iron chelators capable to chelate heme iron as well, and that the claims about artemisinin's effect not requiring heme can be considered as premature.²⁵

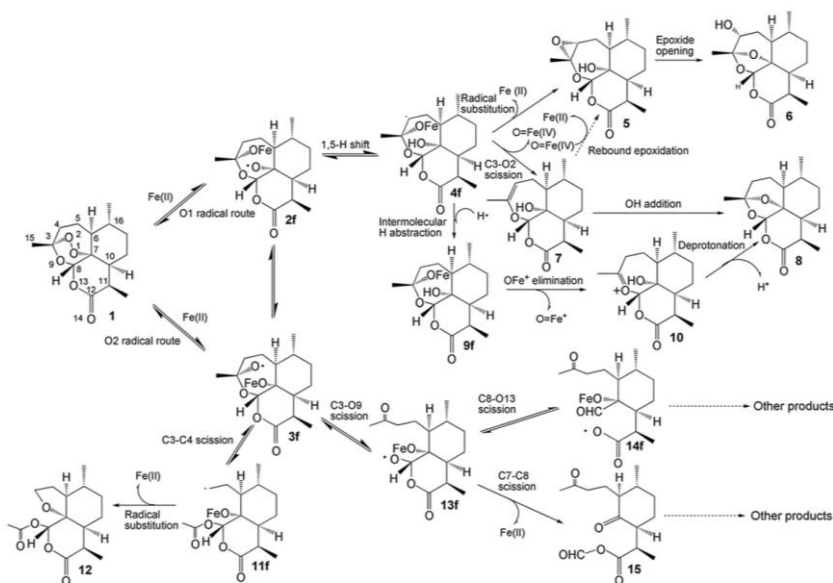
Apart from heme, other molecular targets have been proposed for the reactive intermediates generated from artemisinin and its derivatives.^{34–39,31} Overall, the weight of evidence and the fact that resistance has not yet developed to the artemisinins suggest that the drugs do not exert their antimalarial effects by hitting a single biological target, but rather by simultaneously hitting several targets with very high precision and efficiency.^{32,5}

Several theoretical investigations have been reported on the decomposition mechanism of artemisinin and other trioxanes. The first one was made by Leszczynski et al.,¹¹ taking as reference framework the unified mechanism for the Fe(II) induced cleavage of artemisinin^{40,22} (Scheme 2) that is nowadays generally accepted for the ferrugin ion induced degradation of 1,2,4-trioxanes. Leszczynski et al. have studied the intramolecular 1,5-hydrogen shift (from **2f** to **4f**) and the homolytic C–C cleavage (from **3f** to **11f**) steps by using the molecular model 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane (**1m**, see Scheme 1) at the B3LYP/6-31G(d,p) level. After, Drew et al. have used artemisinin itself to study the same steps at the same theoretical level⁴¹ and Tonmunphan et al. reported also these steps at IMOMO (B3LYP/6-31G(d,p):HF/3-21G), by using artemisinin, dihydroartemisinin, and deoxyartemisinin as molecular models,⁴² as well as by using up to 12 antimalarial artemisinin derivatives.⁴ In these studies, a hydrogen atom was used for modeling the single electron transfer from heme or Fe(II) in the highly acidic parasite's food vacuole, as inductor of the initial peroxide bond cleavage, so that the oxygen and carbon-centered model radicals are neutral.

The acid medium in which the artemisinin decomposition process is supposed to take place favors the protonation of the putative anions as they are formed. Another calculation on these two steps, performed according to the classical bonding theory, has also recently appeared.⁴³

Taranto et al.^{12,44} studied the decomposition process at the semiempirical AM1 and PM3 levels by using **1** as a model, and the structures and energies of species representing **2f**, **4f**, **5**, **6**, **3f**, **11f**, **12**, **13f**, **14f** and **15** were obtained. In these papers an electron transfer is used to prompt for the peroxide cleavage, and thus the oxygen and carbon-centered model radicals are anionic. However, a more recent work by Taranto et al.⁴⁵ has appeared reporting geometries at B3LYP/6-31G(d), energies at B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) levels, of models **2f**, **4f**, **3f**, **11f**, and the two corresponding transition structures, and also some information on the energetics of **5** and **6**. In this paper, the authors use **1** as molecular model, and either an electron or a hydrogen atom to initiate the decomposition. The authors calculate neutral radicals as well as anionic radicals, and the results better agree with experiment when using the neutral ones. The solvent effects on the relative stability of some radicals derived from artemisinin have also been studied, by using the PCM/COSMO approach in water and THF solvents at B3LYP/6-31G(d) level, and it was found that the carbon radicals are more stable than the oxygen radicals.⁴⁶

An alternative mechanistic proposal, involving the ionic scission of the peroxide bond and consequently generating a carbocation at C4, has recently been tested and discarded, so the radical pathway remains as the likeliest explanation for antimalarial activity.² Finally, a theoretical investigation at DFT/ZORA/TZP level, dealing with the interactions of several endoperoxides including artemisinin, with two possible sources of iron, namely the $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$



Scheme 2.

9450

P. Moles et al. / Tetrahedron 64 (2008) 9448–9463

ion and heme, has been reported.⁴⁷ The authors describe an initial formation of an Fe–O bond, followed by O–O cleavage, yielding the oxygen-radical species that subsequently are transformed into the carbon-centered radicals.

Recently, we have reported a theoretical study modeling the decomposition mechanisms of artemisinin, by using 6,7,8-trioxo-bicyclo[3.2.2]nonane as the molecular model (**1m**, Scheme 1).⁴⁸ However, the model used did not take into account the strain and rigidity that the neighbor rings provide to the trioxane moiety. Furthermore, the model had to be somewhat enlarged, by including a six-member ring, in order to properly describe the latter steps of the O2 radical route. Thus, in the present study we have used artemisinin itself to more accurately characterize the proposed decomposition mechanisms with the aim to contribute to a better understanding of the rearrangement of endoperoxides at the molecular level.^{40,22}

2. Computational methods and models

We have used a hydrogen atom to model the initial peroxide bond cleavage. As mentioned above, a single electron transfer is suggested to take place; however, due to the high acidity in parasite's food vacuole, the putative radical anions formed should be protonated as they are formed. Hence, the use of an H atom modeling the Fe(II) approaching the O–O bridge and forming an O–H bond after peroxide cleavage adequately models the situation in the human body.^{42,45} All relevant stationary points shown in Scheme 3, as well as the corresponding transition structures, have been characterized at the HF/3-21G theoretical level. Then, we have further refined the calculated structures at the B3LYP/6-31G(d,p).

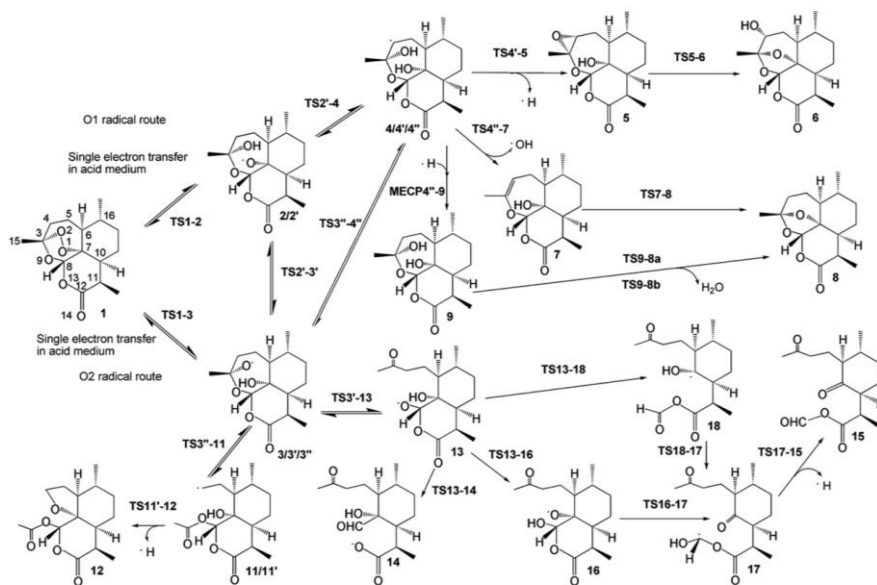
The stationary points have been characterized as minima or transition structures (TS) by means of a vibrational analysis. For the minima, all the wavenumbers obtained are positive, while in the case of TS, one and only one wavenumber is imaginary. This unique imaginary frequency, associated to the transition vector (TV),⁴⁹ describes the atomic motion at TS and can be used to trace the intrinsic reaction coordinate (IRC)⁵⁰ pathway that connects reactants and products. The Gaussian98⁵¹ program package was used for the calculations.

Several species appearing along the mechanisms have an unpaired electron. For these species, the unrestricted (UHF, UB3LYP) formalisms were used and its doublet nature was confirmed by the values of the S^2 operator. Before annihilation of the first spin contaminant, the S^2 values (at B3LYP/6-31G(d,p) level) are found to range between 0.7751 and 0.7527, very close to the true doublet state S^2 value of 0.75. The spin densities for each atom were obtained by summing up the diagonal terms of the spin density matrix.

3. Results and discussion

It has been found that the decomposition of **1** renders different final products depending on the experimental conditions. For instance, if the cleavage of **1** is prompted with FeSO₄ in aqueous CH₃CN, the products **6** and **12** are obtained in 67% and 25% yields, respectively, while **5** is found as a minor component (1–2% yield).²² However, if the cleavage of **1** is conducted by using FeBr₂ in THF/1,4-cyclohexadiene, three major products were obtained, namely **8**, **12**, and **6**, in 71%, 16.7%, and 4.2% yields, respectively.⁵²

The whole experimental observations on trioxane decompositions have been satisfactorily explained by means of the



Scheme 3.

unified mechanism, shown in Scheme 2^{40,22} for the artemisinin case. The process is proposed to begin with the Fe(II)-mediated cleavage of the endoperoxide bridge, yielding **2f** (O1 radical) and **3f** (O2 radical). Each one of the oxygen-centered radicals has its own routes for further evolution: O1 radical route starting from **2f** and O2 radical route starting from **3f** to give the final products. The O1 radical route can explain the appearance of the products **5**, **6**, and **8**. The O2 radical can account for the formation of **12**, among other possible decomposition products. The radicals **2f** and **3f** were postulated to be rapidly interchangeable, and we obtained a TS modeling such interconversion.⁴⁸

In view of the complexity of the proposed decomposition mechanism, and for the sake of clarity, we are going to dissect the whole mechanism to small pieces. In this way, a detailed description of the processes can be reported step by step. Finally, to obtain a global overview of the whole mechanism, the fragments will be assembled.

3.1. The oxygen-centered radicals formation

The peroxide bond opening of **1** induced by a hydrogen atom can give either **2** or **3**, from which the O1 and O2 radical routes, respectively, can be modeled (see Scheme 3). As the H atom modeling the Fe(II) approaches O1 or O2, the O1–O2 distance in **1** smoothly increases and the energy of the system slightly rises until **TS1-2** or **TS1-3** is reached. From these TSs, following the IRC path, the local minima **2** (O1 radical) and **3** (O2 radical) are found, respectively. The O1–O2 bond has been broken and the unpaired electron is localized mainly at O1 or O2 atoms.

A link between the O1 and O2 radical routes has been found to take place by means of a hydrogen exchange between O2 and O1, via **TS2'-3'**. This TS is the theoretical evidence that the O1 and O2 radical routes are interconnected, giving support to the previous proposals about this fact and confirming the results obtained in our previous study.⁴⁸ From **TS2'-3'**, the local minima **2'** and **3'**,

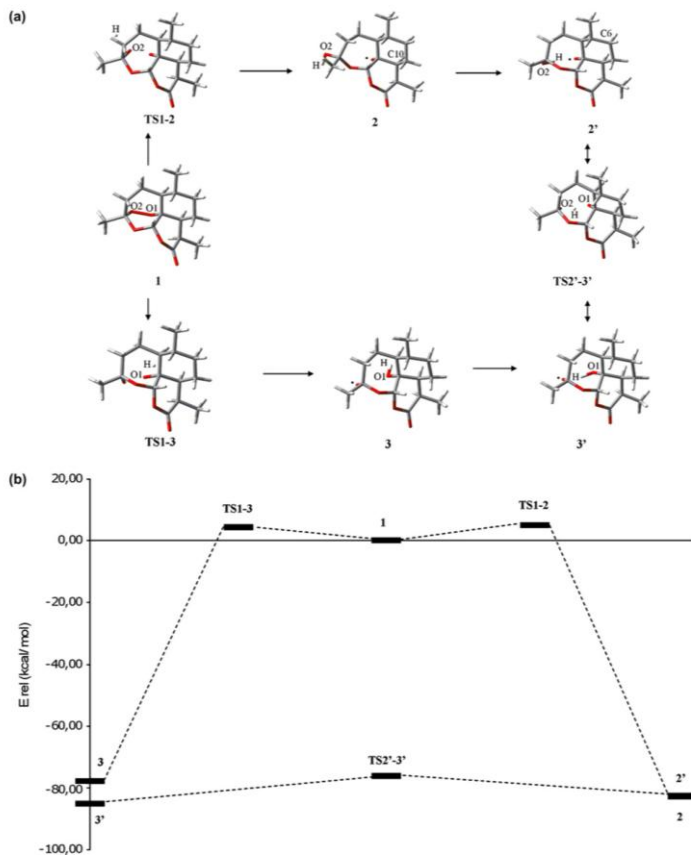


Figure 1. (a) Stationary points **1**, **2**, **2'**, **3**, **3'**, **TS1-2**, **TS2'-3'**, and **TS1-3**. (b) Energy profiles for the steps leading from **1** to the O-centered radicals at B3LYP level.

9452

P. Moles et al. / Tetrahedron 64 (2008) 9448–9463

conformers of **2** and **3**, respectively, are found. It should be noted that we obtain the two minima associated to each TS by following the IRC path, and this gives rise in some cases to different conformations representing the same species. For the sake of completeness, we report the geometry and energy of all the conformers found. It should also be noted that in the actual system, at **TS2'-3'** the Fe(III) ion has to move from one oxygen to another, instead of an H atom. Preliminary calculations from our group, not shown here, including the ferric ion, suggest that a TS describing this interchange process do exists.

In Figure 1a, the stationary points **1**, **2**, **2'**, **3**, and **3'**, as well as **TS1-2**, **TS1-3**, and **TS2'-3'**, obtained at B3LYP/6-31G(d,p) theoretical level, are depicted. The corresponding structures obtained at HF/3-21G level are not reported and are available from the authors on request.

In Table 1, the S^2 operator values and the spin densities on selected atoms are reported for the stationary points found, as obtained by using the B3LYP calculations. The corresponding results calculated at the HF level are found to be less adequate, because some residual spin contamination is found, mainly for the TSs, and are not herein reported. The spin density at **TS1-2** and **TS1-3** is shown to concentrate on the H atom being incorporated to the model molecule, with some delocalization to the O1 and O2 atoms, respectively. At **2** and **2'**, the unpaired electron is mainly found on the O1 atom, while at **3** and **3'** (and also at **3''**, see below) it is mainly localized on the O2 atom. It is interesting to note that the conformational difference between **2** and **2'**, and between **3** and **3'** (and **3''**), produces small changes at the electronic level. Thus, some residual spin density accumulates on C10 at **2**, while at **2'** it is C6 the atom on which some spin density can be found. On the other hand, the differences in the spin distribution between **3** and **3'** (and **3''**) can mainly be sensed in the spin density value found on C4 and C15 atoms. It is also interesting to note that at **TS2'-3'** the spin density is found on both O1 and O2 atoms, and not on the H atom being transferred.

The energetic values of these structures are reported in Table 2; the corresponding values at HF/3-21G level are reported as Supplementary data. We have calculated the reference energy as the sum of the energies of **1** and the H atom that, as commented above, accounts for the single electron transfer in the acidic parasite's food vacuole. In Figure 1b, the energy profiles are drawn. It can be seen that the O2 pathway is slightly favored according to the reported results, suggesting an initial preference for such route. However, it can also be seen that the transition structure **TS2'-3'**, that connects the O1 and O2 routes, can be easily attained, and hence the two radical routes are equally opened once the process begins.

The imaginary frequencies, the negative eigenvalues, and the main components of the TVs for **TS1-2**, **TS1-3**, and **TS2'-3'** are reported as Supplementary data. Transition states **TS1-2** and **TS1-3** are associated to the O1–O2 breaking bond and the H–O2 or H–O1 forming bonds, as expected, while at **TS2'-3'** the motion of the hydrogen atom that is being exchanged between O1 and O2 dominates the fluctuation pattern.

3.2. The carbon-centered radicals formation

An intramolecular hydrogen shift from C4 to O1, via **TS2'-4**, connects the O1 radical species with the secondary carbon-centered radical **4**. On the other hand, a C3–C4 scission on the O2 radical species through the **TS3'-11** yields the C4 primary radical **11**. Following the IRC path from **TS3'-11**, we have found **3''**, a third and slightly more stable conformation for the O2 radical.

According to the results summarized in Table 1, **TS2'-4** shows a situation with the radical character partitioned between C4 and O1, and at **4** the unpaired electron is mainly localized on C4, as

Table 1

S^2 operator values for the stationary points indicated. Spin densities (S) on selected atoms. The B3LYP/6-31G(d,p) values are shown

S^2	S		S^2	S	
TS1-2	0.7719	H 0.80	TS1-3	0.7744	H 0.81
		O1 0.18			O2 0.18
2	0.7533	O1 0.86	2'	0.7538	O1 0.80
		C10 0.10			C6 0.13
3	0.7534	O2 0.84	3'	0.7540	O2 0.76
		C4 0.07			C4 0.16
		C15 0.10			C15 0.07
TS2'-3'	0.7559	O2 0.43	TS2'-4	0.7560	C4 0.46
		O1 0.47			O1 0.50
4	0.7540	C4 0.96	3''	0.7534	O2 0.84
		C5 0.07			C4 0.10
		C3 -0.06			C15 0.08
		C6 0.05			
TS3'-11	0.7643	C4 0.62	TS3'-4''	0.7574	C4 0.52
		O2 0.40			O2 0.54
		C3 -0.08			
4'	0.7539	C4 1.00	4''	0.7541	C4 0.99
		C5 -0.08			C5 -0.08
		C6 0.06			C3 -0.05
		Hc4 -0.05			C6 0.06
					O2 0.06
TS4'-5	0.7666	Ho2 0.77	TS4'-7	0.7597	C4 0.29
		O4 0.36			O2 0.74
		O2 0.11			
11	0.7537	C4 1.05	11'	0.7536	C4 1.02
		C5 -0.08			C5 -0.07
		Hc4 -0.05			Hc5 0.06
		Hc5 0.06			
TS11'-12	0.7604	H 0.62	TS3'-13	0.7632	O2 0.44
		C4 0.39			O9 0.43
		O1 -0.06			C3 -0.10
					C7 0.05
					Hc3 0.06
13	0.7560	O9 0.54	TS13-14	0.7751	O9 0.49
		C7 0.23			O13 0.43
		O1 0.09			O14 0.23
		Hc8 0.09			C8 -0.14
					C12 -0.06
14	0.7560	O14 0.57	16	0.7539	O1 0.79
		O13 0.48			C10 0.07
		C12 -0.08			C6 0.11
TS16-17	0.7570	O1 0.54	17	0.7527	C8 0.84
		C8 0.25			O9 0.06
		C10 0.06			O13 0.05
		O13 0.06			
TS17-15	0.7635	Ho9 0.75	TS13-18	0.7563	O9 0.58
		C8 0.32			C7 0.24
		O9 -0.11			C8 0.09
		C7 0.83			O8 0.47
18	0.7535	C6 -0.06	TS18-17	0.7560	C8 0.34
		O1 0.07			O13 0.05
		Hc6 0.05			
		Hc10 0.06			

Table 2

Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to **1** plus an H atom

	E	E_{rel}
1+H	-961.408491	0.00
TS1-2	-961.400435	5.06
2	-961.540628	-82.92
2'	-961.540208	-82.65
TS1-3	-961.401837	4.18
3	-961.532598	-77.88
3'	-961.544363	-85.26
TS2'-3'	-961.530139	-76.32

expected. At **TS3'-11**, a larger spin density is found on C4 than on O2 and hence this TS has a late character. Finally, at **11** the unpaired electron is found on C4.

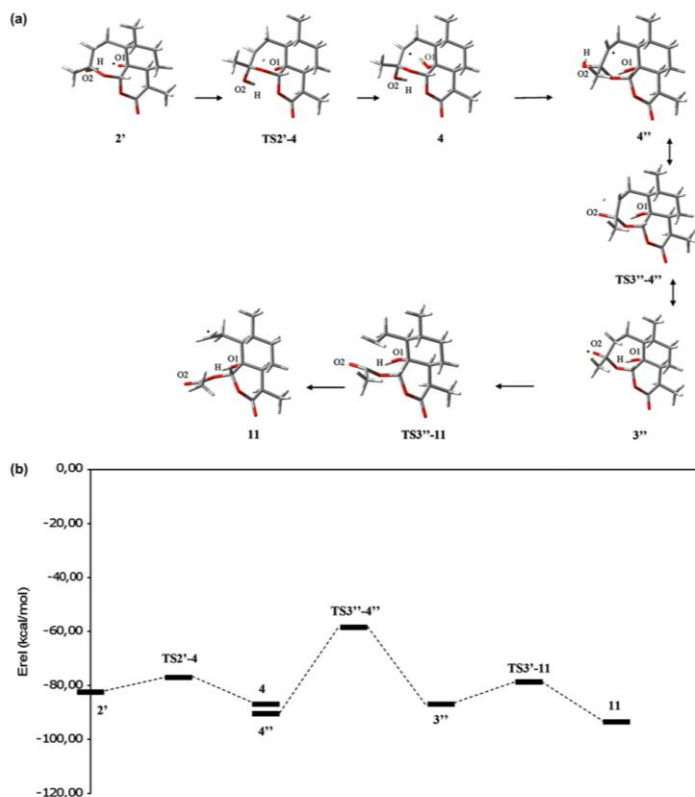


Figure 2. (a) Stationary points **2'**, **4**, **4''**, **3''**, **11**, **TS2'-4**, **TS3''-11**, and **TS3''-4''**. (b) Energy profiles for the steps leading from **2'** to **4**, from **3''** to **11**, and from **3''** to **4''** at B3LYP level.

In Figure 2a, the stationary points **2'**, **4**, **4''**, **3''**, and **11**, as well as **TS2'-4**, **TS3''-11**, and **TS3''-4''**, are depicted. The energetic values of these species are reported in Table 3 and the corresponding energy profiles are presented in Figure 2b. It can be seen that the carbon-centered radicals are more stable than the corresponding oxygen-centered radicals, as expected. The whole process from **1** to either **4** or **11** is found to be highly exothermic, thus giving support to the

proposed C-centered radical formation. The species **11** is found to be the most stable structure within these initial steps, and hence it seems again that the O2 radical route can be thermodynamically favored, at least until the C-radicals are formed. Interestingly, it has been found that this species alkylate heme in infected mice and this alkylation process is possibly the only malarial-parasite relevant fully characterized alkylation reaction reported to date.^{15,24}

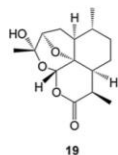
Within the context of our calculations, a second link between the two radical routes studied has been found, via **TS3''-4''**. In such TS, a hydrogen transfer from O2 to C4 connects the carbon-centered radical **4''** with the oxygen-centered radical **3''**. However, the significance to the actual system of this transition structure has to be put into jeopardy, because **4''** species obtained from **3''** would not model **4f** species appearing in Scheme 2: the Fe atom would remain bonded to O1 and a hydrogen atom would replace the Fe linked to O2 in **4f**. Also, **3''** species obtained from **4''** would not model **3f**, because the Fe atom would remain linked to O2 and a hydrogen atom would replace the Fe linked to O1 in **3f**. Hence, if this transition structure did exist in the actual system, new pathways rarely proposed in the literature would be opened, giving rise to products

Table 3
Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to **1** plus an H atom

	E	E_{rel}
2'	-961.540208	-82,65
TS2'-4	-961.531302	-77,07
4	-961.547214	-87,05
4''	-961.552871	-90,60
3''	-961.547299	-87,10
TS3''-11	-961.533968	-78,74
11	-961.557871	-93,74
TS3''-4''	-961.501805	-58,56

9454

P. Moles et al. / Tetrahedron 64 (2008) 9448–9463



Scheme 4.

like **19**, see Scheme 4. In fact, the species **19** has recently been proposed to contribute to similar yields of O1 and O2 radical routes.⁵³ Transition state **TS3'-4'** shows its radical character partitioned between C4 and O2, and no significant spin density is found on the H atom being transferred, see Table 1.

The imaginary frequencies, the negative eigenvalues, and the main components of the TVs for **TS2'-4**, **TS3'-11** and **TS3'-4'** are

reported as Supplementary data. The TSs are associated to the expected atom motions.

3.3. The obtention of **6**

A two-step pathway has been proposed in the literature to obtain **6**, one of the major products experimentally obtained in the artemisinin decomposition, once the C4 secondary radical **4f** (see Scheme 2) has been reached. In the first step, the Fe(II) ion is released to obtain the epoxide species **5**, identified as a minor component in the products' mixture in some artemisinin cleavage experiments. Then, the epoxide opening concerted with the lactone ring closure and the H migration from O1 to O2 gives rise to the product **6**. We have theoretically modeled this pathway (Fig. 3a) via **TS4'-5** that leads to the epoxide intermediate **5**, and then, through **TS5-6** that describes the lactone closure and H_{O1} migration, **6** is finally obtained. It is worth noting that the H_{O2} that is eliminated in

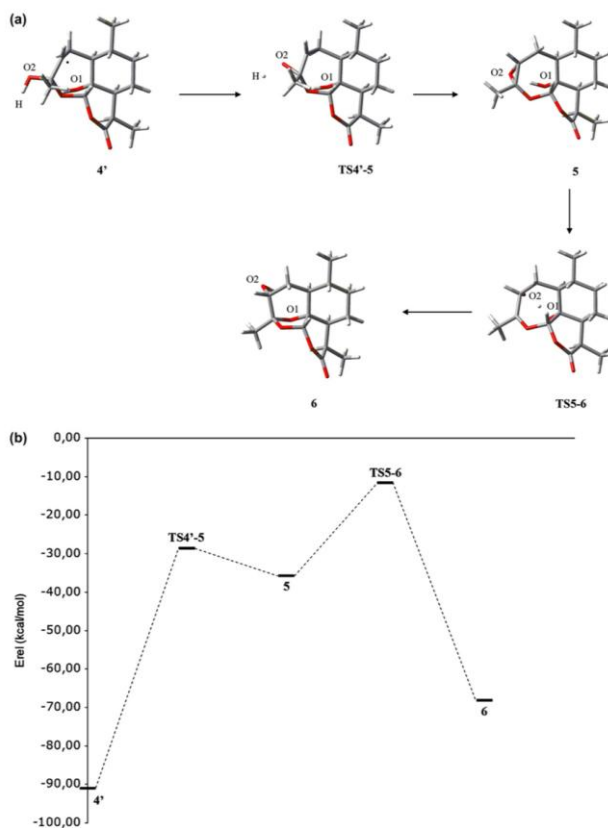


Figure 3. (a) Stationary points **4'**, **5**, **6**, **TS4'-5**, and **TS5-6**. (b) Energy profiles for the steps leading from **4'** to **6** at B3LYP level.

Table 4

Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to **1** plus an H atom

	E	E_{rel}
4'	-961.553667	-91.10
TS4'-5	-961.454216	-28.69
5+H	-961.465570	-35.82
TS5-6+H	-961.426899	-11.55
6+H	-961.517238	-68.24

the first step from the model molecule is the H atom that had entered at O2 in the first step of the global process, and hence it represents the Fe(II) ion in the actual system.

The energetics of the calculated steps are reported in Table 4 (B3LYP results) and in Supplementary data (HF results), and the obtained profiles are depicted in Figure 3b. The epoxide intermediate plus an H atom were found to be ca. 55 kcal/mol

(62 kcal/mol with HF) more unstable than the secondary radical **4'**. Hence, although the energy value for the epoxide species still lies under the starting reactants (**1** plus an H atom) energy, and its formation is an exothermic process, other pathways nonrequiring the epoxide formation would be preferred within the artemisinin decomposition process.

These results suggest that the epoxide intermediate would not probably be responsible of the antimalarial activity, because the C-centered and even the O-centered radicals are found to be more stable species. This observation is in agreement with the recent work by Taranto et al.⁴⁵ and confirms our previous results.⁴⁸

The main components of the TV associated to **TS4'-5** and **TS5-6**, as well as the imaginary frequency values and selected geometric parameters are reported as Supplementary data. The fluctuation pattern obtained describes in the first case the breaking of the O2-H₂O bond and the O2-C4 closure. These two motions participate antisymmetrically in the TV. On the other hand, the TV

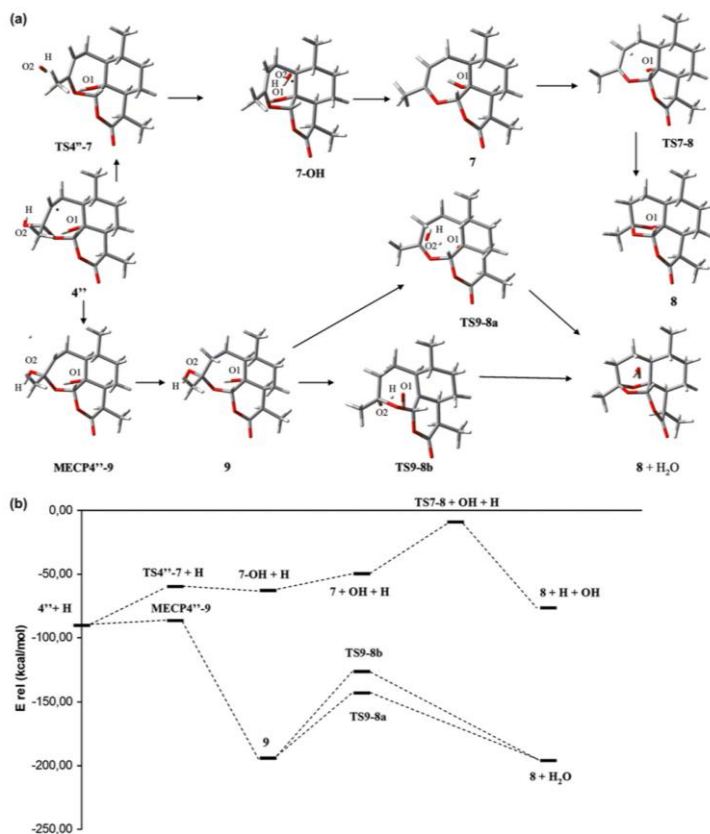


Figure 4. (a) Stationary points **4'**, **7**, **7-OH**, **8**, **9**, **TS4'-7**, **TS7-8**, **MECP4'-9**, **TS9-8a**, and **TS9-8b**. (b.) Energy profiles for the steps leading from **4'** to **8** at B3LYP level.

associated to the **TSS-6** shows a large number of components associated to the process, with the H_{O1} motion from O1 to O2 as the main one, especially at the B3LYP level, with a very important participation of the $H_{C4-C4-C3-O9}$ dihedral angle. Although the particular TV component values depend on the coordinates defined, it is concluded that a large portion of the molecule participates in the epoxide opening and the final ring closure to yield **6**.

The spin density at **TS4'-5** concentrates at H_{O2} and, to a lower extent, at C4 (see Table 1), with a small delocalization to O2.

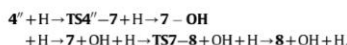
3.4. The obtention of **8**

As can be seen in Scheme 2, two alternative paths were proposed starting from **4f** to account for the outcome of **8**. The first one begins with the C3–O2 scission with $O=Fe(IV)$ release to yield the alkene **7** that can be rearranged to render **8**. The second one starts with a hydrogen abstraction from the media to render **9f**, which, via the consecutive OFe^+ elimination and deprotonation, finally gives **8**. To model the first proposed alternative, we have obtained **TS4'-7**, which accounts for an OH elimination representing the $O=Fe(IV)$ release (see Fig. 4a). Subsequently, the alkene intermediate can be rearranged to **8** via **TS7-8**.

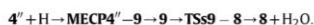
However, as it was the case in our previous report,⁴⁸ we were not able to obtain a TS connecting the secondary C4 radical with **9**. In the same way that we described in that paper, we have taken into account that the C4 radical plus a hydrogen atom is a system with a global triplet multiplicity, while **9** is a singlet. Thus, we have conducted a search for the Minimum Energy Crossing Point (MECP) between the triplet and singlet hypersurfaces in the vicinities of the structures of interest by means of the Harvey algorithm. Such procedure minimizes a generalized gradient obtained from the combination of the energies and gradients of the two potential energy surfaces that cross each other.⁵⁴ In such a way, we have found the MECP reported in Figure 4a. From this MECP, an optimization in triplet state (without the hydrogen atom) yields **4'**, while an optimization in the singlet state renders **9**. From this structure, via two alternative TSs describing the water elimination coupled with the ring closure (cf. **TS9-8a** and **TS9-8b**), we obtained finally **8** plus a water molecule. It is worth noting that within our model we could not substantiate the intermediation of a species modeling **10** (see Scheme 2). Instead, **9** to **8** conversion has been described as a single step with two alternatives depending on which oxygen is eliminated from the system to form the water molecule (see Scheme 3). These two alternative steps model the $Fe(III)OH$ release to give the final product **8**.

The energetic values are reported in Table 5, and in Figure 4b, the energetic profiles obtained for these pathways are depicted. The two calculated pathways linking **4'** with **8** are not equivalent within our model, because the first pathway connects **4'** with **8**

plus a hydroxyl radical, while the second one corresponds to the process from **4'** plus a hydrogen radical abstracted from the media to give **8** plus a water molecule. To make possible the comparison among the energetic values of these structures, we have added a spectator hydrogen radical to the first pathway. In such a way, the two sequences would begin at the same point and comparisons can be done. The first sequence would be as follows:



The second sequence would be:



The relative energies have been calculated with respect to **1** plus two hydrogen atoms.

If there is a source of H in the medium the second path is found to be preferable, because the obtention of **9f** (modeled by the species **9** in our calculations) implies a new C–H bond formation that provides a huge stabilization to the system. The final passage from **9** to **8** plus a water molecule, via the two competitive TSs, is found to be slightly exothermic. On the other hand, if there is not a source of H in the medium, the first route provides a path for the outcome of **8**, one of the experimentally detected products in the artemisinin decomposition. This path implies the OH elimination from the model molecule **4'**, and our calculations predict a slight destabilization (by ca. 14 kcal/mol) of the system when going from **4'** to **8** plus the OH radical. It must be noted that we have not explored further processes in which the OH radical, representing the $O=Fe(IV)$, released from the system could be involved. In any case, the existence of two alternative mechanisms assures that **8** will be reached, as it is observed experimentally.

The main components of the TVs are reported as Supplementary data. The **TS4'-7** describes the OH release from the molecule, coupled with the C3–C4 double bond formation. At B3LYP, a hydrogen bond complex (**7-OH**) between the leaving OH and the O1 atom was found in the path from the TS to **7**. The distance between O1 and the leaving OH is 1.86 Å. After this complex is found, the departure of the OH radical gives raise to the separate species **7** and OH, with an energy increase of 13.18 kcal/mol. The **TS7-8** shows a global fluctuation of the molecule, which is being rearranged to the bicyclic structure **8**. The fluctuations at **TS9-8a** and **TS9-8b** are not limited to a particular fragment, but almost all the atoms in the molecule participate with its motions to H_2O leaving to reach **8**.

As can be seen in Table 1, the spin density at **TS4'-7** is mainly located at O2, with some delocalization to C4.

3.5. The obtention of **12**

The obtention of **12** was proposed to take place starting from the C4 primary radical **11f**, via a one-step path. The species **12** is another of the major products experimentally obtained in the artemisinin decomposition (see Scheme 2). In this step, the $Fe(II)$ ion is released.

We have modeled this pathway (see Fig. 5a) via the **TS11'-12**. The local minimum obtained following the IRC path on the reactant side from the TS, **11'**, has a conformation slightly different from that of **11**, and is favored by ca. 5 kcal/mol. The **TS11'-12** describes the H (representing $Fe(II)$ ion) release from O1 and the coupled closure of the furan ring. The energetic values of the calculated steps are detailed in Table 6 and depicted in Figure 5b.

The radicals **11** and **11'** present a similar spin density distribution (see Table 1), with the unpaired electron localized at C4. At **TS11'-12**, the spin density appears on H and C4, with a very minor participation of O1.

Table 5
Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to **1** plus two H atoms

	E	E_{rel}
4' +H	-962.053144	-90.60
TS4'-7 +H	-962.004134	-59.85
7-OH +H	-962.009122	-62.98
7-OH +H	961.988133	-49.80
TS7-8 +OH+H	-961.923471	-9.23
8-OH +H	-962.031122	-76.78
MECP4'-9	-962.047071	-86.79
9	-962.219137	-194.76
TS9-8a	-962.137151	-143.32
TS9-8b	-962.110240	-126.43
8 +H ₂ O	-962.222104	-196.62

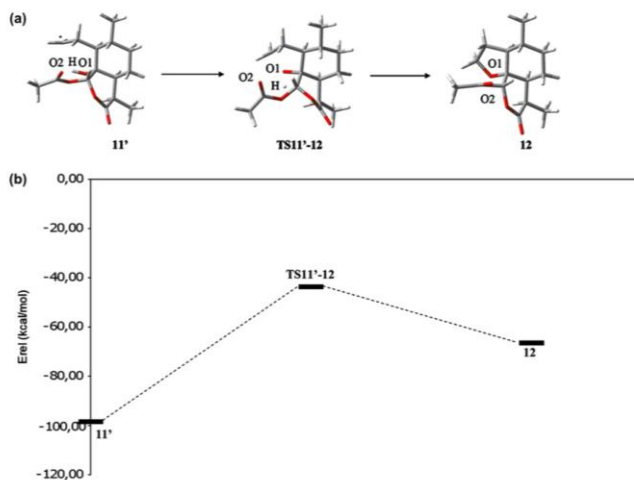


Figure 5. (a) Stationary points **11***, **12**, and **TS11*-12**. (b) Energy profiles for the steps leading from **11*** to **12** at B3LYP level.

Table 6

Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to **1** plus an H atom

	E	E_{rel}
11*	-961.565762	-98,69
TS11*-12	-961.478144	-43,71
12+H	-961.514588	-66,58

3.6. The obtention of **14**

If a C3–O9 scission takes place at the **3f** radical, the O9 radical **13f** would be obtained (see Scheme 2). Such species would be the intermediate to explain the appearance of **15** and other products derived either from **15** itself or from the oxygen-radical **14f**. Although these species are not the main products observed in the experimental artemisinin decomposition studies, they have been sometimes detected.⁵⁵

The obtaining of **13f** from **3f** has been modeled to occur through **TS3'-13**. In Figure 6a, the structures of **3'**, **TS3'-13**, and **13** are presented. The energy values are reported in Table 7 and the energy profiles are depicted in Figure 6b. The barrier height is quite low and thus this step would be a competitive pathway inside the O2 radical route. The breaking of the O13–C8 bond at **13**, via **TS13-14**, would render the O radical **14**.

At **TS3'-13**, the spin density can be found partitioned between O2 and O9 (see Table 1), with some negative participation of C3. At **13**, the unpaired electron is located on O9 and, to a lesser extent, on C7. Thereafter, at **TS13-14**, a strong delocalization of the unpaired electron is found, and the spin density is widespread mainly on O9, O13, and O14. Finally, at **14**, the unpaired electron is delocalized between O13 and O14.

Transition state **TS3'-13** is clearly associated to the opening of the ring, see Supplementary data, with a significant participation of O2–C3 bond that evolves to a double bond in **13**, and angles and dihedrals related with the ring opening. The main component in the TV associated to **TS13-14** is the O13–C8 bond distance, because

this bond is being broken, and some angles and dihedrals are found to participate also in the TV.

3.7. The obtention of **15**

To obtain **15**, another pathway has been proposed starting from **13f**: a C7–C8 scission with Fe(II) release would render the final species **15** and derived products (see Scheme 2). However, we have found that this pathway is not a single step. Instead, two alternative paths have been calculated starting from **13** and ending up at **15** (see Scheme 3): the first one would start with the C7–C8 breaking (via **TS13-18**) to render the C7 radical **18**, which in turn would suffer an intramolecular hydrogen transfer between O1 and O9 through **TS18-17**, yielding the C8 radical **17**. It is worth noting that the H motion from O1 to O9 represents the Fe(III) motion in the actual system.

The second one would start with the H migration from O1 to O9 through the **TS13-16**, yielding the O1 radical **16**. Thereafter, the C7–C8 bond breaking would take place, via **TS16-17**, and in this way **17** can be obtained again. This second alternative was not completely characterized by using the B3LYP/6-31G(d,p) calculation level, because all efforts to find the **TS13-16** were unsuccessful at this level, although it was easily obtained at HF/3-21G. Instead, different conformers of **TS18-17** were found, thereby suggesting that the C7–C8 breaking precedes the hydrogen shift from O1 to O9. Transition state **TS16-17** has also been obtained by using the B3LYP approach and it is reported for the sake of completeness. Finally, once **17** has been reached, the H release from O9 via **TS17-15**, representing the Fe(II) departure, would give the final product **15**.

The aforementioned structures are depicted in Figure 7a, and the corresponding energies are reported in Table 8 and drawn in Figure 7b. The pathway through **18** is preferred, according to the B3LYP results. As for the HF/3-21G calculations, although the profiles obtained are slightly different, this trend is maintained. In any case, at the two theoretical levels the highest point in the energy

9458

P. Moles et al. / Tetrahedron 64 (2008) 9448–9463

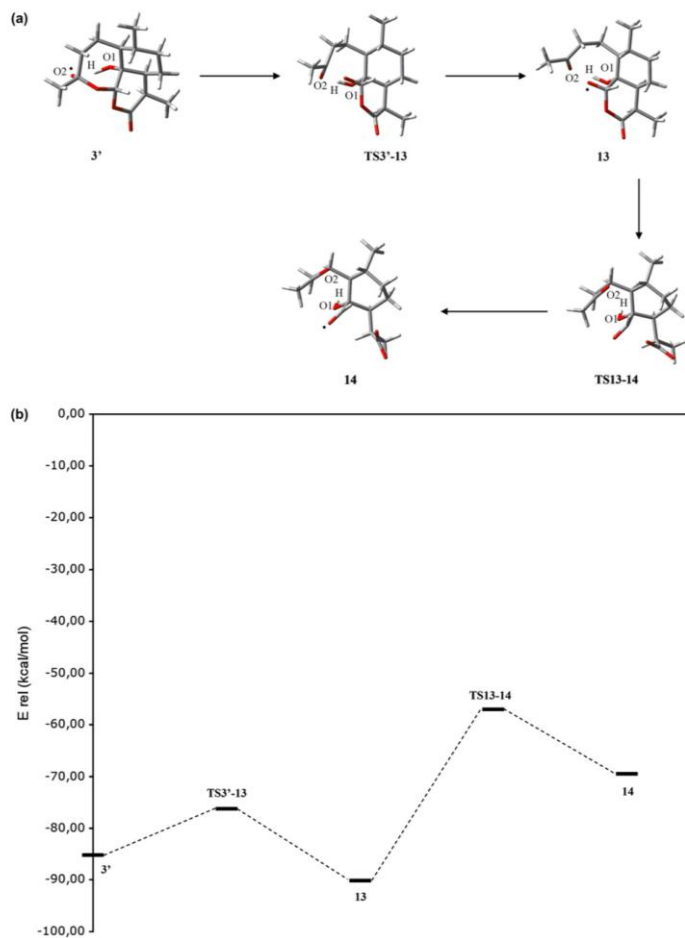


Figure 6. (a) Stationary points $3'$, 13 , 14 , $TS3'-13$, and $TS13-14$. (b) Energy profiles for the steps leading from $3'$ to 14 at B3LYP level.

profiles is found to be $TS17-15$, and hence if 15 is to be reached, the two pathways could compete if a connection do exists between 13 and 16 .

The results in Table 1 show that at 16 the unpaired electron is found at O1, as expected, and at 17 the spin density is found at C8. Transition state $TS16-17$ shows an early character, because the unpaired electron is mainly localized at O1, with a lower value of the spin density on C8. At $TS17-15$, the unpaired electron moves to H_{O9} that will be released as a hydrogen atom in our model system.

The second pathway from 13 begins with $TS13-18$, in which the unpaired electron is partitioned between O9 and, to a lesser extent, C7. At 18 , the spin density is found at C7, as expected, and $TS18-17$

Table 7
Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to 1 plus an H atom

	E	E_{rel}
$3'$	-961.544363	-85.26
$TS3'-13$	-961.530088	-76.30
13	-961.552274	-90.23
$TS13-14$	-961.499512	-57.12
14	-961.519356	-69.57

shows a delocalization of the unpaired electron between C7 and C8, with no remarkable spin density found on O9, O1, or the H being transferred.

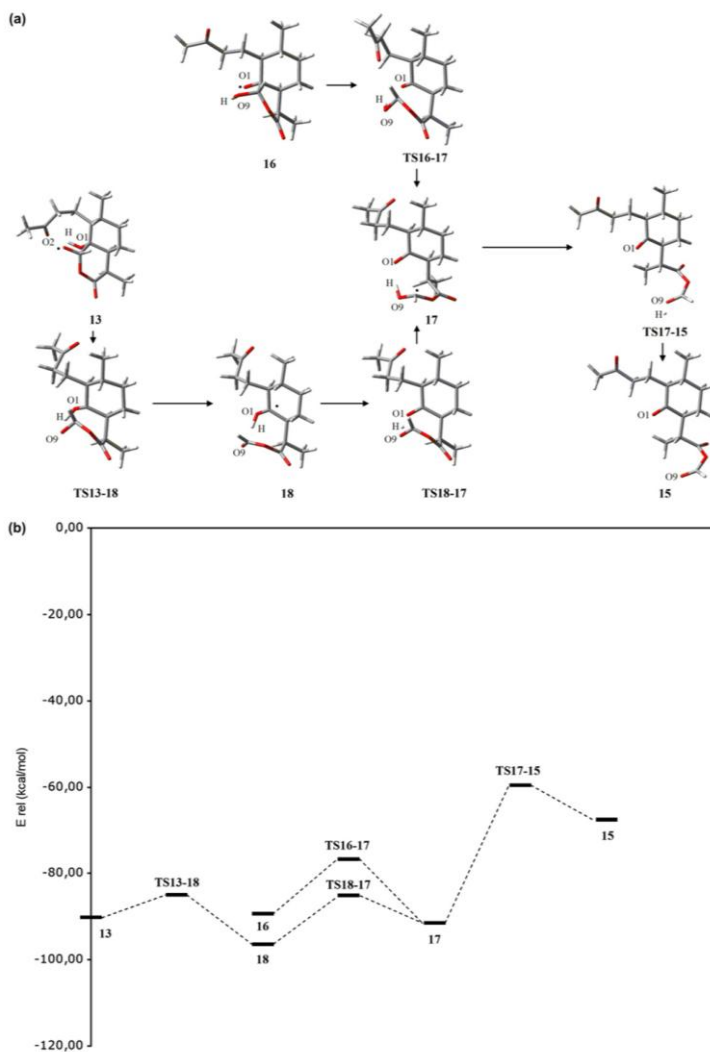


Figure 7. (a) Stationary points **13**, **16**, **17**, **18**, **15**, **TS16-17**, **TS17-15**, **TS13-18**, and **TS18-17**. (b) Energy profiles for the steps leading from **13** to **15** at B3LYP level.

3.8. The whole set of mechanisms

To obtain a global view of the processes studied, it is very convenient to assemble the fragments. In Figure 8a, the energy profile for the O1 radical route is drawn. Starting from **1**, the pathways

obtained by using the B3LYP/6-31G(d,p) theoretical level up to the products **6** and **8** are presented. This view reveals that the two final products are very close in energy to each other, being **8** more stable than **6**, the energetic difference being ca. 8 kcal/mol. The same can be said about the transition structures of maximum energy in the

9460

P. Moles et al. / Tetrahedron 64 (2008) 9448–9463

Table 8

Energy values (E , hartree/particle) for the indicated stationary points obtained at B3LYP level. Relative energies (E_{rel} , kcal/mol) to **1** plus an H atom

	E	E_{rel}
13	-961.552274	-90.23
TS13-18	-961.543958	-85.01
18	-961.562372	-96.56
TS18-17	-961.544289	-85.21
17	-961.554388	-91.55
TS17-15	-961.503644	-59.71
15+H	-961.516142	-67.55
16	-961.550929	-89.38
TS16-17	-961.530890	-76.81

pathways of minimum energy connecting the carbon-centered radicals **4** to each one of the products, cf. **TS5-6** and **TS7-8** for the routes to **6** and **8**, respectively. It is also interesting to note that all points in the reported routes lie under the energy value of the initial **TS1-2**, thus assuring the products' formation if the reaction

is initiated. The competition between the paths yielding **6** and **8** will be resolved mainly as a function of the experimental conditions, thus explaining the different yields observed in the different experimental studies of artemisinin decomposition. We have not included in Figure 8a, the path from **4'** plus a hydrogen atom to **8** plus a water molecule: as stated before, such a path would be preferred only in the case that a hydrogen atom source was found in the medium.

In Figure 8b, the energy profile for the O2 radical route is drawn. In this case, starting from **1**, the pathways yielding the final products **12** and **15** are reported. It must be said that **14** is not a final product, but a radical that would further evolve to other species not studied here, see Scheme 2. It is revealed again that the two products are very close in energy to each other, being **15** more stable than **12** by only ca. 1 kcal/mol. In this case, however, there is a slightly larger difference between the energies of the transition structures of maximum energy in the pathways of minimum energy connecting the reactants to each one of the products, cf.

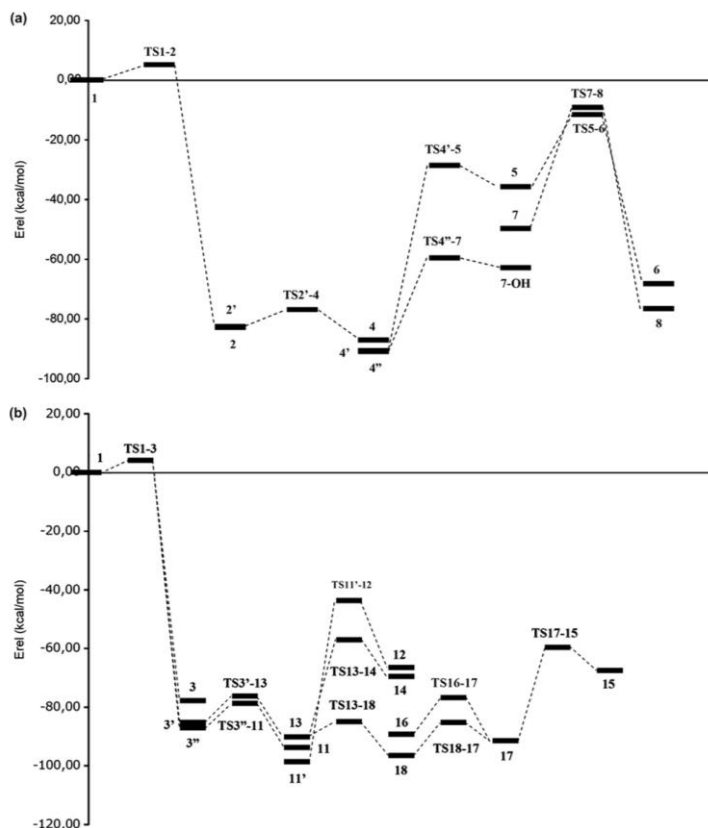


Figure 8. (a) Energy profiles for the O1 radical route, calculated at B3LYP/6-31 G(d,p) level. (b) Energy profiles for the O2 radical route, calculated at B3LYP/6-31 G(d,p) level.

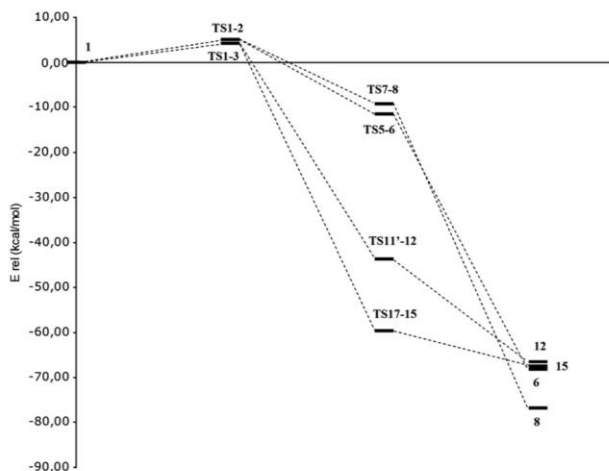


Figure 9. Comparative energies of the reactants, the initial TSs, the TSs of highest energy found along the minimum energy pathways studied, and the species modeling the experimentally obtained products, as calculated by means of B3LYP/6-31G(d,p) theoretical level.

TS11'–12 and **TS17–15** for the routes to **12** and **15**, respectively. All points in the reported routes lie again under the energy value of the initial **TS1–3**, and the products formation and the competition between the paths would take place as before. These results fairly reproduce our previously obtained conclusions.⁴⁸

The aforementioned observations are even clearer in **Figure 9**, in which only the starting reactants, the initial TSs, the TSs of maximum energy along the minimum energy O1 and O2 radical routes, and the final products are sketched. From this figure it can be seen that the products **12** and **15** are predicted to be formed in an easier way, and that the formation of **8** and **6** is also straightforward once the reaction is initiated, because the highest point to surmount is the initial TS for all cases. It can also be appreciated that the four final products lie very close in energy to each other, being **8** the more stable one and **12** the less stable one, and the energetic difference between them being of only ca. 10 kcal/mol. According to the results herein reported, if the solvent used is not very polar, and therefore has a passive role, it is expected to obtain **8** as the major product, as it is indeed found.⁵² In this sense, our calculations nicely explain the experimental results.

4. Conclusions

The results reported in the present work explain the appearance of the final products in a satisfactory way. The intermediates and radicals have been found as relatively stable species, thus giving support to the current hypothesis that some of such species can be responsible for the antimalarial action of artemisinin and its derivatives, either by hitting specific targets within the parasite or by disrupting the hemozoin polymerization process and causing in this way the *plasmodium* death. Some specific conclusions can also be derived from this work:

(a) The products' formation is assured once the reaction is initiated, and the different paths will compete depending on the experimental conditions.

(b) We have confirmed that a TS do exist modeling the interconversion between the initial O-centered radicals, showing that the O1 and O2 radical routes are intimately related.

(c) A possible second link between the two radical routes has been found, via **TS3'–4'**. If this transition structure did exist in the actual system, new pathways rarely proposed in the literature would be opened, giving rise to products other than the ones usually characterized. To establish the relevance of this finding, or discarding it as an artifact of the molecular model used, further experimental and theoretical works are needed.

(d) In agreement with recent work⁴⁵ and with our previous paper,⁴⁸ it is concluded that the epoxide intermediate is probably not responsible of the antimalarial activity, because other intermediates are found to be more stable and potentially more active as alkylating agents.

(e) The obtaining of **15** involves three different steps from the oxygen-centered radical **13**, instead of a single step as it was originally suggested.

(f) From the C4 secondary radical **4**, the outcome of **8**, one of the experimentally detected products in the artemisinin decomposition, can take place through the alkene intermediate **7** or via the intermolecular H abstraction from the medium to form the intermediate **9**. If there is a source of H, the second path is found to be preferable and the existence of two alternative mechanisms assures that **8** will be reached, as it is observed experimentally. The formation of **8** from **9** is carried out by means of a concerted step; it does not take place through a two-step mechanism as it was postulated.

(g) One of the stationary points (**TS13–16**) was found at HF/3-21G level, but not by using the B3LYP/6-31G(d,p) calculations. This fact could suggest that actually only one of the paths herein studied connecting **13** with **18** takes place.

(h) The C4 primary radical **11** is found to be the most stable structure within the initial steps of the artemisinin decomposition and hence the O2 radical route is calculated to be thermodynamically favored until the C-radicals are formed.

9462

P. Moles et al. / Tetrahedron 64 (2008) 9448–9463

This agrees with the in vivo experiments in that the only fully characterized alkylation reaction reported to date in infected mice is the heme alkylation by means of the C4 primary radical.^{15,24}

The work herein reported was conducted with the aim of reinforcing, or changing if this was the case, the conclusions reached in our previous paper.⁴⁸ In that report, we used a relatively simple molecular model and doubts could be raised upon the accuracy of the model, because the rings close to the trioxane moiety were not included. As can be seen in the present work, we have essentially reproduced the same mechanistic steps obtained in the previous study, and either from a qualitative or from a quantitative point of view the conclusions reached remains unchanged. These are good news when facing further studies demanding harder computing power: the inclusion in the molecular model of the Fe(II) ion that initiates the cascade of reactions from the artemisinin to the final products can be done with confidence by using the simplest model. Also, the inclusion of the solvent effects that can be determinant in discriminating between the possible pathways can take benefit from using the small model. The way by which the potentially antimalarial intermediates hit the putative targets can also be studied with the simple model previously used. Our group is conducting these studies and the results obtained will hopefully be reported in due form, with the ultimate aim of contributing to a better understanding of the antimalarial activity of artemisinin and its derivatives.

Acknowledgements

Financial support by the Generalitat Valenciana (Project GV04B-029) and Fundació Bancaixa-UJI (P1 1B2005-15 and P1 1B2005-27) is gratefully acknowledged. P.M. acknowledges the Generalitat Valenciana for the grant TS/05/UJI/02 and the Universitat Jaume I for the grant PREDOC/2005/28.

Supplementary data

Tables containing total and relative energy values (at HF/3-21G level) for the stationary points leading: from **1** to **2'** and **3'** (Table 15); from **2'** to **4'** and from **3'** to **11**, as well as **TS3''-4'** (Table 45); from **4'** to **6** (Table 75); from **4'** to **8** (Table 105); from **11'** to **12** (Table 135); from **3'** to **14** (Table 165); from **13** to **15** (Table 195).

Tables containing imaginary frequencies, unique negative eigenvalues, and main components of the transition vectors and the corresponding geometric parameters for the following TSs, obtained at B3LYP/6-31G(d,p) and HF/3-21G levels: **TS1-2**, **TS1-3**, and **TS2'-3'** (Tables 25 and 35); **TS2'-4'**, **TS3''-11** and **TS3''-4'** (Tables 55 and 65); **TS4'-5** and **TS5-6** (Tables 85 and 95); **TS4'-7**, **TS7-8**, **TS9-8a** and **TS9-8b** (Tables 115 and 125); **TS11'-12** (Tables 145 and 155); **TS3'-13** and **TS13-14** (Tables 175 and 185); **TS13-18**, **TS18-17**, **TS17-15**, **TS13-16** (only at HF/3-21G level) and **TS16-17** (Tables 205 and 215).

This material is available free of charge via Internet. Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.tet.2008.07.086.

References and notes

- Haynes, R. K.; Ho, W.-Y.; Chan, H.-W.; Fugmann, B.; Stetter, J.; Croft, S. L.; Vivas, L.; Peters, W.; Robinson, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1381–1385.
- Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Dascombe, M. J.; Ismail, F. M. D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6065–6073.
- McMichael, A. J.; Woodruff, R. E.; Hales, S. *Lancet* **2006**, *367*, 859–869.
- Tonmunphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2082–2088.
- O'Neill, P. M.; Posner, G. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945–2964.
- Posner, G. H.; O'Neill, P. M. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 397–404.
- Meshnick, S. R.; Taylor, T. E.; Kamchonwongpaisan, S. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 301–315.
- Pinheiro, J. C.; Kiralji, R.; Ferreira, M. C. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 830–842.
- Krishna, S.; Woodrow, C.; Staines, H. M.; Haynes, R. K.; Mercerau-Pujalon, O. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 200–205.
- White, N. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1084–1092.
- Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 9364–9369.
- Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. d. M.; de Oliveira, F. G.; de Araujo, M. T.; Correa, C. R. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2002**, *580*, 207–215.
- Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 167–174.
- Robert, A.; Benoit-Vical, F.; Claparois, C.; Meunier, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13676–13680.
- Tang, Y.; Dong, Y.; Wang, X.; Sriraghavan, K.; Wood, J. K.; Vennerstrom, J. L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5103–5110.
- Messori, L.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Siragusa, M.; Vincieri, F. F.; Bilia, A. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2972–2977.
- Golenser, J.; Waknine, J. H.; Krugliak, M.; Hunt, N. H.; Grau, G. E. *Int. J. Parasitol.* **2006**, *36*, 1427–1441.
- Meshnick, S. R.; Thomas, A.; Ranz, A.; Xu, C. M.; Pan, H. Z. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, *49*, 181–190.
- Posner, G. H.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8328–8329.
- Wu, Y. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 255–259.
- Butler, A. R.; Gilbert, B. C.; Hulme, P.; Irvine, L. R.; Renton, L.; Whitwood, A. C. *Free Radic. Res.* **1998**, *28*, 471–476.
- Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3316–3325.
- O'Neill, P. M.; Bishop, L. P.; Searle, N. L.; Maggs, J. L.; Ward, S. A.; Park, B. K.; Mabbs, F. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1578–1582.
- Robert, A.; Bonduelle, C.; Laurent, S. A.-L.; Meunier, B. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 562–569.
- Kannan, R.; Kumar, K.; Sahal, D.; Kukreti, S.; Chauhan, V. S. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 409–418.
- Zhang, F.; Gosser, D. K.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1805–1809.
- Robert, A.; Meunier, B. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 273–279.
- Robert, A.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1954–1957.
- Cazelles, J.; Robert, A.; Meunier, B. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 609–619.
- Olliaro, P.; Haynes, R. K.; Meunier, B.; Yongyuth, Y. *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 123–126.
- Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. *Nature* **2003**, *424*, 957–961.
- Ridley, R. G. *Nature* **2003**, *424*, 887–889.
- Haynes, R. K.; Monti, D.; Taramelli, D.; Basilio, N.; Parapini, S.; Olliaro, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1175.
- Yang, Y. Z.; Asawamahsakda, W.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 336–339.
- Yang, Y. Z.; Little, B.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 569–573.
- Asawamahsakda, W.; Ittarat, I.; Pu, Y. M.; Ziffer, H.; Meshnick, S. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1854–1858.
- Bhisutthibhan, J.; Philbert, M. A.; Fujioka, H.; Aikawa, M.; Meshnick, S. R. *Eur. J. Cell Biol.* **1994**, *78*, 665–670.
- Pandey, A. V.; Tekwani, B. L.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19383–19388.
- Bhisutthibhan, J.; Meshnick, S. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2397–2399.
- Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Posner, G. H. *Adv. Pharmacol.* **1996**, *37*, 253–297.
- Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Ismail, F. M. D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2004**, *711*, 95–105.
- Tonmunphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, *724*, 99–105.
- Wiwanitkit, V. *Infect.* **2006**, *35*, 148–151.
- Aranes, C.; de Araujo, M. J.; Taranto, A. G.; de Carneiro, J. W. *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *103*, 749–762.
- Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. d. M.; de Araujo, M. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1546–1557.
- de Araujo, M. J.; de Carneiro, J. W.; Taranto, A. G. *Int. J. Quant. Chem.* **2006**, *106*, 2804–2810.
- Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Ismail, F. M. D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, *756*, 87–95.
- Moles, P.; Oliva, M.; Safont, V. S. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 7144–7158.
- McIver, J. W. *J. Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 72–77.
- Fukui, K. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 4161–4163.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.

P. Moles et al. / *Tetrahedron* 64 (2008) 9448–9463

9463

- Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98; Gaussian*: Pittsburgh, PA, 1998.
52. Posner, G. H.; Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5885–5886.
53. Pereira, M. S. C.; Kiralj, R.; Ferreira, M. M. C. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 85–98.
54. Harvey, J. N.; Asçgi, M.; Schwarz, H.; Koch, W. *Theor. Chem. Acc.* **1998**, *99*, 95–99.
55. Avery, M. A.; Fan, P.-C.; Karle, J. M.; Bonk, J. D.; Miller, R.; Goins, D. K. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1885–1897.

A Topological Study of the Decomposition of 6,7,8-Trioxabicyclo [3.2.2] nonane Induced by Fe(II): Modeling the Artemisinin Reaction with Heme

Pamela Moles, Mónica Oliva, Ángel Sánchez-González, and Vicent S. Safont

J. Phys. Chem. B 2010, *114*, 1163-1173

A Topological Study of the Decomposition of 6,7,8-Trioxabicyclo[3.2.2]nonane Induced by Fe(II): Modeling the Artemisinin Reaction with Heme

Pamela Moles,[‡] Mónica Oliva,[‡] Ángel Sánchez-González,[‡] and Vicent S. Safont^{*†}

Departament de Química Física i Analítica, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló, Spain, and Departamento de Química Orgánica, Grupo de Modelización y Diseño Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071, Granada, Spain

Received: October 26, 2009; Revised Manuscript Received: December 1, 2009

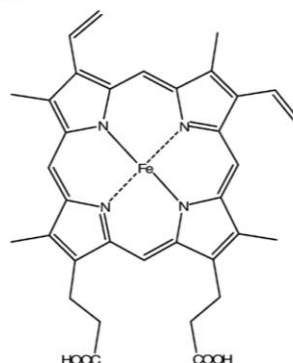
We report a theoretical study on the electronic and topological aspects of the reaction of dihydrated Fe(OH)₂ with 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane, as a model for the reaction of heme with artemisinin. A comparison is made with the reaction of dihydrated ferrous hydroxide with O₂, as a model for the heme interaction with oxygen. We found that dihydrated Fe(OH)₂ reacts more efficiently with the artemisinin model than with O₂. This result suggests that artemisinin instead of molecular oxygen would interact with heme, disrupting its detoxification process by avoiding the initial heme to hemin oxidation, and killing in this way the malaria parasite. The ELF and AIM theories provide support for such a conclusion, which further clarifies our understanding on how artemisinin acts as an antimalarial agent.

Introduction

Malaria is nowadays the most lethal parasitic disease, causing more than one million deaths yearly,^{1–4} most of them children under age 5, in more than 100 nations.^{5,6} It is caused by the members of the genus *Plasmodium* that infect humans through the bite of the female *Anopheles* mosquito. The *Plasmodium* sporozoites invade hepatocytes and develop to release merozoites, which in turn invade erythrocytes, where they grow to mature trophozoites, then to schizonts, and finally to release more merozoites that invade more erythrocytes closing the cycle.⁷ To sustain its rapid development, the malaria parasite must synthesize its own proteins, and digestion of host hemoglobin within the red blood cells serves as the major amino acids source. It is known that *Plasmodium falciparum* digests between 60% and 80% of the hemoglobin present in the infected erythrocytes.^{8,9} This process gives globin fragments that are further hydrolyzed into amino acids, and takes place in an acidic (pH 5.0–5.4) organelle within the parasite, called the food vacuole, that contains proteolytic enzymes.¹⁰

Digestion of hemoglobin within the food vacuole also releases free heme (Fe(II) protoporphyrin-IX, Scheme 1), which is toxic for the parasite due to its ability to destabilize and lyse membranes and to inhibit the activity of several enzymes.¹¹ Thus, a concomitant detoxification process of heme is necessary for the parasite to uninterruptedly grow and proliferate. It has recently been shown that at least 95% of the released free heme is detoxified by its conversion into hemozoin, the malarial pigment, which is an insoluble crystalline material.^{8,12} The hemozoin formation involves the heme oxidation to hemin (Fe(III) protoporphyrin-IX) by a mechanism that is not yet fully explored but that is presumed to involve molecular oxygen as the oxidant agent, followed by the formation of hemin dimers (β -hematin) which finally assemble to form the hemozoin crystal.⁸

SCHEME 1



Disruption of the hemozoin formation is the strategy most widely used for treating malaria.¹³ Quinoline-based antimalarials act by forming adducts with free heme resulting in the prevention of heme polymerization to nontoxic hemozoin.^{14–17}

While the malaria parasites are becoming resistant to quinoline-based antimalarial agents, such as chloroquine, and even to quinine and mefloquine,^{18,19} artemisinin (Scheme 2) remains the most potent and rapidly acting antimalarial drug against resistant strains of *Plasmodium falciparum* at hand nowadays.²⁰ Combinations of artemisinin with other antimalarial drugs are now recommended treatments for severe malaria in the most endemic areas,²¹ because such combinations might be useful in delaying the emergence of artemisinin resistance.²²

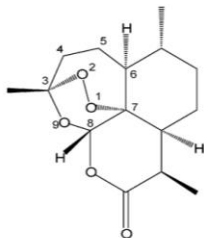
Artemisinin is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group, and its 1,2,4-trioxane ring system has been proven to be critical for the antimalarial activity.^{4,23} It has been suggested that interaction with heme produces carbon-centered radical intermediates, which can cause the parasite death.^{3,4,7,14,15,24–29} Definitive evidence for the generation of carbon radical inter-

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: safont@qfa.uji.es. Tel: 34964728085. Fax: 34964728066.

[†] Universitat Jaume I.

[‡] Universidad de Granada.

SCHEME 2



mediates during ferrous-mediated endoperoxide degradation of artemisinin and its derivatives was provided by EPR spin-trapping techniques.^{30–32} Such carbon radicals have been reported as heme alkylating agents *in vivo* in infected mice,^{24,25} disrupting in this way the heme detoxifying process and leading to the parasite death by a mechanism similar to that proposed for the quinoline-based antimalarials.^{14–17} Although some studies suggested that the activity of artemisinins does not require heme,^{33–36} it has been pointed out that these studies used iron chelators capable of chelating heme iron as well and that the claims about artemisinin's effect not requiring heme can be considered as premature.¹¹

Apart from heme, other molecular targets have been proposed for the reactive intermediates generated from artemisinin and its derivatives.^{33,37–42} Overall, the weight of evidence and the fact that resistance to the artemisinins has not yet developed suggest that the drugs do not exert their antimalarial effects by hitting a single biological target, but rather by simultaneously hitting several targets with very high precision and efficiency.^{2,34}

The decomposition mechanism of artemisinin and other trioxanes induced by Fe(II)-containing species has been the subject of several studies during the past decade. With slight modifications, the unified mechanism proposed by Cumming⁴³ and Wu³² has been generally accepted as reference framework, and a series of theoretical investigations related with the antimalarial mode of action of artemisinin have been reported.^{1,6,7,18,23,44–62}

Recently, it has been established that heme reacts with artemisinin more efficiently than hemin, inorganic iron, or hemoglobin,⁶³ although previous studies suggested that ferrous (but not ferric) hemoglobin reacts with artemisinin much faster than free heme.¹¹ In any case, these studies revealed that hemin reacts very slowly with artemisinin, and hence it can be hypothesized that once heme is oxidized to hemin, the detoxification process to hemozoin would take place even in the presence of artemisinin. Thus, the disruption of the hemozoin formation process by artemisinin must take place before the Fe(II) to Fe(III) oxidation. The possibility of artemisinin competing with molecular oxygen in the very first step of hemozoin formation has not been fully explored to date.

To gain a deeper insight into the reaction between artemisinin and heme, it is very convenient to envisage a sound analysis at the electronic level. To this end, the electron localization function (ELF), defined by Becke and Edgecombe,^{64,65} is the basis of the electron-density-based topological analysis and provides useful information on the bond structure. On the other hand, the atoms in molecules (AIM) theory explores the topology of the electron density and describes accurately the chemical concepts of atom, bond and structure.^{66,67} In the framework of this approach, bond critical points (BCP) of each

compound are located, and the electron density at these points offers quantitatively valid information on the strength and the character of the linkage.

In this paper, we report a study on electronic and topological aspects of the reaction of heme with artemisinin by using very simple molecular models. A comparison is made with the reaction of heme with molecular oxygen with the aim of testing the competitive hypothesis and to shed additional light to our current understanding of the antimalarial mode of action of artemisinin and its derivatives.

Computational Methods and Models

The aim of the present work is to focus on the interaction of Fe(II) with the endoperoxide bridge of artemisinin, and also with molecular oxygen. To this end, we have selected very simple models that allow us to reveal the electronic details of such interactions and to maintain the computational times in a reasonable range. Therefore, artemisinin has been modeled with 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane (**1f**), while heme (Fe(II) protoporphyrin-IX) has been modeled by dihydrated Fe(OH)₂ (**2f**) (Scheme 3).

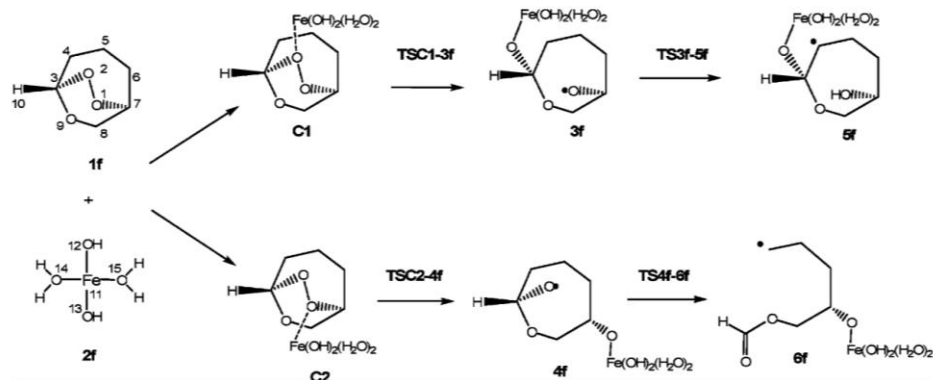
The interaction between heme and artemisinin can give rise to two oxygen-centered radicals that further evolve to carbon-centered radical species. These species have been reported as mediators for the disruption of the heme detoxifying process and the subsequent parasite death, as stated above. Hence, the study herein reported mainly deals with the electronic and topological aspects of the steps leading from the model reactants, **1f** plus **2f**, to the model carbon-centered radicals **5f** and **6f** (see Scheme 3). On the other hand, the interaction between heme and molecular oxygen has been modeled with **2f** and O₂.

The calculations have been done at the B3LYP theoretical level with the 6-311+G(d,p) basis set, using the Gaussian03 program.⁶⁸ This method includes Becke's three-parameter nonlocal hybrid exchange potential⁶⁹ and the nonlocal correlation functional of Lee, Yang, and Parr.⁷⁰ All stationary points shown in Scheme 3 have been fully optimized and characterized as minima or transition structures (TS) by means of a vibrational analysis. For the minima, all the wavenumbers are positive, while for the TS there is only one imaginary wavenumber. This imaginary frequency is associated to the transition vector (TV)⁷¹ and describes the atomic motions at TS. It can be used to trace the intrinsic reaction coordinate (IRC)⁷² pathway from each TS to its associated minima, i.e., to the *reactant* and *product* of each individual step.

Most of the species appearing along the studied steps have unpaired electrons. In these cases the unrestricted (UB3LYP) formalism has been used. We have calculated the energy of the stationary points (except **1f** and O₂) as a function of its electronic state, and we have found that the quintuplet state is the most stable electronic state in all cases except the interaction complex between **2f** and oxygen (**C3**), which is a septuplet.

The topological analysis of the gradient vector field of ELF function is a powerful tool: the exploration of its mathematical properties enables molecular space partition into core and valence basins defined by attractors in which the ELF function shows a high value. The valence basins are characterized by their synaptic order, i.e., by the number of core basins that show frontier with the valence basin. ELF ($\eta(r)$) is interpreted as a measure of the electron localization in atomic and molecular systems, as the probability of finding two paired electrons. Values above 0.5 indicate a localized character, while values below 0.5 correspond to delocalized electron density. From a

SCHEME 3



quantitative point of view, the method integrates the electron density over the basins to have the basin populations.

On the other hand, the AIM theory can be used to analyze the main characteristics of the bonds that participate in a chemical reaction, through evaluation of the properties of the corresponding BCP. The electron density ($\rho(r)$) of a BCP is related to the bond strength. To some extent, it also measures the bond multiplicity, although this analysis must be performed with care, because the density may be influenced by other phenomena. The electronic energy density ($E_d(r)$) provides information about bond stability: highly negative values involve stable bonds. The values of the Laplacian of the electron density ($\nabla^2\rho(r)$) indicate concavity or convexity depending on its negative or positive sign, respectively. Negative values of $\nabla^2\rho(r)$ indicate valence shell charge concentration regions, while positive values are found in valence shell charge depletion zones. Thus, an unshared-electron (or electrostatic) interaction is characterized by low values of $\rho(r)$ and positive values of $\nabla^2\rho(r)$ at the BCP, whereas high values of $\rho(r)$ and negative values of $\nabla^2\rho(r)$ correspond to a shared-electron (or covalent) interaction.

The AIM and ELF analyses have been carried out from the computed B3LYP/6-311+G(d,p) electron density, with the AIM2000⁷³ and TopMod⁷⁴ software packages, respectively, and the ELF isosurfaces have been visualized with the AMIRA 4.1 program.⁷⁵ The ELF isosurfaces are plotted at a value of 0.815 for **1f**, **TSC1-3f**, and **TSC2-4f** structures, and at a value of 0.784 for the other species, as they are the optimal values to properly depict the basins. To visualize the small basin between the peroxide oxygens in **1f**, **C1**, and **C2**, a value of 0.665 for the isosurface has been required. The same value has been used for the monosynaptic basin at **C4** in **6f**. The color convention represents core basins in magenta, and the remaining valence basins are classified depending on their synaptic order: red for monosynaptic, green for disynaptic and gray for hydrogenated basins.

Results and Discussion

We have studied the steps involved in the C-radical formation, shown in Scheme 3, using **1f** as artemisinin model and **2f** as heme model, as stated above.

By approaching **2f** to the O2 atom of **1f**, an interaction complex, **C1**, can be found. Such species is calculated to be 13.03 kcal/mol more stable than the starting separated reactants,

showing the affinity between Fe(II) and the peroxidic oxygen atoms (see Figure 1, where the structures are depicted, and Figure 2, where the energetic profile is sketched). From this point, a transition structure can be found (**TSC1-3f**), lying 2.78 kcal/mol above the aforementioned complex. Following the IRC pathway from **TSC1-3f**, the O1-centered radical **3f** is found 39.62 kcal/mol below the reactants. As can be seen in Figure 1, the O1–O2 distance increases as the Fe atom approaches O2, evolving from 1.48 Å at **1f** to 3.57 Å at **3f**, while the Fe–O1 distance shortens to 1.83 Å at **3f**. At the interaction complex, these distances are 1.49 and 2.23 Å, respectively, while at the TS the corresponding values are 1.66 and 2.00 Å.

On the other hand, if **2f** approaches the O1 atom of **1f**, the complex **C2** is found 9.64 kcal/mol below the starting reactants. The **TSC2-4f** lies 1.77 kcal/mol above the complex, and the O2 centered radical **4f** is found 42.51 kcal/mol below the reactants (see Figure 2). In this case the O1–O2 distance is 1.49 Å at the interaction complex, 1.63 Å at the corresponding TS, and 3.27 Å at **4f**, while the Fe–O2 distance is 2.21 Å at the complex, 2.03 Å at the TS, and 1.82 Å at **4f** (see Figure 1).

From **3f**, a moderate activation barrier of 12.81 kcal/mol has to be surmounted to reach the secondary C4 radical **5f**, which is slightly more stable than **3f**. The **TS3f-5f** is associated to the H migration from C4 to O1. It can be sensed in Figure 1 the motion of the H atom from C4 to O1 on going from **3f** to **5f**: the H–C4 distance is 1.10, 1.26, and 2.58 Å at **3f**, **TS3f-5f**, and **5f**, respectively, while the H–O1 distance shortens from 2.21 Å at **3f** to 1.29 Å at **TS3f-5f** and finally to 0.97 Å at **5f**.

From **4f** a very small activation barrier of 2.08 kcal/mol is found in the way to the C4 primary radical **6f**, which is the most stable species found in this work. The **TS4f-6f** is associated to the breaking of the C3–C4 bond, as can be seen in Figure 1, where the C3–C4 distances are reported at **4f** (1.63 Å), then at **TS4f-6f** (1.95 Å) and at **6f** (4.25 Å), with this bond completely broken. The energetic values obtained support the O2 radical route to be preferred from both a thermodynamic and a kinetic point of view. Hence the O2 radical route will prevail, which is in agreement with the *in vivo* experiments since the only fully characterized alkylation reaction reported to date in infected mice is the heme alkylation by means of the C4 primary radical.^{24,76}

On the other hand, when **2f** approaches molecular oxygen, an interaction complex (**C3**, see Figure 3) is formed with no

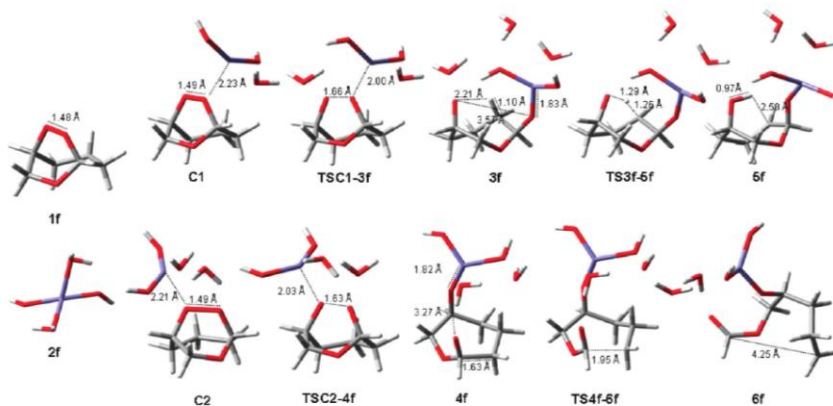


Figure 1. Structures of the indicated stationary points. Selected distances (Å) are included.

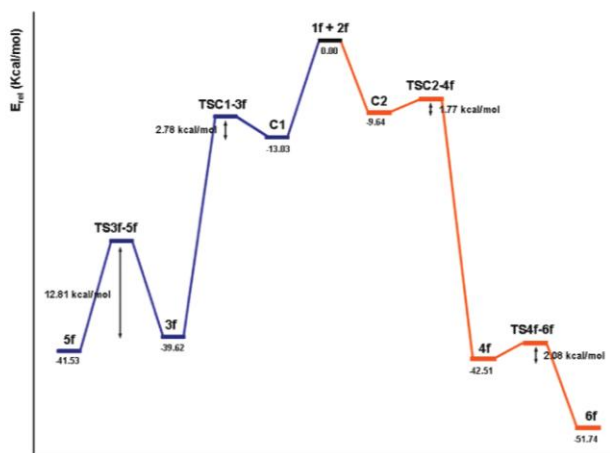


Figure 2. Relative energy (kcal/mol) profiles. Total energy of the reference point (1f plus 2f): $-2028.772\ 368$ hartree.

noticeable activation barrier. However, the stabilization achieved is much lesser than the one obtained with the formation of **C1** or **C2**: the most stable complex has septuplet electronic state and lies only 2.42 kcal/mol below the separated reactants, i.e., below **2f** in its quintuplet state and O_2 in its fundamental triplet electronic state. Therefore, the ferrous model reacts preferably with the endoperoxide-containing species than with molecular oxygen. If this finding could be extrapolated to the actual system, artemisinin instead of molecular oxygen would interact with heme. Hence the initial heme to heme oxidation would be avoided, disrupting in this way the heme detoxification process.

Topological Description of 1f and 2f. The ELF analysis of **1f** indicates that the $O1-O2$ peroxide bond is electron deficient: two monosynaptic basins with low populations of 0.26 and 0.28 electrons are found between $O1$ and $O2$. On the contrary, the basins corresponding to the unshared pairs of these oxygen atoms present high populations, more than 2.5 electrons for each

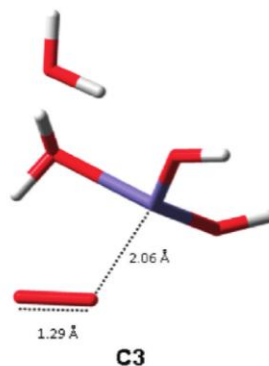
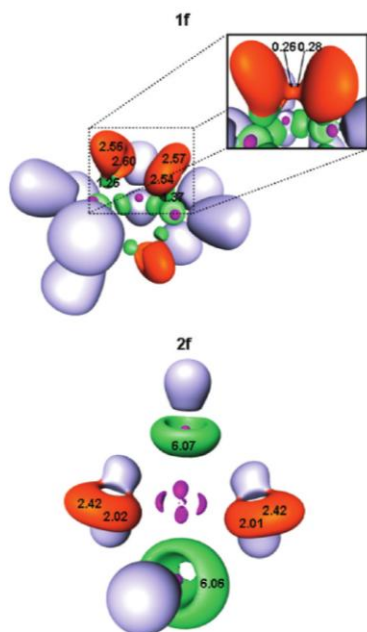
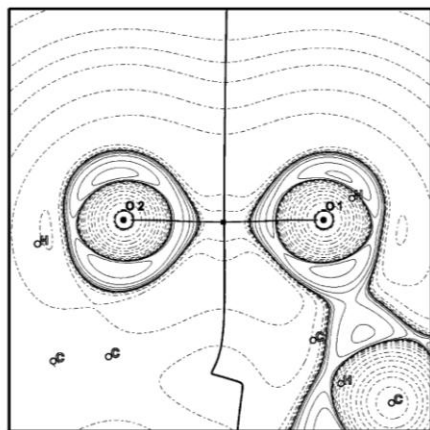


Figure 3. Structure of **C3**.

Figure 4. ELF isosurfaces of **1f** and **2f**.Figure 5. Contour map of the Laplacian of the electron density for **1f**.

basin. These results show that the low population of the peroxide basins causes the increase of charge on lone pairs; see Figure 4.

The **1f** Laplacian map of electron density (Figure 5) reveals that the BCP of the peroxide bond is located in a wide region of charge depletion. It is shown as well by the Laplacian ($\nabla^2\rho(r)$) positive value of 0.121 au in this critical point (Table 1). The positive value of $\nabla^2\rho(r)$ and the value of -0.152 au for the

TABLE 1: Electronic Properties of Selected Bond Critical Points (BCP) for the Indicated Species

	bond	$\rho(r)$ (au)	$\nabla^2\rho(r)$ (au)	$E_d(r)$ (au)
1f	O1–O2	0.255	0.121	-0.152
	Fe–O12	0.111	0.615	-0.020
2f	Fe–O13	0.111	0.622	-0.020
	Fe–O14	0.038	0.179	0.000
C1	Fe–O15	0.038	0.179	0.000
	O1–O2	0.250	0.140	-0.145
TSC1-3f	O2–Fe	0.043	0.239	0.002
	O1–O2	0.156	0.343	-0.045
3f	O2–Fe	0.075	0.456	-0.001
	O1–O2	–	–	–
TS3f-5f	O2–Fe	0.118	0.687	-0.023
	C4–H	0.274	-0.905	-0.270
5f	O1–H	0.016	0.062	0.003
	C4–H	0.176	-0.352	-0.130
C2	O1–H	0.145	0.030	-0.081
	C4–H	–	–	–
TSC2-4f	O1–H	0.353	-0.240	-0.682
	O1–O2	0.248	0.145	-0.143
4f	O1–Fe	0.045	0.253	0.002
	O1–O2	0.168	0.328	-0.056
TS4f-6f	O1–Fe	0.071	0.421	-0.001
	O1–O2	–	–	–
6f	O1–Fe	0.125	0.706	-0.029
	O2–C3	0.337	-0.395	-0.521
O₂	C3–C4	0.188	-0.309	-0.126
	O2–C3	0.378	-0.329	-0.616
C3	C3–C4	0.090	-0.006	-0.034
	O2–C3	0.410	-0.171	-0.690
O₂	C3–C4	–	–	–
	O–O	0.539	-0.765	-0.659
C3	O–O	0.424	-0.317	-0.419
	Fe–O	0.080	0.314	-0.006

electronic energy density ($E_d(r)$) indicate that the bond stability is relatively low. On the other hand, the electron density ($\rho(r)$) in this BCP is 0.255 au, pointing out that even with a small value for $E_d(r)$ and being in a charge depletion zone, this bond can be described as a shared-electron interaction, as the ELF isovalue picture reflects. Hence, the O1–O2 peroxide bond can be described by the valence domains (the unshared basins of each oxygen), and by a small domain that is separated into two monosynaptic basins at an ELF value of ca. 0.74. This is in agreement with the work by Sambrano et al.,⁷⁷ who analyzed a different system containing a peroxide bond and the prototype peroxide-containing molecule, O_2^{2-} . They also found two monosynaptic basins placed between the oxygen core basins at a value of 0.74 for the ELF function. From the point of view of the catastrophe theory, such topology of ELF, early observed in studies of the F_2 molecule by Llugar et al.,⁷⁸ corresponds to a forming/breaking of the bond via the cusp catastrophe; therefore, the name “protovalent bond” has been proposed. This kind of bond has been identified in other systems containing a peroxide bond.⁷⁹

In **2f** a disynaptic basin of about six electrons can be found between each hydroxyl oxygen atom and the Fe atom (see Figure 4). The oxygen atoms of the water molecules present two monosynaptic basins with about two electrons, corresponding to the lone pairs. The bonds between the hydroxyl oxygens and Fe present a positive value of $\nabla^2\rho(r)$, meaning that the BCP are located in a charge depletion region, even though the value of 0.111 au for $\rho(r)$ and the small but negative value of $E_d(r)$ demonstrate the bond formation. With regard to the water oxygens and their interactions with Fe, the BCP are also located in a charge depletion zone, but $\rho(r)$ presents smaller values and

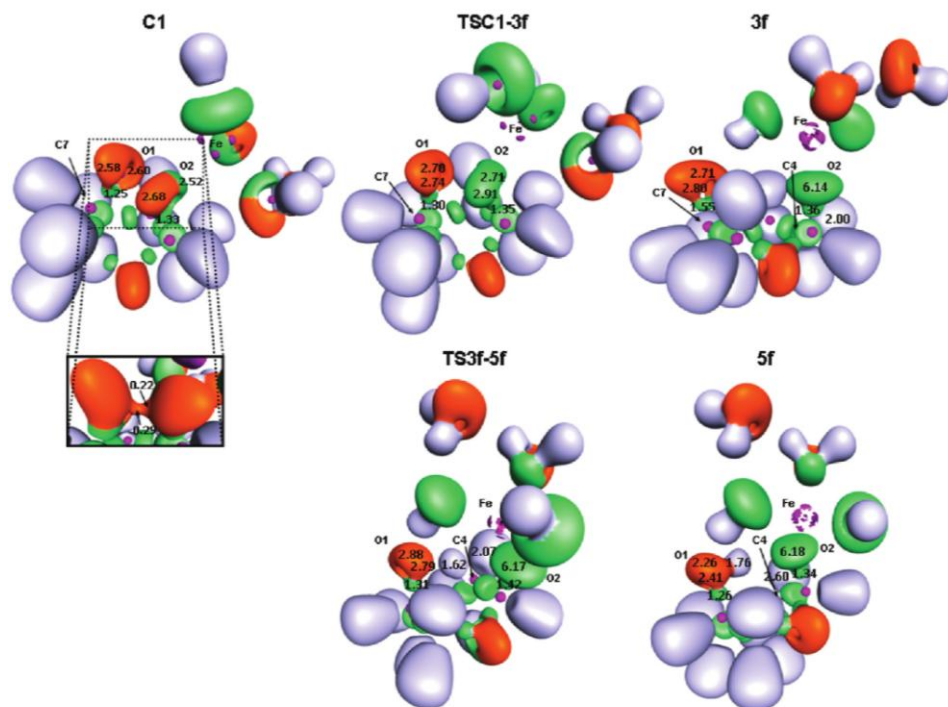


Figure 6. ELF isosurfaces of C1, TSC1-3f, 3f, TS3f-5f, and 5f.

$E_d(r)$ is zero, showing that these interactions are weaker than the bonds between the hydroxyl oxygens and Fe.

Topological Description of C1, TSC1-3f, and 3f. The monosynaptic basins corresponding to the peroxide bond can still be found at C1, and they disappear at TSC1-3f (Figure 6), showing the peroxide bond cleavage. The shape of the basins for both oxygens is the same in C1 and TSC1-3f as in 1f, and hence the proximity of the Fe atom to O2 does not significantly change the structure of the oxygen unshared basins. One of the O2 unshared basins presents monosynaptic order at C1, while both basins are disynaptic at the TS: this is shown by the color change from red to green in Figure 6. At 3f, with the Fe atom linked to O2, there is only one disynaptic basin between Fe and O2, with a different shape. Hence, with regard to the Fe–O2 bond, the TSC1-3f has reactant-like character.

On the other hand, the increase of the population of the unshared basin in O1 at TSC1-3f with respect to C1, as well as the disappearance of the basins between the oxygen atoms, indicates that TSC1-3f is productlike regarding the O1–O2 bond. It is shown in this way that the cleavage of the peroxide bond initiates the electronic reorganization leading from the reactants to the O-centered radical 3f.

The ELF study of 3f (Figure 6) shows a different topology for the oxygens O1 and O2, compared with 1f, C1, and TSC1-3f, since O2 is bound to Fe. The peroxide bond has been broken and O1 shows overpopulated unshared basins with 2.80 and 2.71 electrons. These populations, far larger than two electrons each, indicate that O1 takes electrons coming from the peroxide

bond breaking. In addition, it can be seen that the population of the disynaptic basin between O1 and C7 increases from 1.25 at C1 to 1.55 at 3f, thus giving theoretical grounds to the radical character of O1.

The AIM analysis (Figure 7 and Table 1) describes the O2–Fe bond formation and the peroxide bond cleavage in the reaction path connecting C1 and 3f. The BCP between O2 and Fe presents a low value of $\rho(r)$ at C1. This value increases at TSC1-3f, and further increases at 3f, showing the O2–Fe bond formation. The $E_d(r)$ for this BCP has a positive value of 0.002 au in C1, and it goes to a negative value (–0.001 au) at the transition state and –0.023 au at 3f, also indicating a strengthening of the Fe–O2 bond. On the other hand, the cleavage of the peroxide bond is described by the drop in $\rho(r)$ values, which go from 0.250 au in C1 to 0.156 au in the transition state, while in 3f no BCP has been found between the two oxygen atoms. Furthermore, the $E_d(r)$ reveals the loss of stability of this peroxide bond, going from –0.145 au in C1 to –0.045 au in the transition state.

Topological Description of TS3f-5f and 5f. The ELF analysis of TS3f-5f shows that the O2 atom remains bound to Fe with the valence shell of the oxygen completely in contact with the core basins of Fe atom, as can be deduced from the disynaptic basin between O2 and Fe, with a population of 6.17 electrons (Figure 6). Furthermore, there is a hydrogenated basin between O1 and C4 with a population of 1.62 electrons. This basin accounts for the H transfer from C4 to O1 in this step. The unshared basins of the O1 oxygen present high populations

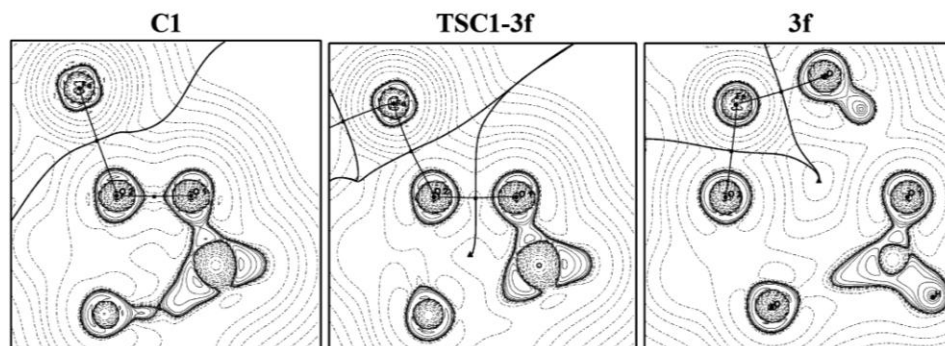


Figure 7. Contour maps of the Laplacian of the electron density for the indicated stationary points.

of 2.88 and 2.79 electrons, indicating that the O1 atom carries the electronic excess.

On the other hand, at **5f** the unshared basins of O1 present a population lower than at **TS3f-5f**. The difference between these populations is exactly one electron. This fact reveals that **TS3f-5f** can still be described as a radical centered in O1, while in **5f** the O1 has formed a OH group and the unpaired electron is centered in C4, as is shown by the population excess of 0.60 electrons of the only hydrogenated basin of C4 and the excess of 0.25 electrons of the disynaptic basin between C4 and C5, not shown in Figure 6. Hence, the ELF analysis nicely describes the electron flows leading from the O1-centered radical **3f** to the C4-centered radical **5f**.

The AIM study of the reaction yielding **5f** accounts for the H transfer from C4 to O1, i.e., the C4–H bond cleavage and the O1–H bond formation (see Table 1). The BCP found for the C4–H distance at **3f** has a $\rho(r)$ value of 0.274 au, while at **TS3f-5f** this value is 0.176 au. At **5f** no BCP has been found between C4 and H. The $E_d(r)$ for this BCP in **3f** is -0.270 au and increases to -0.130 au for **TS3f-5f**. Furthermore, the $\nabla^2\rho(r)$ has a less negative value of -0.352 au in **TS3f-5f**, being -0.905 au in **3f**. The increase of $\nabla^2\rho(r)$, the decrease of $\rho(r)$, and the increase of $E_d(r)$ on going from **3f** to the transition state point out the progressive C4–H bond cleavage. A BCP has been found between the atoms O1 and H for the three species (**3f**, **TS3f-5f**, and **5f**). The $\rho(r)$ in this BCP for **3f** is very small, as expected because there is no bond between these atoms. At **TS3f-5f** and **5f** this value is larger: 0.145 and 0.353 au, respectively. The $E_d(r)$ goes from 0.003 au in **3f** to a more stable value of -0.081 au in **TS3f-5f** and a much more stable value of -0.682 au in **5f**. The $\nabla^2\rho(r)$ has positive values for **3f** and **TS3f-5f**, 0.062 and 0.030 au, respectively, and a negative value for **5f**, -0.240 au. This means that at **5f** the BCP O1–H is in a charge accumulation region. All these values account for the O1–H bond formation when the reaction gives **5f** from **3f**.

Topological Description of C2, TSC2-4f, and 4f. As can be calculated from the data shown in Figure 8, on going from **C2** to **TSC2-4f** the O unshared basins increase its population in 0.34 electrons for O1 and in 0.28 for O2. The basins show the same shape for the two structures, and hence the O1–Fe interaction does not result in a change of the oxygen basins shape. At **4f**, with the Fe atom linked to O1, there is only one disynaptic basin between these two atoms, with a different shape. Therefore, with regard to the Fe–O1 bond, the **TSC2-4f** has reactant-like character.

On the other hand, at the transition state there are no basins between O1 and O2, meaning that the peroxide bond has been broken. This fact and the high population of the unshared basins of O2 indicate that the transition state resembles the product **4f** with respect to the O1–O2 bond. Hence, we find again that the cleavage of the peroxide bond initiates the electronic reorganization, leading in this case to the **4f** O-centered radical.

The ELF analysis of **4f** indicates that Fe is completely linked to O1, as the shape of the disynaptic basin between O1 and Fe shows, presenting frontier with Fe and having a population of 6.19. In addition, the two basins corresponding to the lone pairs of O2 have a population excess of 1.53 electrons, because the unshared electron is located on this oxygen. Moreover, it can be seen that the population of the disynaptic basin between O2 and C3 increases from 1.34 at **C2** to 1.65 at **4f**, in agreement with the radical character of O2 at **4f**.

The AIM analysis confirms the bond formation between O1 and Fe and the peroxide bond cleavage in the reaction path (see Figure 9). As can be seen in Table 1, **C2** presents a BCP for the O1–Fe bond with a low value of $\rho(r)$. At **TSC2-4f** this value has slightly increased and at **4f** a larger value is found. The $E_d(r)$ of this BCP has a positive value at **C2** and a negative value at **TSC2-4f** and evolves to a more stable value for the product. On the other hand, the peroxide bond breaks in this reaction, the $\rho(r)$ changes from 0.248 au at **C2** to 0.168 au at the transition state, while at **4f** no BCP has been found between the two oxygen atoms. Furthermore, the $E_d(r)$ results reveal the loss of stability of this peroxide bond, going from -0.143 au in reactants to -0.056 au at the transition state. $\nabla^2\rho(r)$ presents a more positive value for the transition state than for **C2**, meaning that the BCP is in a region with more charge depletion. This trend, together with the $\rho(r)$ and $E_d(r)$ results, describes the O1–O2 cleavage.

Looking at the contour maps of the electron density Laplacian, it is worth noting that, at **1f**, **C1**, and **C2**, the charge concentration zones around the oxygens O1 and O2 present a protruding region pointing to the BCP. Such regions correspond to the electron density belonging to the monosynaptic basins located between O1 and O2 in the ELF study. The corresponding contour maps of **TSC1-3f**, **TSC2-4f**, **3f**, and **4f** show the disappearance of this protuberance, due to the drop of the electron density in this region.

Topological Description of TS4f-6f and 6f. The ELF analysis of **4f** shows a disynaptic basin between the C3 and C4 cores with a population of 1.61 electrons. This basin disappears

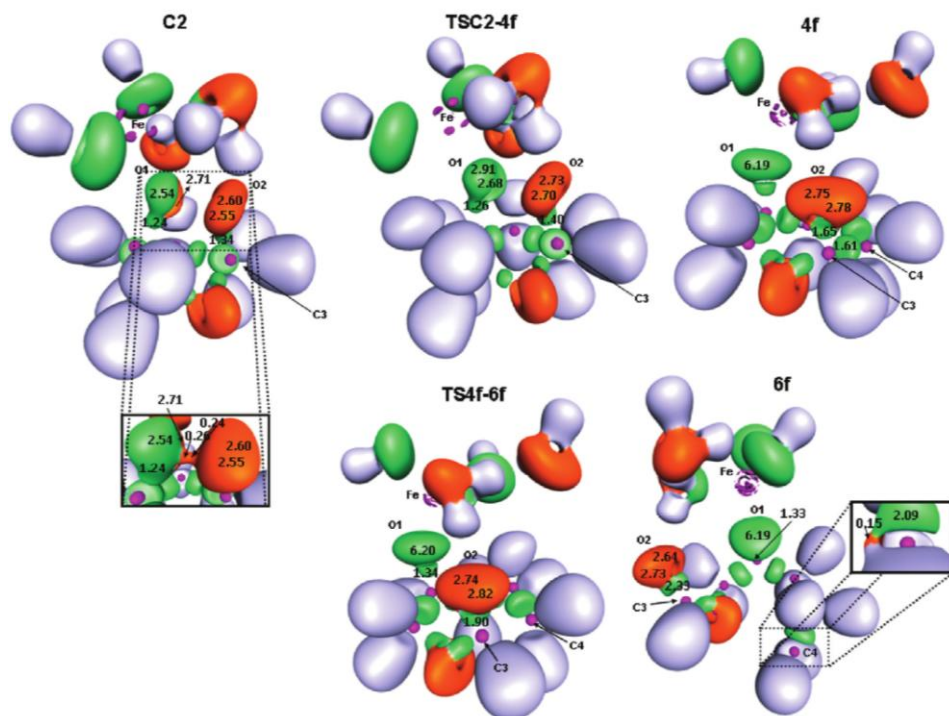


Figure 8. ELF isosurfaces of **C2**, **TSC2-4f**, **4f**, **TS4f-6f**, and **6f**.

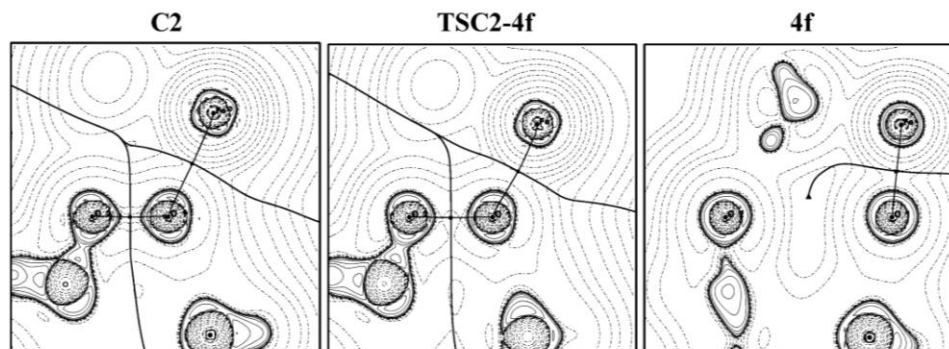


Figure 9. Contour maps of the Laplacian of the electron density for the indicated stationary points.

at **TS4f-6f**, indicating the C3–C4 bond cleavage. In this transition state the population of the disynaptic basin between the O2 and C3 cores increases with respect to **4f**, showing a value of 1.90 electrons. At **6f** the O2–C3 basin has a population of 2.33, and the lone pairs of O2 present charge excess (2.64 and 2.73 electrons). In this structure, the C-radical character is proven with the formation of an unshared basin of 0.15 electrons in C4 and the increase of the population of the disynaptic basin between C4 and C5, which has a value of 2.09 electrons, far

larger than a common C–C bond. Again, the ELF analysis describes the electron flows leading in this case from the O2-centered radical **4f** to the C4-centered radical **6f**.

The C3–C4 bond cleavage and C3–O2 double bond formation can be described on the basis of the AIM analysis. **4f** shows a BCP between C3 and C4 with a value of 0.188 au for $\rho(r)$, which decreases to 0.090 au at the **TS4f-6f** (see Table 1). At **6f** no BCP has been found, because the bond between C3 and C4

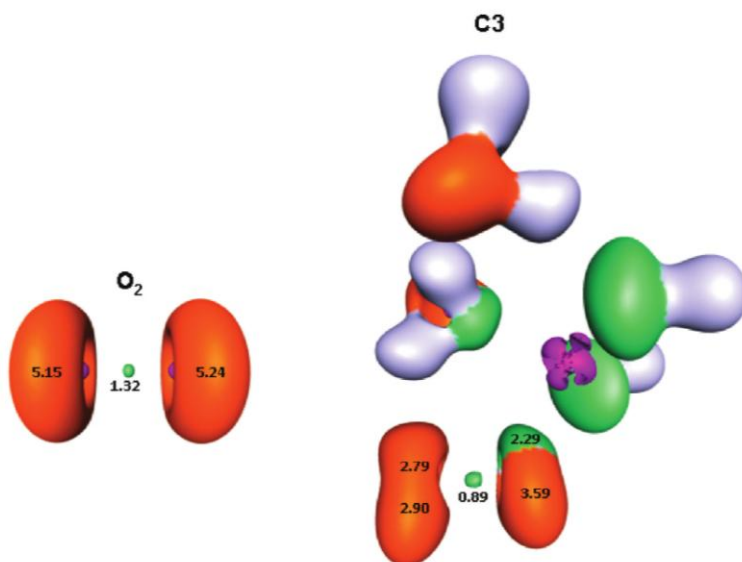
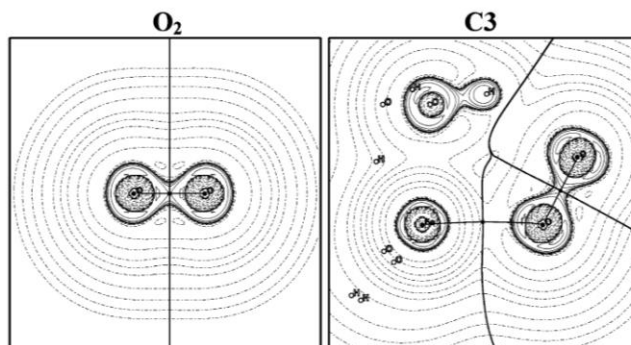
Figure 10. ELF isosurfaces of C3 and O₂.

Figure 11. Contour maps of the Laplacian of the electron density for the indicated stationary points.

has been broken. Furthermore, the values of $E_{\delta}(r)$ for this BCP change from -0.126 au at **4f** to -0.034 au at the transition state.

In the BCP located between C3 and O₂, the $\rho(r)$ is 0.337 au at **4f**, and increases as the reaction takes place, being 0.378 au at **TS4f-6f** and 0.410 au at **6f**. The $E_{\delta}(r)$, which has a value of -0.521 au at **4f**, evolves to more stable values of -0.616 and -0.690 au at **TS4f-6f** and **6f**, respectively.

Topological Description of O₂ and C3. The ELF analysis of O₂ shows a disynaptic basin between the oxygen atoms with a population of 1.32 electrons, which reduces to 0.89 electrons at **C3** (see Figure 10). The topology of this bond at **C3** is significantly different from the peroxide bond at **C1** and **C2**, where two monosynaptic basins constituted the protocovalent bond between the peroxide oxygen atoms. On the other hand, a disynaptic basin has been found between the iron atom and the

oxygen atom linked to it, showing a population of 2.29 electrons. The monosynaptic unshared basins on the oxygen atoms at O₂ have a population of 5.15 and 5.24 electrons, showing its paramagnetic character. At **C3** the monosynaptic unshared basin of the oxygen linked to Fe has a population of 3.59 electrons, while the unshared basins of the other oxygen atom are overpopulated with 5.69 electrons, due to the radical character of this oxygen atom.

The AIM study of O₂ and C3 (see Figure 11 and Table 1) points out the presence of a BCP between the oxygen atoms, located in a valence shell charge concentration region as the negative $\nabla^2\rho(r)$ values of -0.765 au for O₂ and -0.317 au for **C3** indicate. The electron density changes from a value of 0.539 au at O₂ to 0.424 au at **C3**, showing the charge delocalization to the oxygen atoms. The highly negative values of the electronic energy density of -0.659 au at O₂ and -0.419 au at **C3**, together

with the aforementioned $\nabla^2\rho(r)$ and $\rho(r)$ values, show the covalent character of the O–O bond. On the other hand, the BCP located between the iron atom and one of the oxygen atoms at **C3** corresponds to an unshared-electron interaction, as the positive value for $\nabla^2\rho(r)$ of 0.314 au, the small value of 0.080 au for $\rho(r)$, and the very small negative value of -0.006 au for $E_h(r)$ indicate.

Moreover, a comparison between the O–O BCP at **O₂** and at **If** reveals that the electron density at **O₂** is 0.539 au while at **If** is only of 0.255 au. The Laplacian at **O₂** has a negative value of -0.765 au, and hence the BCP is in a valence shell charge accumulation region, while at **If** the Laplacian value is positive (0.121 au), and it is in a valence shell charge depletion zone. The electronic energy density shows the O–O bond being more robust at **O₂** than at **If** (-0.659 and -0.152 au, respectively). From these results, it is concluded that the O–O bond at **If** is much more reactive than at **O₂**, thus explaining why the ferrous model reacts preferably with the endoperoxide-containing species than with the molecular oxygen.

Conclusions

The present work represents a new contribution to the study of the antimalarial mode of action of artemisinin and focuses on the electronic and topological aspects of the reaction between heme and artemisinin by using very simple molecular models. The key first steps of the artemisinin decomposition induced by Fe(II)-containing species, leading to carbon-centered radicals postulated as the agents responsible of causing the parasite death, have been analyzed with the ELF and AIM methodologies. In this way, following the flows of electron density charge between the ELF basins, a quantitative analysis of the electronic rearrangements along the reaction pathways has been done, and the bond formation/breaking processes have been described.

The reported results explain the affinity between Fe and the peroxide bond. Furthermore, a comparison has been made with the reaction of Fe(II) with molecular oxygen, and from the results obtained it is concluded that the ferrous model reacts preferably with the endoperoxide-containing species. Hence, the disruption by artemisinin of the heme detoxification process would take place by avoiding the initial Fe(II) to Fe(III) oxidation. Artemisinin would compete with molecular oxygen in the very first step of hemozoin formation, killing in this way the malaria parasite. This finding can shed additional light on our current understanding of the antimalarial action of artemisinin and its derivatives.

Some additional specific conclusions can also be derived from this work:

(a) The C4 primary radical **6f** is found to be the most stable structure within the initial steps of the artemisinin decomposition, and hence the O2 radical route is calculated to be thermodynamically, and also kinetically, favored until the C-radicals are formed. This agrees with the fact that the only fully characterized alkylation reaction reported to date in infected mice is the heme alkylation by means of the C4 primary radical.

(b) In spite of the preceding conclusion, the O1 radical route can compete and be also operative, as it was experimentally established.^{32,30} The finding that the **C1** complex is more stable than the **C2** gives support to these experimental observations.

(c) The O1–O2 bond in **If** has been characterized by means of the ELF and AIM analysis as a protovalent bond, i.e., a bond with a relatively low stability. This is the reason why the endoperoxide bond in artemisinin can be easily broken in the presence of Fe(II) species. On the contrary, the O–O bond in **O₂** shows a more populated disynaptic basin, and therefore this

bond is described as stronger than the equivalent bond in **If**. This conclusion is reinforced by the results of the AIM analysis, as the electronic properties for this bond critical point reveal.

(d) It has been found by means of the ELF and AIM study that the cleavage of the artemisinin endoperoxide bond initiates the electronic reorganization leading to the O-centered radicals, in agreement with the experimental observation that the 1,2,4-trioxane ring system is necessary for the antimalarial activity.^{4,23}

(e) The ELF analysis accurately describes the electron flows that lead from the reactants to the O-centered radicals, and from these to the C-centered radicals. Furthermore, the AIM study quantitatively accounts for the cleavage/formation of the bonds and provides us a picture at an electronic level of the chemical rearrangements taking place in the processes herein studied.

Further work is required in regard to increasing the molecular model size and accuracy. The way by which the carbon-centered radicals alkylate heme will also be studied. Our group is conducting these studies and the results obtained will hopefully be reported in due form, with the ultimate aim of contributing to a better understanding of the antimalarial activity of artemisinin.

Acknowledgment. Financial support by the Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2006-15447-C02-01), Generalitat Valenciana (Projects ACOMP/2009/121 and PROM-ETEO/2009/053), and Fundació Bancaixa-UJI (P1.1B2008-37 and P1.1B2005-27) is gratefully acknowledged. P.M. acknowledges the Universitat Jaume I for the grant PREDOC/2005/28. A.S.-G. acknowledges the grant associated with the project P1.1B2005-27.

References and Notes

- (1) Tonmuanphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2082.
- (2) O'Neill, P. M.; Posner, G. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945.
- (3) Posner, G. H.; O'Neill, P. M. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 397.
- (4) Meshnick, S. R.; Taylor, T. E.; Kamchonwongpaisan, S. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 301.
- (5) Jani, D.; Nagarkati, R.; Beatty, W.; Angel, R.; Slobodnick, C.; Andersen, J.; Kumar, S.; Rathore, D. *PLoS Pathogens* **2008**, *4*, e1000053.
- (6) Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Dascombe, M. J.; Ismail, F. M. D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6065.
- (7) Pereira, M. S. C.; Kiralji, R.; Ferreira, M. M. C. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 85.
- (8) Egan, T. J. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157*, 127.
- (9) Krugliak, M.; Zhang, F.; Ginsburg, H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *119*, 249.
- (10) Goldberg, D. E.; Slater, A. F.; Cerami, A.; Henderson, G. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 2931.
- (11) Kannan, R.; Kumar, K.; Sahal, D.; Kukreti, S.; Chauhan, V. S. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 409.
- (12) Egan, T. J.; Combrinck, J. M.; Egan, J.; Hearne, G. R.; Marques, H. M.; Ntenti, S.; Sewell, B. T.; Smith, P. J.; Taylor, D.; van Schalkwyk, D. A.; Walden, J. C. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 343.
- (13) Rathore, D.; McCutchan, T. F.; Sullivan, M.; Kumar, S. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2005**, *14*, 871.
- (14) Cazelles, J.; Robert, A.; Meunier, B. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 609.
- (15) Robert, A.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1954.
- (16) Robert, A.; Meunier, B. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 273.
- (17) Zhang, F.; Gosser, D. K.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1805.
- (18) da Silva Costa, M.; Kiralji, R.; Ferreira, M. M. C. *Quim. Nova* **2007**, *1*, 25.
- (19) Mockenhaupt, F. P. *Parasitol. Today* **1995**, *11*, 248.
- (20) Haynes, R. K.; Ho, W.-Y.; Chan, H.-W.; Fugmann, B.; Stetter, J.; Croft, S. L.; Vivas, L.; Peters, W.; Robinson, B. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 1381.
- (21) Krishna, S.; Woodrow, C.; Staines, H. M.; Haynes, R. K.; Mercerau-Pujalon, O. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 200.
- (22) White, N. J. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1084.
- (23) Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 9364.

Modeling the Artemisinin Reaction with Heme

J. Phys. Chem. B, Vol. 114, No. 2, 2010 1173

- (24) Robert, A.; Bonduelle, C.; Laurent, S. A.-L.; Meunier, B. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 562.
- (25) Robert, A.; Benoit-Vical, F.; Claparols, C.; Meunier, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 13676.
- (26) Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 167.
- (27) Jefford, C. W. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1803.
- (28) Posner, G. H.; Park, S. B.; González, L.; Wang, D.; Cumming, J. N.; Klinedinst, D.; Shapiro, T. A.; Bachi, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3537.
- (29) Posner, G. H.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8328.
- (30) O'Neill, P. M.; Bishop, L. P.; Searle, N. L.; Maggs, J. L.; Ward, S. A.; Park, B. K.; Mabbs, F. J. *Org. Chem.* **2000**, *65*, 1578.
- (31) Butler, A. R.; Gilbert, B. C.; Hulme, P.; Irvine, L. R.; Renton, L.; Whitwood, A. C. *Free Rad. Res.* **1998**, *28*, 471.
- (32) Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3316.
- (33) Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. *Nature* **2003**, *424*, 957.
- (34) Ridley, R. G. *Nature* **2003**, *424*, 887.
- (35) Haynes, R. K.; Monti, D.; Taramelli, D.; Basilico, N.; Parapini, S.; Olliaro, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1175.
- (36) Olliaro, P.; Haynes, R. K.; Meunier, B.; Yongyuth, Y. *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 123.
- (37) Bhisuthibhan, J.; Meshnick, S. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2397.
- (38) Pandey, A. V.; Tekwani, B. L.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19383.
- (39) Asawamahsakda, W.; Ittarat, I.; Pu, Y. M.; Ziffer, H.; Meshnick, S. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1854.
- (40) Bhisuthibhan, J.; Philbert, M. A.; Fujioka, H.; Aikawa, M.; Meshnick, S. R. *Eur. J. Cell. Biol.* **1994**, *78*, 665.
- (41) Yang, Y. Z.; Little, B.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 569.
- (42) Yang, Y. Z.; Asawamahsakda, W.; Meshnick, S. R. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 336.
- (43) Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Posner, G. H. *Adv. Pharmacol.* **1996**, *37*, 253.
- (44) Araújo, J. Q.; Carneiro, J. W. d. M.; de Araujo, M. T.; Leite, F. H. A.; Taranto, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5021.
- (45) Nosonogno, W.; Pratuangdejkul, J.; Sathirakul, K.; Jacob, A.; Conti, M.; Loric, S.; Launay, J.-M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 5083.
- (46) Galasso, V.; Kovac, B.; Modelli, A. *Chem. Phys.* **2007**, *335*, 141.
- (47) Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Dascombe, M. J.; Ismail, F. M. D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2007**, *823*, 34.
- (48) Wiwanitkit, V. *J. Infect.* **2006**, *53*, 148.
- (49) Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. d. M.; de Araujo, M. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1546.
- (50) de Araujo, M. J.; de Carneiro, J. W.; Taranto, A. G. *Int. J. Quantum Chem.* **2006**, *106*, 2804.
- (51) Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Ismail, F. M. D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, *756*, 87.
- (52) Arantes, C.; de Araujo, M. J.; Taranto, A. G.; de Carneiro, J. W. *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *103*, 749.
- (53) Tommumphan, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, *724*, 99.
- (54) Rafiee, M. A.; Hadipour, N. L.; Naderi-manesh, H. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 366.
- (55) Drew, M. G. B.; Metcalfe, J.; Ismail, F. M. D. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2004**, *711*, 95.
- (56) Pinheiro, J. C.; Kiralji, R.; Ferreira, M. C. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 830.
- (57) Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. d. M.; de Oliveira, F. G.; de Araujo, M. T.; Correa, C. R. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2002**, *580*, 207.
- (58) Tommumphan, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 26.
- (59) Pinheiro, J. C.; Ferreira, M. M. C.; Romero, O. A. S. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2001**, *572*, 35.
- (60) Gu, J. D.; Chen, K. X.; Jiang, H. L.; Leszczynski, J. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, *491*, 57.
- (61) Moles, P.; Oliva, M.; Safont, V. S. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9448.
- (62) Moles, P.; Oliva, M.; Safont, V. S. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 7144.
- (63) Zhang, S.; Gerhard, G. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 7853.
- (64) Becke, A. D.; Edgecombe, K. E. *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 5397.
- (65) (a) Silvi, B.; Savin, A. *Nature* **1994**, *371*, 683. (b) Silvi, B.; Fourné, I.; Alikhani, M. E. *Monatsh. Chem.* **2005**, *136*, 855.
- (66) Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*; Oxford University Press, Inc.: New York, 1990.
- (67) Bader, R. F. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 893.
- (68) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, R.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03; Revision B.04*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- (69) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372.
- (70) Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- (71) McIver, J. W., Jr. *J. Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 72.
- (72) Fukui, K. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 4161.
- (73) Biegler-König, F.; Schonbohm, J.; Bayles, D. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 545.
- (74) (a) Noury, S.; Krokidis, X.; Fuster, F.; Silvi, B. *Comput. Chem.* **1999**, *23*, 597. (b) Matito, E.; Silvi, B.; Duran, M.; Sola, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 024301.
- (75) Konrad-Zuse-Zentrum B. and Mercury Computer Systems: Amira 4.1, 1995–2006.
- (76) Tang, Y.; Dong, Y.; Wang, X.; Sriraghavan, K.; Wood, J. K.; Vennerstrom, J. L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5103.
- (77) Sambrano, J. R.; Gracia, L.; Andrés, J.; Berski, S.; Beltrán, A. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 10850.
- (78) Llusar, R.; Beltrán, A.; Andrés, J.; Noury, S.; Silvi, B. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 1517.
- (79) Berski, S.; Mierzwicki, K.; Bil, A.; Latajka, Z. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *460*, 559.
- (80) Posner, G. H.; Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5885.

JP910207Z

A topological study of the late steps of the Artemisinin decomposition process: modeling the outcome of the experimentally obtained products

Pamela Moles, Mónica Oliva and Vicent S. Safont

J. Phys. Chem. B 2011, 115, 333-346

Topological Study of the Late Steps of the Artemisinin Decomposition Process: Modeling the Outcome of the Experimentally Obtained Products

Pamela Moles, Mónica Oliva, and Vicent S. Safont*

Departament de Química Física i Anàlítica, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castelló, Spain

Received: July 13, 2010; Revised Manuscript Received: November 4, 2010

By using 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane as the artemisinin model and dihydrated Fe(OH)₂ as the heme model, we report a theoretical study of the late steps of the artemisinin decomposition process. The study offers two viewpoints: first, the energetic and geometric parameters are obtained and analyzed, and hence, different reaction paths have been studied. The second point of view uses the electron localization function (ELF) and the atoms in molecules (AIM) methodology, to conduct a complete topological study of such steps. The MO analysis together with the spin density description has also been used. The obtained results agree nicely with the experimental data, and a new mechanistic proposal that explains the experimentally determined outcome of deoxiartemisinin has been postulated.

Introduction

Malaria is a disease, produced by the members of the *Plasmodium* parasite gender, which spreads out mainly throughout the tropical and subtropical regions, causing more than one million deaths yearly, and especially affecting childhood.¹

The malaria parasite enters humans through the bite of an infected *Anopheles* female mosquito. The mosquito inoculates motile sporozoites, which quickly arrive at the liver, where they invade hepatocytes. Six days later, the infested hepatocytes are broken, freeing tens of thousands of merozoites by each original sporozoite. The merozoites then invade the erythrocytes, where they develop to mature forms (trophozoites and schizonts), releasing finally more merozoites, closing this cycle. In addition, gametocytes are also released, which can be ingested by another female *Anopheles* if the host is pricked again. Fertilization then takes place in the mosquito, and more sporozoites develop, which will infect a new host when the mosquito pricks another human being.^{1,2}

To sustain this rapid development, the malaria parasite must synthesize its own proteins, and it obtains amino acids mainly from the digestion of the host hemoglobin.³ However, digestion of hemoglobin also releases free heme (Fe (II) protoporphyrin-IX), which is toxic to the parasite due to its ability to destabilize and lyse membranes and inhibit the activity of some enzymes. Therefore, the parasite needs a parallel process to eliminate the toxic heme that the digestion of the host hemoglobin produces.^{4,5}

At least three mechanisms have been identified by which the parasite eliminates heme: degradation facilitated by hydrogen peroxide within the parasite food vacuole, glutathione-dependent degradation in the cytoplasm of parasite, and elimination of heme by means of the formation of hemozoin or malaria pigment.⁶ Some studies suggest that up to 95% of the iron arising from the digestion of the host hemoglobin is found in hemozoin, and therefore, it seems that the main mechanism of detoxification is the formation of the malaria pigment.^{3,7} In this process, heme is oxidized to hemin (Fe (III) protoporphyrin-IX); then, hemin dimers (β -hematin) are formed and finally assemble to form hemozoin, an insoluble crystalline material.

There are different drugs that can be used in the malaria treatment, and many of them act by avoiding the detoxification process, therefore preventing the heme elimination. In this way, the parasite dies by accumulation of free heme. For instance, the chloroquine-derived treatments act by forming adducts with heme, avoiding in this way its polymerization to hemozoin.⁸

However, the malaria parasite has developed resistance to chloroquine-based drugs and even to quinine and mefloquine. Due to this fact, artemisinin-based combination therapies are nowadays the recommended and most used antimalarial agents.⁹ They are very effective against severe malaria, caused by *Plasmodium falciparum*. Artemisinin eliminates almost all asexual forms of the parasite in its intraerythrocytic stage, preventing in this way its maturation to more pathological forms. Furthermore, artemisinin also eliminates some sexual stages, the gametocytes, avoiding in this way the disease transmission to new hosts.⁹

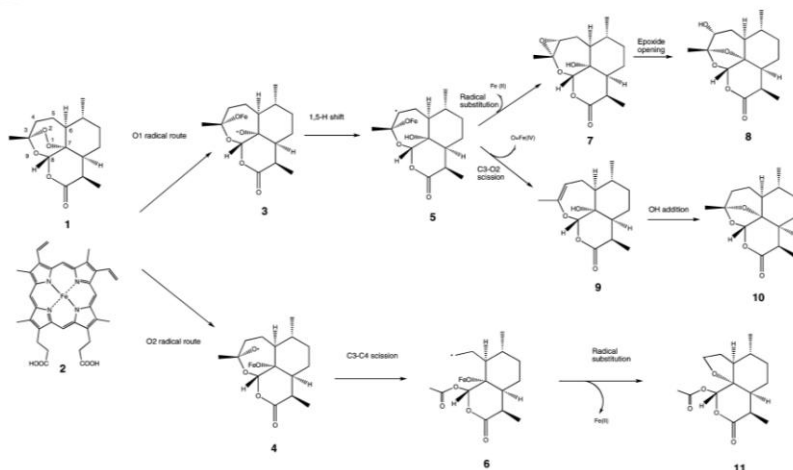
Artemisinin (**1**, Scheme 1) is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide group, and its unusual 1,2,4-trioxane ring system has been proven to be essential for the antimalarial activity.^{10,11} The mechanism of action of artemisinin is not clear and is still under debate.^{4,12–18} However, a quite wide agreement exists in that artemisinin decomposes in the presence of heme (**2**, see Scheme 1), generating several reactive intermediates, which would be the agents directly or indirectly responsible for the malaria parasite death.^{2,19}

In this context, the study of the artemisinin decomposition prompted by the presence of heme iron has a great importance in understanding the details of the antimalarial action that artemisinin and its derivatives exert.

In a recent work,²⁰ we have suggested that artemisinin instead of oxygen can react with heme, avoiding in this way the heme-to-hemin oxidation, with the subsequent disruption of the detoxification process. On the other hand, if artemisinin interacts with heme, the decomposition process of artemisinin takes place, and carbon-centered radicals, that are able to alkylate heme itself, are formed. In such a way, artemisinin acts in heme oxidation blocking, and as a heme alkylating agent as well. Both actions complement each other and yield the same result: the hemozoin formation is prevented, the (alkylated) heme accumulates inside the parasite, and therefore, the parasite dies.

* E-mail: safont@qfa.uji.es. Phone: 34964728085. Fax: 34964728066.

SCHEME 1



By using proper molecular models, in that work²⁰ the steps from the reactants initially separated (the artemisinin model and the iron complex) to the carboradicals postulated as heme alkylation agents, namely, **5** and **6** (see Scheme 1), were studied.

Experimentally, several *in vitro* studies demonstrate that if alkylation fails the decomposition process can continue, to render several products identified in different yields as a function of the reaction conditions.^{21,22} In particular, the presence of species **8**, **10**, and **11** as products resulting from the artemisinin decomposition prompted by Fe(II) has been described. The formation of such products has been explained by means of the molecular mechanism depicted in Scheme 1.^{21,23}

With the aim of completing our aforementioned study and to reveal the details of the latter stages, which can play a significant role in the thermodynamics and the kinetics of the whole artemisinin decomposition process, in the present work we describe the steps leading from the carbon-centered radicals modeling **5** and **6** to the experimentally obtained final products of the artemisinin decomposition process.

Following the same outline we used in the previous work,²⁰ the study has been made from two points of view: on one side, we have characterized the geometric and energetic parameters of the obtained species, and on the other side, we have conducted a topological study based on the electron localization function (ELF) and the atoms in molecules (AIM) methodology with the objective of analyzing the details concerning the electronic redistribution taking place in the processes under study. To gain a deeper insight into the electronic aspects of the studied processes, a molecular orbital (MO) analysis including the spin density description has also been done for some critical reaction steps.

Computational Methodology

Following our previous work, we have used the same simple models that allow us to perform the topological analysis and to reveal the electronic details of the studied processes. Therefore, artemisinin (**1**) has been modeled with the trioxane 6,7,8-trioxabicyclo[3.2.2]nonane (**1f**), while heme (**2**) has been modeled by dihydrated Fe(OH)₂ (**2f**, see Scheme 2). While the

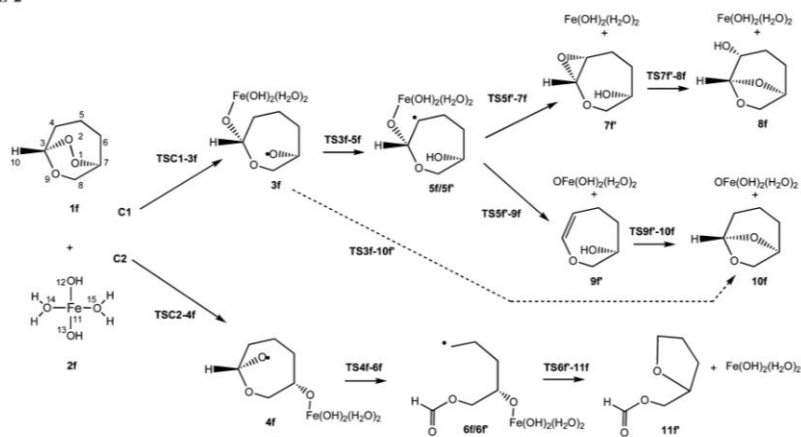
use of **1f** to model artemisinin is well-established in the literature,¹¹ it is convenient to provide additional evidence that the simple **2f** model can satisfactorily represent heme in what refers to the energetic and electronic aspects studied here. To this end, we have used heme with a water molecule coordinated to the iron atom (2-H₂O) to calculate some stationary points. A comparison of the results with those obtained when using **2f** is then offered.

The aim of the present work is to characterize the stationary points in the paths from **5f** to **8f** and **10f**, and from **6f** to **11f**, as shown in Scheme 2. The optimized structures are then characterized as minima or transition structures (TS) by means of a vibrational analysis. The transition structures have one and only one negative wavenumber, and this imaginary frequency is associated with the transition vector (TV)³⁴ that describes the atomic motion at TS. From each TS, the intrinsic reaction coordinate (IRC)²⁵ pathway to its associated minima has been calculated.

The calculations have been done by using density functional theory methods, as implemented in the *Gaussian03* package,²⁶ in particular, Becke's three-parameter functional²⁷ has been used for the exchange part and the nonlocal transformed correlation correction functional of Lee–Yang–Parr²⁸ for the correlation one. The 6-311+G (d,p) basis set has been applied in order to attain reliable results. The unrestricted (UB3LYP) formalism has been used, since the multiplicity is quintuplet for the global system. When using 2-H₂O instead of **2f**, the 3-21G basis set has been employed for all atoms except iron, for whom the LANL2DZ scheme has been used. This combination of basis sets makes possible both to achieve reasonable calculation times and to maintain a sound description for the iron atom.

Our second goal has been to obtain a topological description of the chemical interactions characterizing these molecules and explaining the reactive processes. We have used the approach proposed by Silvi and Savin,²⁹ which allows a classification of chemical bonds, based on a topological analysis of the ELF gradient field. The ELF gradient field maxima are called localization attractors. These attractors can be classified into two main groups: core and valence attractors. In turn, there are

SCHEME 2



two subgroups among the valence attractors: the monosynaptic (or nonbonding) and the disynaptic (or bonding) attractors. Therefore, the molecular space can be partitioned into basins, each of them representing a region of space traversed by the trajectories of the ELF gradient field which terminate at a given attractor. ELF is interpreted as a measure of the electron localization in atomic and molecular systems, as the conditional probability of finding two paired electrons. Values above 0.5 indicate a localized character, while values below 0.5 correspond to delocalized electron density. Graphical representations are obtained by plotting isosurfaces of the localization function domains of these attractors, where an isosurface $\eta(r) = f$ encloses points for which $\text{ELF} > f$. From a quantitative point of view, the method includes integration of the electron density over the basins to obtain the basin populations.

Another electron-density-based topological analysis which provides useful information on the bond structure is the AIM theory, developed by Bader and co-workers.^{30,31} With this theory, the main characteristics of the bonds which take part in each studied process have been evaluated by focusing on the properties of the corresponding bond critical points (BCP). The BCP properties we use are the charge density ($\rho(r)$), the electronic energy density ($E_d(r)$), and the Laplacian of the electron density ($\nabla^2\rho(r)$). The charge density is related to the bond strength: the higher this value is, the stronger the bond. The electronic energy density provides information about bond stability: highly negative values involve largely stable bonds. The Laplacian of the electron density values indicate concavity or convexity depending on its negative or positive value, respectively. Negative values of $\nabla^2\rho(r)$ evidence valence-shell charge concentration, while positive values mean valence-shell charge depletion. Thus, an unshared-electron (or electrostatic) interaction is characterized by low values of $\rho(r)$ and positive values of $\nabla^2\rho(r)$ in the BCP, whereas high values of $\rho(r)$ and negative values of $\nabla^2\rho(r)$ correspond to a shared-electron (or covalent) interaction.

The AIM and ELF studies have been carried out from the computed B3LYP/6-311+G(d,p) electron density, with the AIM2000³² and TopMoD³³ software packages, respectively. ELF isosurfaces have been visualized with the AMIRA 4.1 visualization program.³⁴ The graphical representation of ELF has been

carried out by considering an isosurface value (f) of 0.815 for all structures except 5f, TS5f-9f, 9f, 6f, and TS6f-11f. For these, a smaller value of 0.784 has been required to correctly visualize the basins. To visualize the monosynaptic basin associated with C4 (insets for 5f, see below), a value of $f = 0.665$ has been used. The color convention represents core basins in magenta, and the remaining valence basins are classified depending on their synaptic order: red for monosynaptic, green for disynaptic, and gray for hydrogenated basins. The MO analysis has also been done from the computed B3LYP/6-311+G(d,p) electron density, and GaussView 3.0³⁵ has been used to visualize and depict the molecular orbitals, using an isovalue of 0.05, as well as the spin density, using an isovalue of 0.001.

Results and Discussion

Experimental studies on artemisinin (1) decomposition reveal the formation of different species depending on the reaction conditions. By using FeSO₄ in aqueous CH₃CN, two major products (8 and 11) are obtained, in 67% and 25% yields, respectively, while 7 has been identified as a minor component (1–2% yield).²¹ On the other hand, if the cleavage of 1 is induced by FeBr₂ in THF/1,4-cyclohexadiene, three major products are formed, namely, 10, 11, and 8, in 71%, 16.7%, and 4.2% yields, respectively.²² All the experimental observations on the artemisinin decomposition have been taken into account in the unified mechanism proposed by Cumming²³ and Wu:²¹ an excerpt of such mechanism is offered in Scheme 1.

The process begins with the artemisinin endoperoxide bridge reduction mediated by Fe(II) species, like heme, thus giving rise to 3 if the mechanism takes place through O1-radical formation, or to 4 if the mechanism follows the O2-radical route. Once these O-radicals are formed, they evolve in different ways to render the indicated final products. From 3, a 1,5-H shift leads to the C-centered radical 5, which through several processes can attain the formation of 8 and 10. On the other hand, 4 rearranges to the C-radical 6, which is the precursor of the furane 11.

In previous studies with different molecular models, we have characterized the geometries and energies of the stationary points

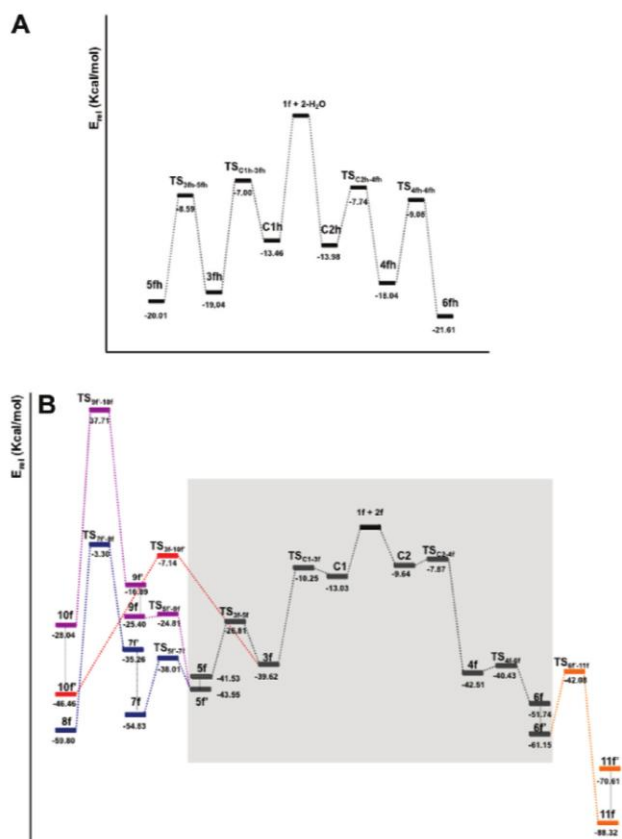


Figure 1. (a) Relative energy (kcal/mol) profile of the indicated stationary points. Total energy of the reference point (**1f** plus **2-H₂O**): -2482.023834 hartree. (b) Relative energy (kcal/mol) profile of the indicated stationary points. Total energy of the reference point (**1f** plus **2f**): -2028.772368 hartree.

involved along the potential energy surface for the whole artemisinin decomposition process.^{36,37} On the other hand, using the present models, the electronic rearrangements taking place in the reaction pathway associated with the formation of the C-radicals **5f** and **6f** (see Scheme 2) have been analyzed by means of the joint use of ELF and AIM tools.²⁰ In the present study, we report a topological analysis of the reaction steps that lead from the C-radicals to the formation of the final products.

Previously, to establish the appropriateness of the use of **2f** to represent heme in what refers to the energetic and geometric conclusions reached, we have used **2-H₂O** and **1f** as starting molecules to calculate the reaction pathways associated with the formation of the C-radicals modeling **5** and **6**, namely, **5fh** and **6fh**. All attempts using **2-H₂O** to conduct ELF and AIM analysis have been unsuccessful. The system size prevents its use even in single topological calculations, and hence, it was not possible to make a systematic characterization of the topology of the processes herein studied.

Revisiting the First Steps of the Process: Formation of **5fh** and **6fh**

When **2-H₂O** approaches **1f**, two interaction complexes can be formed, namely, **C1h** and **C2h**, depending on which oxygen atom interacts with the iron atom. Both complexes are found to be more stable than the starting reactants, and from these points, two transition structures yield the O-centered radicals **3fh** and **4fh**, of similar stability to each other, and more stable than the previous complexes. The activation barriers from the interaction complexes to the corresponding transition structures (**TSC1h-3fh** and **TSC2h-4fh**) are found to be relatively small. Finally, from the O-centered radicals, two new transition structures (**TS4fh-6fh** and **TS3fh-5fh**) render the C-centered radicals **6fh** and **5fh**, respectively. Among all these stationary points, the most stable one is **6fh**, as can be seen in Figure 1a, where the energetic profile for these steps is depicted.

A comparison of the results reported above with those calculated in our previous paper²⁰ by using **2f** (see the gray zone

Late Steps of Artemisinin Decomposition

J. Phys. Chem. B, Vol. 115, No. 2, 2011 337

of Figure 1b) can now be done. The numerical values obtained differ from one model to the other. It can be noticed that the energetic differences among the minima are smaller when using 2-H₂O. This is expected because the aromatic porphyrin cycle provides additional stability to the system, and the energetic differences from one point to another are small due to the fact that the heme moiety remains the same in all minima. On the other hand, the energetic barriers are slightly larger due to the same reason: the minima are additionally stabilized, and the conjugation is somewhat lost at the transition states. However, the main conclusions coincide by using either of the two models: the O-centered radicals are less stable than the corresponding C-centered radicals; the energies of these stationary points always lay under the energy of the starting separated species, and the most stable species is the one modeling **6**. Hence, from an energetic point of view, the use of **2f** renders the same main conclusions as the use of 2-H₂O.

On the other hand, the main geometric parameters found are not equal, but they are rather similar to the ones obtained by using the small model,²⁰ and the variations in its values are analogous. Hence, following the O1 radical route, the O1–O2 distance increases from 1.55 Å at **C1h** (1.49 Å at **C1**) to 1.79 Å at **TSC1h-3fh** (1.66 Å at **TSC1-3f**), and to 4.05 Å at **3fh** (3.57 Å at **3f**), while the H–C4 distance increases from 1.10 Å at **3fh** (1.10 Å at **3f**) to 1.37 Å at **TS3fh-5fh** (1.26 Å at **TS3f-5f**) and finally to 2.50 Å at **5fh** (2.58 Å at **5f**). At the same time, the H–O1 distance shortens from 2.09 Å at **3fh** (2.21 Å at **3f**) to 1.17 Å at the TS (1.29 by using the small model) and finally to 1.02 Å at **5fh** (0.97 at **5f**).

Following the O2 radical route, the O1–O2 distance increases from 1.55 Å at **C2h** to 1.79 Å at **TSC2h-4fh** and then to 4.08 Å at **4fh**, while the C3–C4 distance increases from 1.57 Å at **4fh** to 2.06 Å at **TS4fh-6fh** and finally to 4.60 Å at **6fh**. These distances are calculated to be 1.49, 1.63, 3.27, 1.63, 1.95, and 4.25 Å, respectively, when using **2f** as molecular model. Hence, from a geometric point of view, the use of **2f** renders very similar descriptions to the use of 2-H₂O.

O1 Radical Route: Formation of 8f

After the formation of **5f**, which is 41.53 kcal/mol more stable than the starting separated reactants **1f** and **2f** (see Figure 1b, where the energetic profile is depicted), a slight conformational change takes place leading to **5f'**, 43.55 kcal/mol below the reactants, and the nonradical molecule **8f**, that models the 3-hydroxi-deoxi-artemisinin **8**, is then formed via a two-steps mechanism. In the first step of the process, the secondary C-radical **5f'** evolves through the transition state **TSS5f'-7f'**, that presents a relative energy of –38.01 kcal/mol, to render the epoxide with the Fe(II)-species coordinated to the epoxide oxygen (**7f**). The relative energy of **7f** is –54.83 kcal/mol. Thereafter, the elimination of the Fe(II)-species causes a logical energy increase, due to the loss of the Fe–O interaction, from **7f** to **7f'**, that stands 35.26 kcal/mol below the starting reactants. Then, **7f'** gives rise to **8f**, whose relative energy is –59.80 kcal/mol, via the four-centered transition state **TS7f'-8f**, which presents a relative energy of –3.30 kcal/mol. As expected, **8f** is the most stable species along this reaction pathway, and all stationary points found from the starting separated reactants to the final products **8f** plus the Fe(II) complex stand below the energy of the reactants. Therefore, the **8f** formation is straightforward once the process is initiated. These results nicely explain the experimentally observed outcome of the final product modeled by **8f**, i.e., the production of **8**, in the artemisinin decomposition. In addition, the energetic profile in Figure 1b

reveals that the largest barrier to be surmounted in the pathway to **8f** is the passage through **TS7f'-8f**, and hence, it is reasonable to expect some accumulation of the previous intermediate, i.e., of **7f'**. This is experimentally confirmed by the detection of **7** in some experiments in small quantities.²¹

The geometric changes taking place in the first step of the reaction involve the O2 and C4 atoms that approach each other until the epoxide **7f** is formed (see Figure 2). The distance between these atoms is 2.37 Å in **5f'**, 2.03 Å in **TSS5f'-7f'**, and 1.49 Å in **7f**. Simultaneously, the O2–Fe bond breaks, showing distances of 1.84 Å, 1.96 Å, and 2.23 Å at **5f'**, **TSS5f'-7f'**, and **7f**, respectively. In the second step, **7f'** gives rise to **8f**, and four bonds participate in the reaction: the hydrogen atom moves from O1 to O2, and its distance to O1 varies from 0.97 Å in **7f'** to 1.20 Å and 2.34 Å at **TS7f'-8f** and **8f**, respectively. The H approaching O2 to form another alcohol group can be noted by the H distance to O2 that evolves from 2.14 Å in **7f'** to 1.23 Å in the transition structure and finally to 0.97 Å at the product **8f**. In addition, the distance between O2 and C3 enlarges as the reaction advances, being 1.44 Å at **7f'**, then 2.24 Å at **TS7f'-8f**, and finally 2.41 Å at **8f**. At the same time, a bond between O1 and C3 is formed as the reaction proceeds: the distances are 3.35 Å, 2.53 Å, and 1.42 Å going from the reactants to the product, through the transition state.

The ELF study of this reaction provides information about the electronic rearrangements that take place until **8f** is formed (see Figure 3a,b). The radical **5f'** presents a monosynaptic basin populated with 0.34 electrons in C4 (see the inset in Figure 3a), thus giving support to the C-radical character of the molecule. This basin disappears from **TSS5f'-7f'** on, because the rest of the molecules until **8f** do not have unpaired electrons on the carbon atom. In **5f'**, there is a dysynaptic basin between Fe and O2 with a population of 6.21 electrons, showing the bond between these atoms. In **TSS5f'-7f'**, two dysynaptic basins with populations of 2.84 and 3.24 electrons are located between these core atoms, showing the diminution of the bond strength. In **7f**, there is a dysynaptic basin of 2.65 electrons between these atoms and a monosynaptic basin of 2.74 electrons located in O2, reflecting a further diminution of the bond strength. In this structure, there is a dysynaptic basin between O2 and C4 with a population of 0.91 electrons that represents the epoxide formed by O2.

In the second step of the reaction (Figure 3b), **7f'** shows a dysynaptic basin of 1.09 electrons between O2 and C3, which is not present in **TS7f'-8f** and **8f** due to the bond scission. The hydrogenated basin next to the O1 core atom has a population of 1.75 electrons in **7f'** and becomes much less populated (0.38 electrons) in the transition state, where it is located between O1 and O2. This can be explained because the hydrogen is midway between the donor and the acceptor atoms, and the oxygen atoms withdraw the hydrogen electron density. In **8f**, this basin is populated with 1.74 electrons and belongs to O2, while a dysynaptic basin of 1.35 electrons appears between O1 and C3.

On the other hand, the MO analysis and the spin density description provide direct evidence for the location of the radicals during the reaction steps, and therefore reveal the physical background for the reaction mechanisms (see Figure 4a,c,d). As can be seen from Figure 4a, the spin density at **5f'** accumulates mainly at the C4 and at the iron atom and its coordination sphere. This is what can be expected because the molecule is a C4-radical. Furthermore, the HOMO is centered at C4, confirming that the unpaired electron will be associated to this atom and would occupy the HOMO. As further evidence

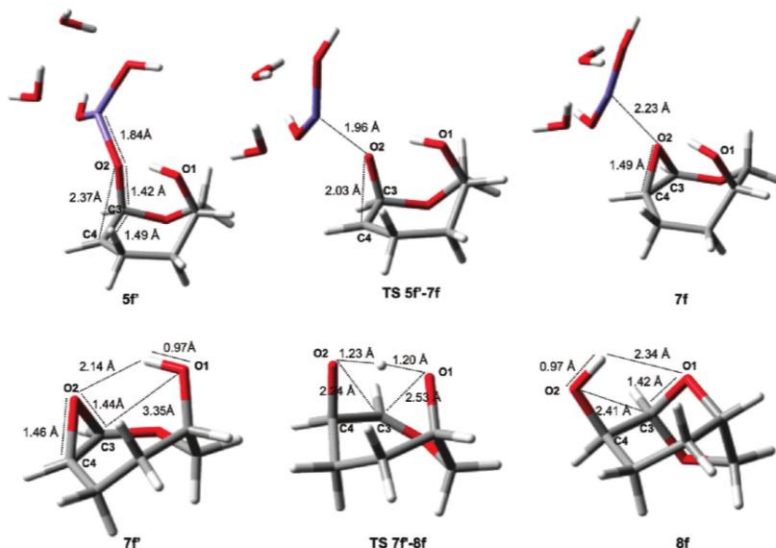


Figure 2. Structures of the indicated stationary points. Selected distances (angstroms) are included.

of the appropriateness of using the **2f** modeling here, we also depict the spin density and the HOMO of **5fh** in Figure 4b. As can be seen, the spin density accumulates at C4 and at the Fe atom, and the HOMO is mainly associated with the unpaired electron at C4. Hence, the conclusions are the same whatever the model.

At the **TS 5f-7f**, the spin density and the HOMO exhibit a very similar shape to **5f**: both are still mainly associated with the unpaired electron at C4. From these data, it can be concluded that the TS has an early character. This is confirmed by the AIM analysis of the O2–C4 BCP (see below).

The AIM theory is a helpful tool to analyze the main characteristics of the bonds of each reaction step by examining the properties of the BCPs (Table 1). The epoxide **7f** formation from the C-radical **5f** can be explained by O2–Fe bond cleavage and O2–C4 bond formation. The BCP found between O2 and Fe atoms in **5f** has a $\rho(r)$ of 0.123 au, while for **TSSf-7f**, this value decreases to 0.087 au and to 0.044 au in **7f**. $E_d(r)$ for this BCP shows negative values of -0.027 au in **5f** and -0.007 au in the transition state and the positive value of 0.001 au in **7f**. The $\nabla^2\rho(r)$ for this BCP is positive for the three structures, so it is located in a charge depletion region, although it becomes less positive when going from **5f** to **7f**, showing a value of 0.659 au in **5f**, 0.504 au in the transition state, and 0.233 au in **7f**. These parameters demonstrate that the O2–Fe bond is not very strong and has an ionic character in **5f**, and confirm that the Fe atom is weakly complexed to O2 in **7f**. Regarding the O2–C4 reaction coordinate, no BCP has been found between these atoms either in **5f** or in **TSSf-7f**, while it appears in **7f** with a value of 0.214 au for $\rho(r)$, -0.217 au for $E_d(r)$, and -0.154 au for $\nabla^2\rho(r)$, which gives support to the bond formation and reveals that the TS has early character with respect to this bond formation, in agreement with the large O2–C4 distance (2.03 Å) at the TS.

In **7f**, a BCP between O2 and C3 atoms has been located, with a $\rho(r)$ of 0.248 au, an $E_d(r)$ of -0.292 au and a $\nabla^2\rho(r)$ of

-0.374 au, showing that the epoxide is formed. In **TS7f-8f** and **8f**, the BCP between these atoms does not appear, because the epoxide bond opens. In accordance with this, as can be seen in Figure 2, the corresponding C3–O2 distance is 2.24 Å at the TS. The BCP found between O1 and H, shows that the alcohol bond is formed in **7f**, as the properties of the BCP confirm: $\rho(r)$ is 0.361 au, $E_d(r)$ is -0.697 au, and $\nabla^2\rho(r)$ is -2.502 au. In **TS7f-8f**, this bond becomes weaker: its corresponding BCP has a $\rho(r)$ of 0.179 au, an $E_d(r)$ of -0.172 au, and a $\nabla^2\rho(r)$ of -0.310 au, and in **8f**, this bond does not exist, since no BCP has been found between O1 and H. A hydrogen bond between O2 and this H can be sensed at **7f**, and hence, a BCP is found between these atoms, with values of 0.018 au for $\rho(r)$, 0.001 au for $E_d(r)$, and 0.060 au for $\nabla^2\rho(r)$. In **TS7f-8f**, this interaction becomes slightly stronger, with values of 0.167 au for $\rho(r)$, -0.145 au for $E_d(r)$, and -0.207 au for $\nabla^2\rho(r)$, whereas in **8f**, the O2–H bond is formed, as the BCP properties indicate, with values of 0.364 au for $\rho(r)$, -0.696 au for $E_d(r)$, and -2.490 au for $\nabla^2\rho(r)$. In **TS7f-8f**, a BCP between O1 and C3 has been found, describing a very weak interaction, with values of 0.025 au for $\rho(r)$, 0.001 au for $E_d(r)$, and 0.075 au for $\nabla^2\rho(r)$, in accordance with the very long distance of 2.53 Å. In **8f**, this BCP shows values of 0.264 au for $\rho(r)$, -0.343 au for $E_d(r)$, and -0.584 au for $\nabla^2\rho(r)$, resulting in a stable bond.

O1 Radical Route: Formation of **10f**

Another two-step mechanism from the C-radical **5f** can give rise to the final product **10f**, which is a model of the deoxiartemisinin **10**, a compound experimentally obtained in the artemisinin decomposition.²² The first step leads to the species **9f**, with a relative energy of -25.40 kcal/mol, via the **TSSf-9f** that has a relative energy of -24.81 kcal/mol (see Figure 1b). This step is less favorable than the previously explained formation of **7f**, both from a thermodynamic and a kinetic point of view. From **9f**, the elimination of the Fe(IV)

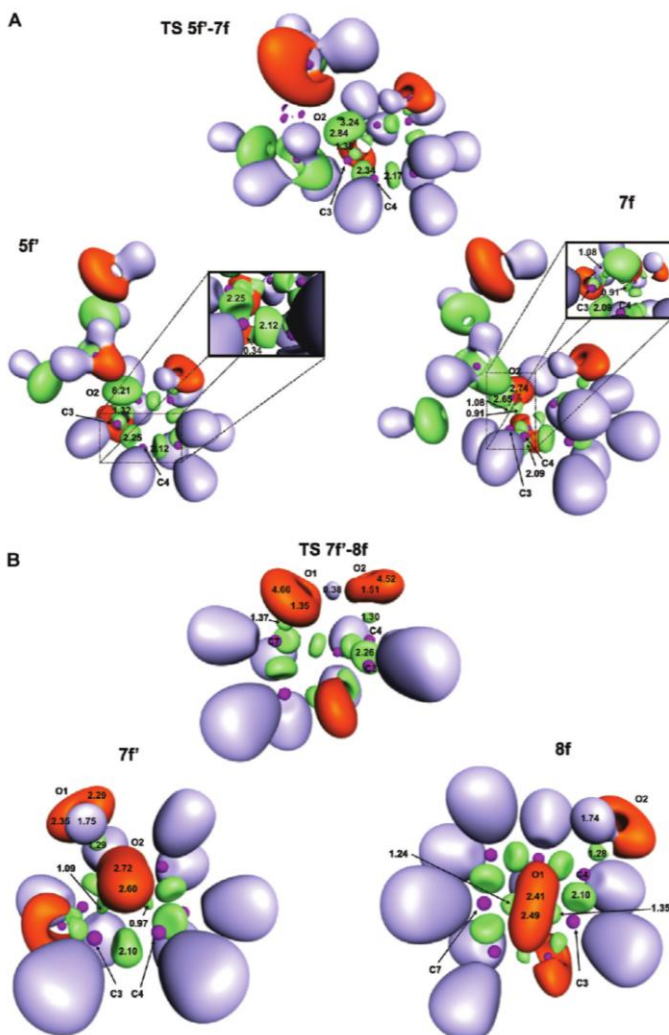


Figure 3. (a) ELF isosurfaces for **5f'**, **TS5f'-7f**, and **7f**. (b) ELF isosurfaces for **7f'**, **TS7f'-8f**, and **8f**.

species can give **9f'**, and the sum of the energies of **9f'** and the $\text{OFe}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ species stands 16.89 kcal/mol below the reactants. In the second reaction step, the four-centered **TS9f'-10f**, 37.71 kcal/mol less stable than the starting reactants, precedes the final product **10f**, whose relative energy is -28.04 kcal/mol. From these values, it can be concluded that the path leading to **10**, as proposed in the bibliography, is very unfavorable, mostly if compared with the path leading to **8**, and it is very difficult to explain how **10** can be obtained as the main product of artemisinin decomposition in some cases.²² Furthermore, due to the high energy barrier calculated going from **9f'** to **10f**, some accumulation of intermediate **9f'**, that

models the alquene **9** (see Scheme 1), should be expected. However, to the best of our knowledge the experimental detection of **9** in the artemisinin decomposition experiments has never been reported.

Therefore, we have explored a mechanistic alternative: a direct Fe(IV)-species elimination from **3f**, to render **10f**. In this way, we have found a transition structure that opens a new mechanistic route, not proposed before, to the formation of **10**. The **TS3f-10f'** lays 7.14 kcal/mol below the starting separated reactants, and from this point, the species **10f'**, 46.46 kcal/mol under the energy of the reactants, can be found. The species **10f'** corresponds to **10f** complexed with the Fe(IV) species, with

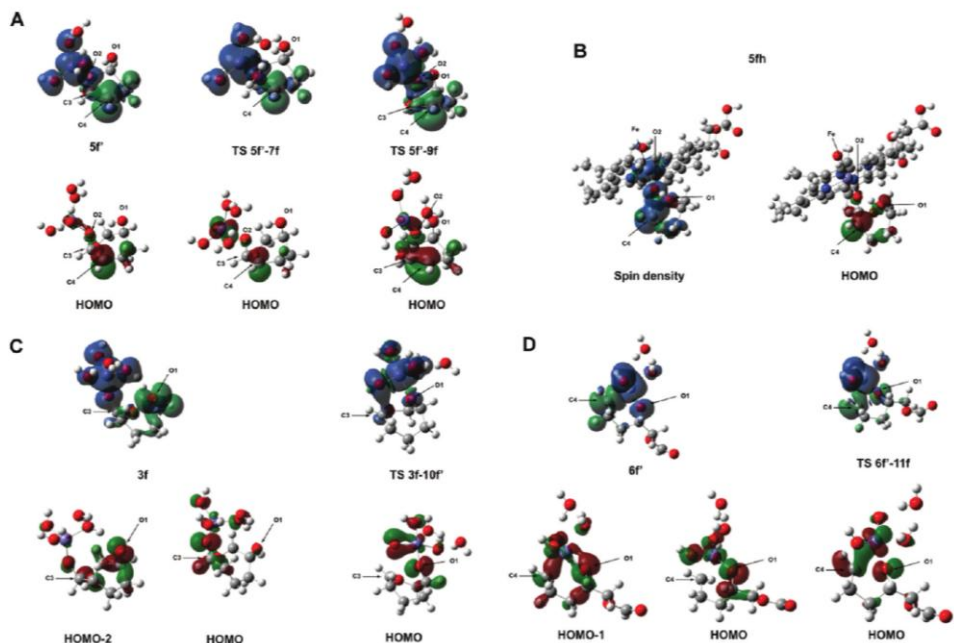


Figure 4. (a) Upper row: spin density of the indicated stationary points; the green regions correspond to negative spin density while blue zones correspond to positive spin density. Lower row: selected molecular orbitals of the indicated stationary points. (b) Spin density and HOMO of **5fh**. (c) Upper row: spin density of the indicated stationary points. Lower row: selected molecular orbitals of the indicated stationary points. (d) Upper row: spin density of the indicated stationary points. Lower row: selected molecular orbitals of the indicated stationary points.

a strong interaction between the Fe and the O1 atoms. The Fe(IV) species departure produces an energy increase to finally obtain **10f**. It should be pointed out that all the stationary points found in this new pathway lay under the energy level of the starting reactants, and hence, the product formation is again straightforward once the process is initiated. This alternative path would avoid the passage through the species modeling **9**, and this would explain why such a species has never been experimentally identified. Furthermore, it should be noted that the **TS3f-10f'** has an energy value very similar to that of the **TS7f'-8f**. This fact suggests some competition between the pathway leading to **10** and the pathway leading to **8**, and in fact from the experimental data, it is deduced that the predominant formation of one product or another depends mainly on the experimental conditions.

As indicated above, the path proposed in the bibliography to explain the appearance of **10** starts from **5** and involves O2–C3 scission, with C3–C4 double bond formation and Fe(IV) species departure (see Figure 5a). The O2–C3 distance is 1.42 Å in **5f'**, and evolves to 2.09 Å in **TS5f'-9f** and 2.44 Å in **9f**, where the dihydrated O=Fe(IV)(OH)₂ stays complexed with the alkyne. On the other hand, the C3–C4 distance shortens from 1.49 Å in **5f'** to 1.39 Å in **TS5f'-9f** and 1.37 Å in **9f**. In the second step, the O1–H distance increases as the reaction advances, from 0.96 Å in **9f'**, to 1.83 Å in **TS9f'-10f**, and 2.64 Å in **10f**. At the same time, O1–C3 and H–C4 distances shorten with the process, being 2.68 Å and 1.14 Å, respectively, at **TS9f'-10f** and 1.42 Å and 1.10 Å, respectively, at **10f**. Moreover,

the C3–C4 bond evolves from double to single, and hence, this distance is 1.34 Å in **9f'**, 1.45 Å at the transition state, and 1.53 Å in **10f**.

The study of the ELF evolution is presented in Figure 6a,b for the path proposed in the bibliography. As can be seen, **5f'** has a disynaptic basin between O2 and C3 populated with 1.32 electrons, which disappears in **TS5f'-9f** and **9f** as a consequence of the O2–C3 bond scission. The disynaptic basin found between O2 and Fe has a population of 6.21 electrons in **5f'**, and it increases to 7.14 electrons in the transition state and 7.13 in **9f**, thus reflecting the electron transfer to the iron atom from the O2–C3 cleavage. The disynaptic basin located between C3 and C4 has 2.25 electrons in **5f'** and increases in the transition state and **9f** to 3.06 and 3.19 electrons, respectively, due to the formation of the double bond. Precisely the formation of the C3–C4 double bond is the main feature of the HOMO at **TS5f'-9f**, as can be seen in Figure 4a. The spin density that has been found to accumulate on C4 at **5f'**, is slightly delocalized from C4 to C3 at the TS, showing that the double bond begins to be formed, in agreement with the ELF and AIM (see below) results.

In the second step (Figure 6b), the hydrogen transfer from O1 to C4 is reflected by the evolution of the hydrogenated basin found next to O1 in **9f'** and populated with 1.73 electrons. As can be seen, this basin increases its population to 1.87 electrons and is placed between O1 and C4, at **TS9f'-10f**, while at **10f**, it is located next to C4 with a population of 2.02 electrons. Although in **9f'** and **TS9f'-10f** there is not a disynaptic basin between O1 and C3, it appears at **10f** with a population of 1.36

Late Steps of Artemisinin Decomposition

J. Phys. Chem. B, Vol. 115, No. 2, 2011 341

TABLE 1: Electronic Properties for the Bond Critical Points (BCP) Participating in the Reactions^a

	bond	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$E_d(r)$
5f	O2-C4	-	-	-
	O2-Fe	0.123	0.659	-0.027
	O2-C3	0.262	-0.551	-0.342
	C3-C4	0.267	-0.660	-0.230
TS 5f-7f	O2-C4	-	-	-
	O2-Fe	0.087	0.504	-0.007
7f	O2-C4	0.214	-0.154	-0.217
	O2-Fe	0.044	0.233	0.001
7f	O2-C3	0.248	-0.374	-0.292
	O1-H	0.361	-2.502	-0.697
TS7f-8f	O2-H	0.018	0.060	0.001
	O1-C3	-	-	-
	O2-C3	-	-	-
	O1-H	0.179	-0.310	-0.172
8f	O2-H	0.167	-0.207	-0.145
	O1-C3	0.025	0.075	0.001
	O2-C3	-	-	-
	O1-H	-	-	-
TS 5f-9f	O2-H	0.364	-2.490	-0.696
	O1-C3	0.264	-0.584	-0.343
	O2-C3	0.056	0.149	-0.003
	C3-C4	0.313	-0.879	-0.325
9f	O2-C3	-	-	-
	C3-C4	0.322	-0.922	-0.347
	C3-C4	0.340	-0.993	-0.389
	O1-H	0.366	-2.476	-0.694
9f	O1-C3	-	-	-
	C4-H	-	-	-
	C3-C4	0.281	-0.738	-0.274
	O1-H	0.041	0.132	0.000
TS 9f-10f	O1-C3	-	-	-
	C4-H	0.246	-0.753	-0.224
	C3-O2	0.286	-0.471	-0.406
	O1-C3	-	-	-
3f	Fe-O1	-	-	-
	Fe-O2	0.118	0.687	-0.023
TS 3f-10f	C3-O2	0.027	0.090	0.002
	O1-C3	0.028	0.086	0.000
	Fe-O1	0.103	0.493	-0.015
	Fe-O2	0.206	0.780	-0.113
10f	C3-O2	-	-	-
	O1-C3	0.243	-0.475	-0.302
	Fe-O1	0.054	0.272	0.001
	Fe-O2	0.223	0.829	-0.135
10f	bond	$\rho(r)$	$\nabla^2\rho(r)$	$E_d(r)$
	C3-C4	0.252	-0.595	-0.205
	O1-H	-	-	-
	O1-C3	0.267	-0.606	-0.348
6f	C4-H	0.274	-0.907	-0.270
	O1-Fe	0.130	0.654	-0.032
	C4-O1	-	-	-
	O1-Fe	0.082	0.422	-0.006
TS 6f-11f	C4-O1	0.071	0.129	-0.010
	O1-Fe	0.047	0.256	0.001
11f	C4-O1	0.231	-0.358	-0.285
	C4-O1	0.249	-0.470	-0.317

^a Electron density, $\rho(r)$ (atomic units), laplacian of the electron density, $\nabla^2\rho(r)$ (atomic units), and electronic energy density, $E_d(r)$ (atomic units).

electrons, due to the O1-C3 bond formation. On the other hand, the C3-C4 bond evolves from double, at **9f**, to single bond along the reaction path to **10f**, and this can be sensed by following the evolution of the disynaptic basin between these atoms. The sum of the populations of the two disynaptic basins

(for the double bond) found between C3 and C4 at **9f** is 3.68 electrons, and decreases to 2.30 and 2.02 electrons in **TS9f-10f** and **10f**, respectively, where only one basin is found between these atoms.

By using the AIM theory (see Table 1), it has been found that the BCP located between O2 and C3 atoms has a $\rho(r)$ of 0.262 au in **5f** and of 0.056 au in **TS5f-9f**, while the corresponding BCP has not been found in **9f**, since the bond has been completely broken. The bond scission can be explained also by the $E_d(r)$ of this BCP, with a value of -0.342 au in **5f** and -0.003 au in **TS5f-9f**, as well as by $\nabla^2\rho(r)$, which shows that the BCP is located in a charge accumulation region in **5f** (-0.551 au) and in a charge depletion zone in **TS5f-9f** (0.149 au). On the other hand, the increase of the C3-C4 bond strength is shown by increasing the $\rho(r)$ value, and the increase of the negative values of $\nabla^2\rho(r)$ and $E_d(r)$, when going from **5f** to **9f** (see the values in Table 1).

As for the second step of the process, in **9f** a BCP between O1 and H is found, whose properties show that the alcohol bond is formed: $\rho(r)$ is 0.366 au, $E_d(r)$ is -0.694 au, and $\nabla^2\rho(r)$ is -2.476 au. In **TS9f-10f**, this BCP has a $\rho(r)$ of 0.041 au, an $E_d(r)$ of 0.000 au, and a $\nabla^2\rho(r)$ value of 0.132 au, thus reflecting that the alcohol bond is being broken. In **10f**, the corresponding BCP does not exist, because the O1-H bond has disappeared. On the other hand, the BCP located between C3 and C4, which corresponded to a double bond in **9f**, shows that the bond is weaker at **TS9f-10f**, because $\rho(r)$ is lower than at **9f**, and $E_d(r)$ and $\nabla^2\rho(r)$ are less negative. Finally, at **10f** this bond is simple and the corresponding values are 0.252 au for $\rho(r)$, -0.205 au for $E_d(r)$, and -0.595 au for $\nabla^2\rho(r)$.

In **TS9f-10f**, there is a BCP between C4 and the H which is being transferred from O1 to C4, with values of 0.246 au for $\rho(r)$, -0.224 for $E_d(r)$, and -0.753 au for $\nabla^2\rho(r)$. This BCP shows that the bond is formed at **10f**, as indicated by the values of 0.274 au for $\rho(r)$, -0.270 au for $E_d(r)$, and -0.907 au for $\nabla^2\rho(r)$. A comparison of the values between **TS9f-10f** and **10f** makes apparent the late character of the TS, in what refers to this bond, as can also be noted by the short C4-H distance of 1.14 Å. However, the TS can be described as asynchronous, because the O1-C3 distance is long, in accordance with the lack of a BCP between these atoms, and hence, the TS has an early character in what refers to the O1-C3 bond. In **10f**, the BCP between O1 and C3 does appear, representing the bond formation. The $\rho(r)$ value is 0.267 au, the $E_d(r)$ value is -0.348 au, and the $\nabla^2\rho(r)$ value is -0.606 au.

The direct path proposed here linking **3f** with **10f** is depicted in Figure 5b. As can be seen, the O1 atom approaches C3 as the reaction takes place: the distance evolves from 3.49 Å at **3f** to the final value of 1.42 Å at **10f**. At the transition structure, the distance is 2.45 Å, and at **10f**, the corresponding value is 1.45 Å. At the same time, the O2-C3 distance enlarges from 1.38 Å at **3f** to 3.13 Å at **10f** because this bond breaks. Interestingly, the Fe atom, initially linked to O2 by a distance of 1.83 Å, and far from O1 (at 3.97 Å distance) approaches the latter oxygen atom, and a distance of 1.91 Å between Fe and O1 is obtained at the TS. The Fe(IV) species then departs, while the bicyclic structure **10f** closes, although at **10f**, there is still a strong interaction between Fe and O1.

The ELF analysis is depicted in Figure 6c. As can be seen, in **3f** there is a disynaptic basin between O2 and C3 populated with 1.36 electrons, showing that these atoms are bonded. In **TS3f-10f** and in **10f**, there is no basin between these atoms, which evidences the bond cleavage. The O1-C3 bond formation becomes obvious in the product **10f**, because a disynaptic basin

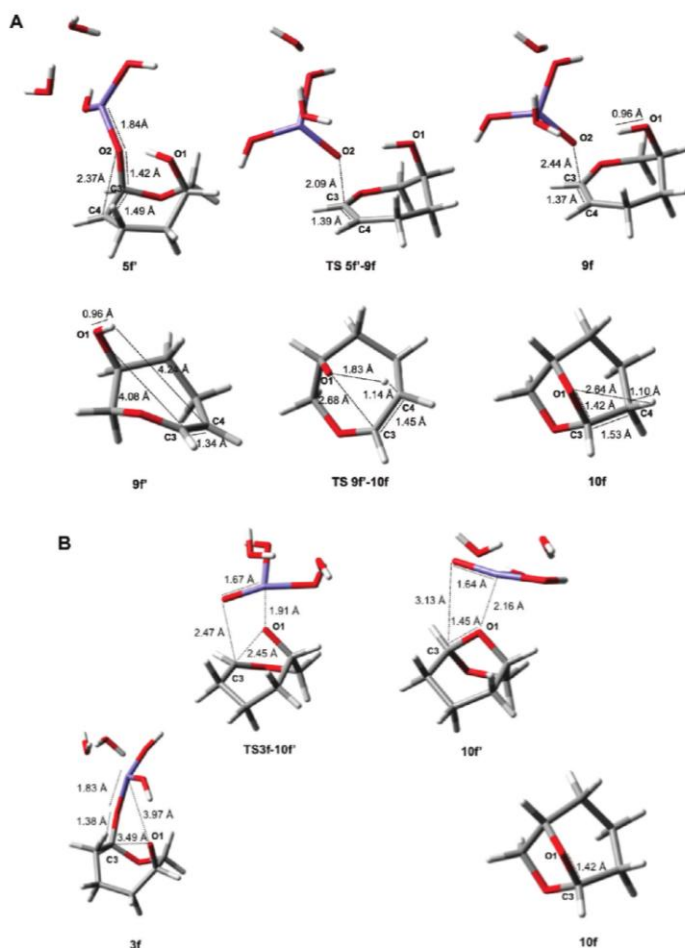


Figure 5. (a) Structures of the indicated stationary points. Selected distances (angstroms) are included. (b) Structures of the indicated stationary points. Selected distances (angstroms) are included.

with 1.33 electrons in the population appears in this structure. Nevertheless, in **3f** and **TS3f-10f'** this basin does not exist. In **3f**, the disynaptic basin between Fe and O2 has a population of 6.14 electrons, and in the **TS3f-10f'**, the population of the basins between Fe and O2 increases to a total value of 6.87 electrons. Since the Fe locates between both oxygen atoms (O1 and O2) in the transition state, a disynaptic basin of 1.35 electrons between O1 and Fe appears. In **10f'**, the basin between Fe and O2 has a bigger population (7.04 electrons) attributed to the Fe–O2 double bond formation. In **10f'**, the Fe atom stays coordinated to O1, but there is no basin between them, and O1 shows two unshared basins populated with 2.57 and 2.34 electrons in each one.

The spin density, depicted in Figure 4c, accumulates on O1 at **3f**, showing its O-radical character. At the TS, however, very little spin density remains on O1 because, as stated above, the

Fe atom strongly interacts with O1, which, at the same time, approaches C3 to form the O1–C3 bond. It can be seen that the HOMO at the TS is associated with the Fe–O2 double bond formation, with some participation of O1 p-type orbital. At the O-radical **3f**, the unpaired electron on O1 occupies the HOMO-2 orbital, while the HOMO is related with some C3–O2 antibonding interaction that would facilitate the breaking of this bond.

The AIM study of this reaction step also describes the same tendencies as the ELF, since in **3f**, there is a BCP between C3 and O2 atoms whose $\rho(r)$ is 0.286 au, while in **TS3f-10f'**, this value decreases to 0.027 au and the BCP does not appear in **10f'**, because the bond is broken in this structure. The bond is more stable in **3f** than in **TS3f-10f'**, as is shown by the values of -0.406 au and 0.002 au for $E_d(r)$, respectively. The $\nabla^2\rho(r)$ of this BCP is negative at **3f**, so it is located in a charge

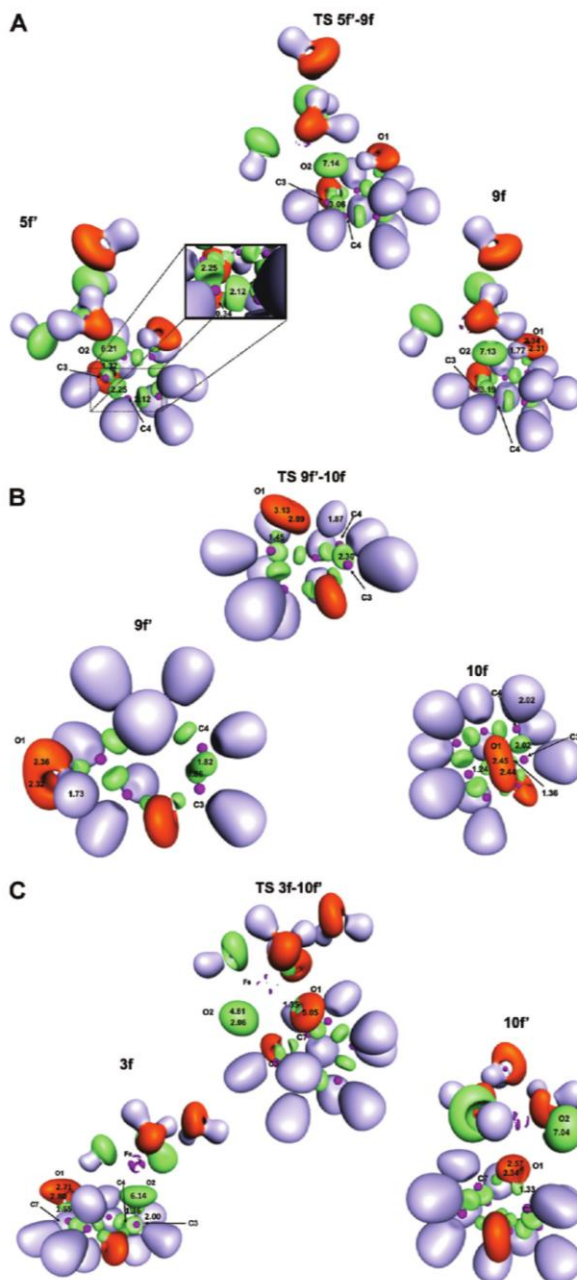


Figure 6. (a) ELF isosurfaces for 5f, TS5f-9f, and 9f. (b) ELF isosurfaces for 9f, TS9f-10f, and 10f. (c) ELF isosurfaces for 3f, TS3f-10f, and 10f.

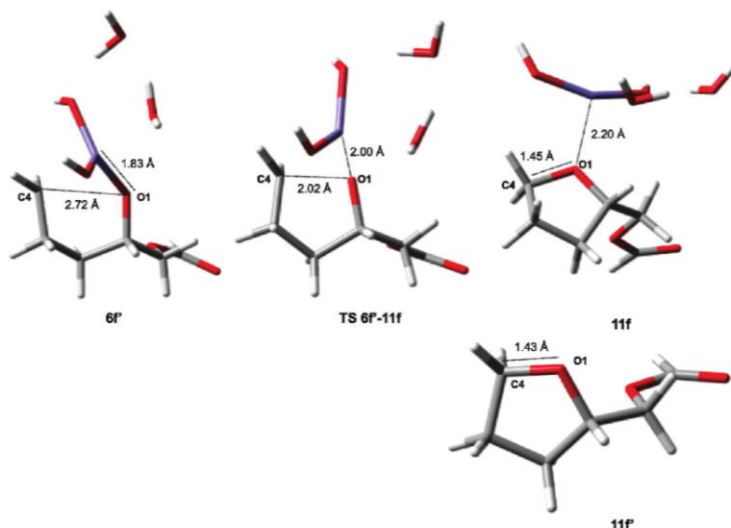


Figure 7. Structures of the indicated stationary points. Selected distances (angstroms) are included.

concentration region, while at **TS3f-10f**, it is positive and located in a charge depletion region. The O1–C3 bond is very weak in **TS3f-10f**, as the small value of $\rho(r)$ (0.028 au), the null value of $E_s(r)$, and the positive value of $\nabla^2\rho(r)$ (0.086 au) show. The formation of this bond is demonstrated by the BCP which exists in the product **10f** with a $\rho(r)$ value of 0.243 au, a negative $E_s(r)$ of -0.302 au, and a $\nabla^2\rho(r)$ located in a charge concentration region with a value of -0.475 au. This BCP is not present at **3f**. The BCP located between O2 and Fe has a $\rho(r)$ of 0.118 au in **3f** and increases to 0.206 au in **TS3f-10f** and to 0.223 au in **10f**, as it evolves from single to double bond character. $E_s(r)$ of this BCP shows the same trend, as its values are -0.023 au, -0.113 au, and -0.135 au at **3f**, **TS3f-10f**, and **10f**, respectively. The $\nabla^2\rho(r)$ parameter of this BCP has positive values for the three structures (0.687 au for **3f**, 0.780 au for **TS3f-10f**, and 0.829 au for **10f**), it is located in a charge depletion region in all cases, but the bigger value in **10f** shows that the O–Fe bond formed has ionic character. To achieve the suitable geometry to go from **3f** to **10f**, a BCP between O1 and Fe appears in the **TS3f-10f**, with a $\rho(r)$ of 0.103 au, an $E_s(r)$ of -0.015 au, and a $\nabla^2\rho(r)$ of 0.493 au. In **10f**, the values of this BCP show the Fe is coordinated to O1 more weakly, as it has a $\rho(r)$ of 0.054 au, a $E_s(r)$ of 0.001 au, and a $\nabla^2\rho(r)$ of 0.272 au.

O2 Radical Route: Formation of **11f**

The O2-radical route leads to the formation of the C-radical **6**, which is the precursor of the product **11**, the experimentally characterized ring contracted THF-acetate.^{21,22} We have modeled the reaction with a previous step, in which **6f**, whose relative energy is -51.74 kcal/mol, renders **6f** by means of a conformational change (see Figure 1b). The last species lays 61.15 kcal/mol below the starting reactants. From this point, **11f** is found 88.32 kcal/mol more stable than the reference starting reactants. The mechanism involves the four-centered transition state **TS6f-11f**, whose relative energy is -42.08 kcal/mol.

Finally, the Fe(II) species release renders **11f**, and the sum of the energies of **11f** and the Fe(OH)₂(H₂O)₂ species lays 70.61 kcal/mol below the starting reactants. Among the studied final products, **11f** is preferably obtained, from both a thermodynamic and a kinetic point of view: it is the most stable species, and the energetic barriers that have to be surmounted are smaller in the case of the O2-radical route. However, all the stationary points found for both the O1 and O2 radical routes are calculated to lay under the energy of the separated reactants, and hence, the outcome of the artemisinin decomposition products is predicted to depend mainly on the experimental conditions. The calculation results suggest that it is possible to find any of the three final products, as is experimentally confirmed.^{21,22}

The chemical changes that take place in this reaction step involve O1–C4 bond formation simultaneously with O1–Fe bond breaking. As can be seen in Figure 7, the O1 and C4 atoms are 2.72 Å far from each other at **6f**, while they are closer at **TS6f-11f** (2.02 Å) and they are linked at **11f**, with a bond length of 1.45 Å. At **11f**, this distance is 1.43 Å. The O1–Fe distance is 1.83 Å in **6f** and evolves to 2.00 Å in **TS6f-11f** and to 2.20 Å in **11f**, where the iron atom is still coordinated to O1.

The ELF analysis (Figure 8) reveals the existence of a disynaptic basin between the O1 and Fe cores in **6f**, which is populated with 6.10 electrons and makes the bonding apparent. In **TS6f-11f**, the disynaptic basin between these atoms has a population of 2.66 electrons, and a monosynaptic basin of 3.25 electrons appears that is constituted by the unshared electron pairs of O1. This means that the O1–Fe bond weakens at the transition state. In the product **11f**, there is no O1–Fe link, since no disynaptic basin has been found between these atoms. The C-radical character in **6f** is demonstrated by the disynaptic basin located between C4 and Fe, which shows that the excess of charge is in this region and that C4 is coordinated to the Fe atom. In the transition state and **11f**, this basin is not present. The bond between O1 and C4 is evidenced by the disynaptic

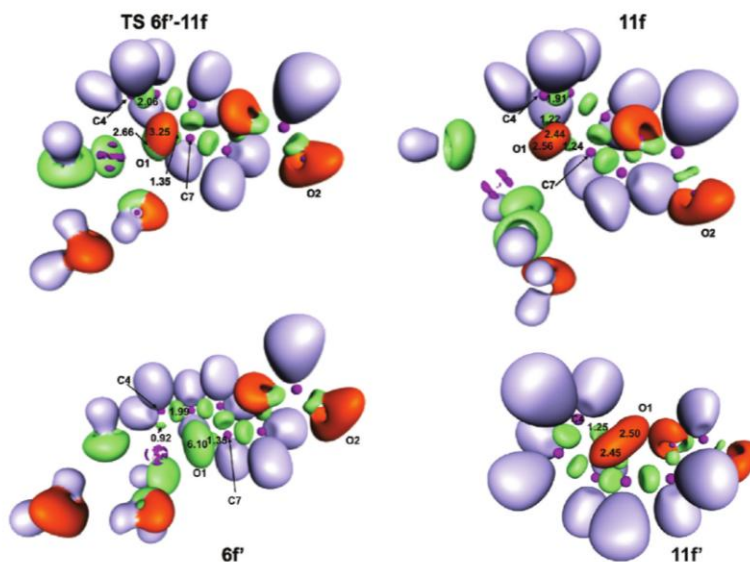


Figure 8. ELF isosurfaces for $6f$, $TS6f-11f$, $11f$, and $11f'$.

basin, populated with 1.22 electrons, which appears in $11f$ between these atoms, being 1.25 electrons at $11f'$.

The spin density depicted in Figure 4d for $6f$ shows that the spin accumulates at C4, according to the C4 radical character of the molecule, and also accumulates at the Fe and its coordination sphere. At $TS6f-11f$, the C4 radical character can still be viewed, because the TS has an early character with respect the C4–O1 bond formation. As for the MO, the HOMO of the TS accounts for the residual C4 radical character, while at $6f$, it is the HOMO-1 which can accommodate the unpaired electron on C4, although the Fe–O1 interaction is also described by this orbital. The HOMO of $6f$ is mainly associated with a O1 p-type orbital.

The AIM theory describes the Fe–O1 bond scission with $\rho(r)$ values of 0.130 au in $6f$, 0.082 au in $TS6f-11f$, and 0.047 au in $11f$. $E_s(r)$ of this BCP has the value of -0.032 au in $6f$, -0.006 au in the transition state, and 0.001 au in $11f$. $\nabla^2\rho(r)$ values (0.654 au in $6f$, 0.422 au in $TS6f-11f$, and 0.256 au in $11f$) show that the BCP is located in a charge depletion region for the three molecules. The same behavior was observed for the O2–Fe bond in the reaction which renders $7f$ from $5f$. This is attributed to the ionic character of the Fe–O bond. A BCP between C4 and O1 atoms appears in $TS6f-11f$, with a $\rho(r)$ of 0.071 au, which evolves to 0.231 au in $11f$ and to 0.249 at $11f'$. Also, $E_s(r)$ has the value of -0.010 au in $TS6f-11f$, -0.285 au in $11f$, and -0.317 au in $11f'$. $\nabla^2\rho(r)$ values show that the BCP is in a charge depletion region in $TS6f-11f$ (0.129 au), while it is in a charge accumulation region in $11f$ (-0.358 au) as well as in $11f'$ (-0.470 au). From these results, the C4–O1 bond formation is demonstrated, as well as the fact that O1 still remains coordinated to the Fe atom at $11f$. As the BCP located between these atoms shows, the C4–O1 bond is slightly stronger in $11f'$ than in $11f$ due to the nonexistence of the Fe–O1 interaction in the first case.

Conclusions

The present work can be considered as the logical continuation of our previous work²⁰ and focuses on the geometric, energetic, and topological aspects of the steps leading from the C-radical species formed in the artemisinin decomposition process to the finally obtained products when heme alkylation fails. The analysis of the electron localization function (ELF) of Becke and Edgecombe³⁸ allows us to set up a mathematical model, which enables the study of the chemical structure of molecules, bringing a deep insight into the bond and lone pair localization. This description of the bonding has been used to study its evolution during a reactive process.

The obtained results nicely agree with the experimental data, and can shed additional light on our current understanding of the antimalarial action of artemisinin and its derivatives.

Some specific conclusions can be obtained from the present work: (a) The outcome of the experimentally detected products in the artemisinin decomposition process, namely, **8**, **10**, and **11**, has been satisfactorily explained. (b) The formation of **11f**, the model for **11**, has been found as the most favorable from a thermodynamic as well as a kinetic point of view, in agreement with the different experimental studies on the artemisinin decomposition process, that have found **11** as one of the main products.²¹ (c) However, once the decomposition has been initiated, the formation of **8f** and **10f** is also possible according to the energetic profiles obtained. This agrees with the fact that **8** and **10** have also been detected, and our results explain that the product distribution will mainly depend on the experimental conditions.²¹ (d) The obtained energetic profiles also predict some accumulation of the intermediate **7f**. This is experimentally confirmed by the detection of **7** in some experiments in small quantities.²¹ (e) A new mechanistic proposal explaining the experimentally determined outcome of deoxiartemisinin **10** has been postulated. This alternative path would avoid the passage

through the species modeling **9**, and this would explain why such a species has never been experimentally identified. The fact that the highest-energy TSs in the path to **10f** and in the path to **8f** have energy values very similar to each other suggests some competition between the two pathways, and in fact from the experimental data, it is deduced that the predominant formation of **8** or **10** depends mainly on the experimental conditions. (f) The ELF analysis accurately describes the electron flows that lead from the C-centered radicals to the final products. Furthermore, the AIM study quantitatively accounts for the cleavage/formation of the bonds, and provides us with a picture at an electronic level of the chemical rearrangements taking place in the processes herein studied. The MO analysis together with the spin density description have also been used, providing additional direct evidence for the location of the radicals during the reaction steps. (g) By using 2-H₂O, we have established the appropriateness of the use of **2f** to represent heme, because the energetic, geometric, and electronic conclusions reached are the same in both cases. Therefore, we use the small model, because it makes it possible to conduct high-level calculations and to perform the systematic topological analysis reported herein.

Acknowledgment. Financial support by the Ministerio de Educación y Ciencia (Project CTQ2009-14541-C02-01), Generalitat Valenciana (Project PROMETEO/2009/053), and Fundació Bancaixa-UJI (P1.1B2008-37 and P1.1B2008-36), is gratefully acknowledged. P. M. acknowledges the Universitat Jaume I for the grant PREDOC/2005/28.

References and Notes

- Greenwood, B. M.; Fidock, D. A.; Kyle, D. E.; Kappe, S. H. I.; Alonso, P. L.; Collins, F. H.; Duffy, P. E. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1266.
- Pereira, M. S. C.; Kiralj, R.; Ferreira, M. M. C. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 85.
- Egan, T. *J. Mol. Biochem. Parasitol.* **2008**, *157*, 127.
- Zhang, S.; Gerhard, G. S. *PLoS One* **2009**, *4*, e7472.
- Kannan, R.; Kumar, K.; Sahal, D.; Kukreti, S.; Chauhan, V. S. *Biochem. J.* **2005**, *385*, 409.
- Rathore, D.; Jani, D.; Nagarkatti, R.; Kumar, S. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* **2006**, *3*, 153.
- Egan, T. J.; Combrinck, J. M.; Egan, J.; Hearne, G. R.; Marques, H. M.; Ntenti, S.; Sewell, B. T.; Smith, P. J.; Taylor, D.; van Schalkwyk, D. A.; Walden, J. C. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 343.
- Ginsburg, H.; Ward, S. A.; Bray, P. G. *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 357.
- White, N. *J. Science* **2008**, *320*, 330.
- Meshnick, S. R.; Taylor, T. E.; Kamchonwongpaisan, S. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 301.
- Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 9364.
- Taranto, A. G.; Carneiro, J. W.; d. M.; de Oliveira, F. G.; de Araujo, M. T.; Correa, C. R. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2002**, *580*, 207.
- Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 167.
- O'Neill, P. M.; Posner, G. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945.
- Robert, A.; Benoit-Vical, F.; Claparols, C.; Meunier, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 13676.
- Tang, Y.; Dong, Y.; Wang, X.; Sriraghavan, K.; Wood, J. K.; Vennerstrom, J. L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5103.
- Messori, L.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Siragusa, M.; Vincieri, F. F.; Bilia, A. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2972.
- Golenser, J.; Waknine, J. H.; Krugliak, M.; Hunt, N. H.; Grau, G. E. *Int. J. Parasitol.* **2006**, *36*, 1427.
- Robert, A.; Bonduelle, C.; Laurent, S. A.-L.; Meunier, B. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 562.
- Moles, P.; Oliva, M.; Sánchez-González, A.; Safont, V. S. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 1163.
- Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3316.
- Posner, G. H.; Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Oh, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5885.
- Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Posner, G. H. *Adv. Pharmacol.* **1996**, *37*, 253.
- McIver, J. W., Jr. *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 72.
- Fukui, K. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 4161.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*; rev B.04; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372.
- Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- Silvi, B.; Savin, A. *Nature* **1994**, *371*, 683.
- Bader, R. F. W. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*; Oxford University Press: New York, 1990.
- Bader, R. F. W. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 893.
- Biegler-König, F.; Schonbohm, J.; Bayles, D. J. *Comput. Chem.* **2001**, *22*, 545.
- Noury, S.; Krokidis, X.; Fuster, F.; Silvi, B. *ToPMoD: Laboratoire de Chimie Théorique*; Université Pierre et Marie Curie: Paris, 1999.
- Konrad-Zuse-Zentrum, B., and Mercury Computer Systems *Amira 4.1*, 1995-2006.
- GaussView 3.0*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2003.
- Moles, P.; Oliva, M.; Safont, V. S. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 7144.
- Moles, P.; Oliva, M.; Safont, V. S. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9448.
- Becke, A. D.; Edgecombe, K. E. *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 5397.

JP1064903