



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO DE LA DEPOSICIÓN Y ADSORCIÓN DE BIFOSFONATOS SOBRE LA SUPERFÍCIE 010 DE LA HIDROXIAPATITA

Alejandro Riera Moreno

Grado de Química

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-20

ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO DE LA DEPOSICIÓN Y ADSORCIÓN DE BIFOSFONATOS SOBRE LA SUPERFÍCIE 010 DE LA HIDROXIAPATITA

Alejandro Riera Moreno

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Química

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Hidroxiapatita, Bifosfonatos, Adsorción, Deposición, Monte Carlo, DFT.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Joaquín Ortega Castro

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ÍNDICE

Índice de abreviaturas.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	3
Introducción.....	4
Hidroxiapatita.....	4
Estructura.....	5
Superficies.....	6
Implicaciones fisiológicas.....	8
Bifosfonatos.....	9
Estudios previos.....	10
Objetivos.....	12
Metodología.....	13
Cálculos MM.....	16
Cálculos DFT.....	18
Comparación de energías de adsorción del procedimiento MC y DFT.....	18
Resultados y Discusión.....	20
Cadena lateral -R ₁	22
Cadena lateral -R ₂	23
Carga global.....	26
Comparación hidroxiapatita 010 y 001.....	26
Conclusiones.....	28
Bibliografía.....	29

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>ABREVIATURA</i>	<i>SIGNIFICADO</i>
<i>HAP</i>	Hidroxiapatita
<i>BP</i>	Bifosfonato
<i>MM</i>	Mecánica Molecular
<i>MC</i>	Monte Carlo
<i>DFT</i>	Teoría del Funcional de la Densidad
<i>ETI</i>	Etidronato
<i>PAM</i>	Pamidronato
<i>ALE</i>	Alendronato
<i>NER</i>	Neridronato
<i>OLP</i>	Olpadronato
<i>IBA</i>	Ibandronato
<i>ZOL</i>	Zoledronato
<i>RIS</i>	Risedronato
<i>MIN</i>	Minodronato

RESUMEN

En este trabajo hemos estudiado la energía de adsorción de 26 bifosfonatos (BPs) con la superficie 010 de la hidroxiapatita (HAP) utilizando cálculos de la teoría del funcional de la densidad (DFT). Se ha visto que la longitud, la carga y la presencia de diferentes grupos funcionales en las cadenas laterales $-R_1$ y $-R_2$ alteran dicha energía. Además, se ha observado que las cargas negativas en los grupos funcionales de la cadena $-R_2$ consiguen mejores resultados al conseguir mayores interacciones electrostáticas favorables con la superficie, si el largo de la cadena lo permite.

Una comparación con los datos mostrados por el trabajo de Fernández et al., 2017 para la superficie 001 de la hidroxiapatita, nos muestra diferencias significativas entre ambas caras del mineral, y la importancia de la distribución del potencial electrostático de las diferentes caras para la adsorción de los diferentes bifosfonatos.

ABSTRACT

In this work we studied the adsorption energy of 26 biphosphonates (BPs) with on the hydroxyapatite (HAP) 010 surface using density functional theory (DFT) calculations. We have been shown that the length, charge and presence of different functional groups at $-R_1$ and $-R_2$ side chains affect the energy. Moreover, we could observe that negative charges in functional groups in $-R_2$ side chains accomplish better outcomes as a result of the formation of more electrostatic favorable interactions with the surface, only if the length of the side chain allows it.

A comparison with the data shown at Fernández et al., 2017 for the hydroxyapatite 001 surface have shown significant differences between mineral faces, and also the importance of the electrostatic potential distribution of the different faces for the adsorption of the biphosphonates.

INTRODUCCIÓN

Diversas enfermedades se desarrollan a causa del crecimiento indeseado y/o descontrolado de hidroxiapatita en tejidos biológicos. El tratamiento de estas patologías incluye la utilización de fármacos que actúan como inhibidores de la cristalización. Para comprender su mecanismo de acción y mejorar sus propiedades, debemos estudiar la estructura de la hidroxiapatita y su interacción con las distintas moléculas orgánicas.

Hidroxiapatita

La hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, es el principal componente inorgánico de los huesos y el esmalte de los dientes, formando parte del 65% y el 95% en masa del tejido respectivamente (Fernández et al., 2017a, Fernández et al. 2017b). En las últimas décadas ha sido objeto de estudio gracias a su uso como biomaterial en implantes dentales y ortopédicos. La importancia de los biomateriales reside principalmente en sus aplicaciones, ya que estos materiales son estudiados y diseñados para sustituir o mejorar funciones vitales del cuerpo humano que se han perdido o que han sido dañadas.

En la estructura del hueso, la hidroxiapatita presente no es completamente cristalina, no está compuesta solamente por una fase mineral, sino que también tiene una matriz orgánica compuesta principalmente por colágeno y otros polipéptidos. Además, presenta numerosos defectos puntuales tanto catiónicos (Mg^{2+} y Na^+) como aniónicos (F^- , CO_3^{2-}) (Chiatti et al., 2016).

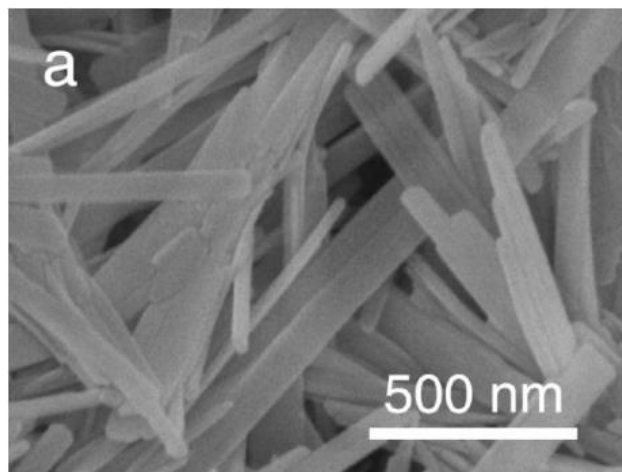


Figura 1: Imagen en microscopio electrónico de barrido (SEM) de la hidroxiapatita formada a pH 7.6. Fuente: (Ma & Liu, 2009)

El hueso mineral es deficiente en calcio, con un ratio Ca/P menor de 1.67 (Corno et al., 2010). Para entender las propiedades y el proceso de formación del hueso es necesario examinar su nivel más básico de organización. Los nanocristales de hidroxiapatita, que se encuentran incrustados en una matriz de colágeno mediante la mineralización intrafibrilar de este, están orientados uniaxialmente. Esta relación entre matriz y nanocristales proporciona al hueso sus propiedades mecánicas y su capacidad de remodelación. Además, el tamaño pequeño y no estequiométrico de los nanocristales otorga a la fase mineral la solubilidad necesaria para la resorción del hueso por los osteoclastos (Corno et al., 2010).

ESTRUCTURA

La estructura de la hidroxiapatita fue determinada por primera vez en 1958 por Posner et al. y confirmada en 1964 mediante difracción de rayos X y de neutrones (Kay, Young, & Posner, 1964). El grupo espacial resultante fue $P6_3/m$ con celda unidad $a=b= 9.432\text{\AA}$, $c=6.881\text{\AA}$, donde los grupos hidroxilo se colocan en columnas, paralelos al eje c (Figura 2). Los grupos hidroxilo generan dos tipos de cationes calcio, Ca_I y Ca_{II} que se diferencian en la posición que ocupan en la celda unidad.

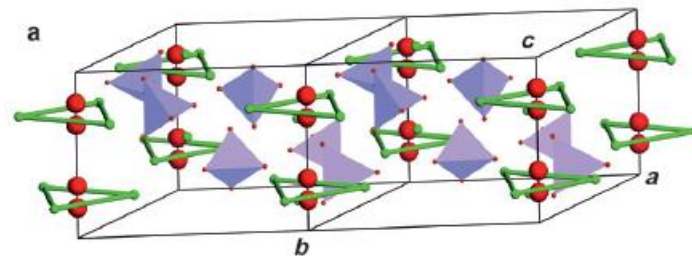


Figura 2: Estructura de la hidroxiapatita, hexagonal, con grupo espacial $P6_3/m$. Los fosfatos se representan como tetraedros azules, el grupo hidroxilo una esfera roja y los calcio (Ca_{II}) forman triángulos verdes. Los grupos hidroxilo presentan posiciones aleatorias arriba y debajo de los triángulos de calcio. Fuente: Mugnaioli et al., 2014

La estructura de la hidroxiapatita se puede describir como una columna de iones hidróxido en el eje de rotación 6_3 , paralela al eje axial c , rodeada por dos triángulos de átomos Ca_{II} separados por una distancia de $c/2$. Cada Ca_{II} está coordinado a seis átomos de oxígeno del fosfato, PO_4^{3-} . Los átomos de oxígeno, O, se rodean finalmente de seis átomos de Ca_I en un mismo plano (Figura 3). El plano de simetría (m) se mantiene al colocar los grupos hidroxilo convenientemente encima y debajo de los triángulos de Ca_{II} . (Mugnaioli et al., 2014).

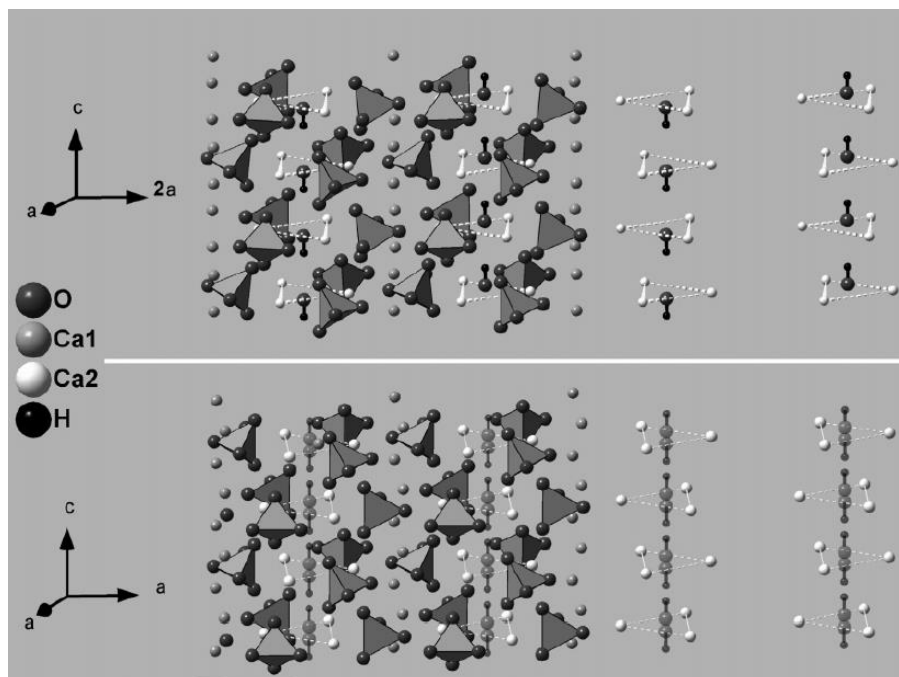


Figura 3: Estructuras cristalinas de la hidroxiapatita, arriba monoclinica ($P2_1/b$) y abajo hexagonal ($P6_3/m$). Los fosfatos están representados como tetraedros y los calcio (Ca_{II}) forman triángulos a lo largo de la estructura. La hidroxiapatita monoclinica presenta los hidroxilos completamente alineados. Fuente: Hochrein, Kniep, & Zahn, 2005

Estudios posteriores demostraron que el mineral de la hidroxiapatita se presenta en la naturaleza como dos polimorfos, con transición de fase (Suda et al., 1995) y una diferencia de entalpía (ΔH) de $630 \pm 25 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Takahashi et al., 2001). El polimorfo monoclinico ($P2_1/b$), termodinámicamente estable a bajas temperaturas, y la forma hexagonal ($P6_3/m$), presente principalmente en la fase inorgánica del hueso como nanocristales (Chiatti et al., 2016a). La diferencia entre ambos polimorfos únicamente radica en la orientación de los grupos hidroxilo en la columna del eje c (Figura 3). La estructura termodinámicamente estable presenta todos los hidroxilos completamente alineados.

Es posible encontrar ambas estructuras, hexagonal y monoclinica, coexistiendo en el mismo cristal. A escala nanométrica la estructura de la hidroxiapatita $P6_3/m$ y la encontrada en el esmalte del hueso humano mantienen una estructura parecida. Sin embargo, a mayor escala se pierde el plano de simetría (m) perpendicular al eje c , y consecuentemente, obtenemos un grupo espacial $P6_3$ (Mugnaioli et al., 2014).

SUPERFICIES

Para entender en detalle el mecanismo de interacción de los inhibidores sobre la hidroxiapatita debemos centrarnos en la estructura y reactividad de las diferentes superficies. En la formación del cristal existen cinco caras o superficies: 001, 011, 111, 010 y 110, siendo el conjunto de caras $\{011,111\}$ y $\{010,110\}$ isoestructurales (Corno et al., 2010), por lo que podemos caracterizar el cristal definiendo solamente tres de ellas (Figura 4): 001, 011 y 010.

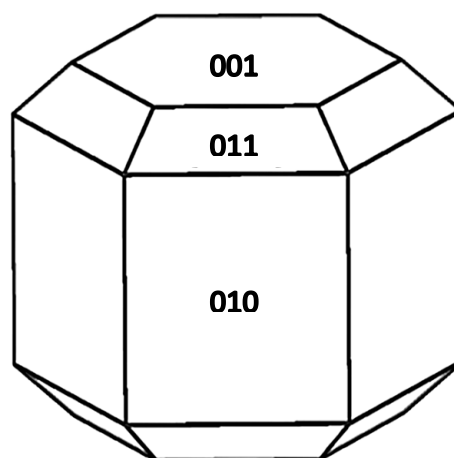


Figura 4: Reconstrucción Wulff reproduciendo el hábito cristalino de la hidroxiapatita a partir de sus caras, hexagonal con grupo espacial $P6_3/m$, utilizando la herramienta Wulffmann. Fuente: Chiatti et al., 2016

El comportamiento químico de todas las superficies consideradas es el esperado de un material iónico, en el que fuertes campos eléctricos están presentes cerca de los iones de la superficie.

Superficie 001

La superficie 001 se forma cortando el plano ab de la estructura, presenta una sola capa o plano formada por $Ca_4(PO_4)_2(OH)_2$, y se caracteriza por formar una columna de iones hidroxilo que crea un momento dipolar a través del corte. Sin embargo, la alineación de los hidroxilos no afecta a la estabilidad de la superficie, ya que los cationes y aniones de la estructura que rodean los hidroxilos mitigan el efecto ferroeléctrico. Ambos iones están expuestos en la superficie creando una red iónica (Figura 5), siendo esta cara la más estable y la que más crecimiento admite. Además, esta cara es la responsable de que la morfología de los cristales de hidroxiapatita tenga forma de agujas.

HAP 001

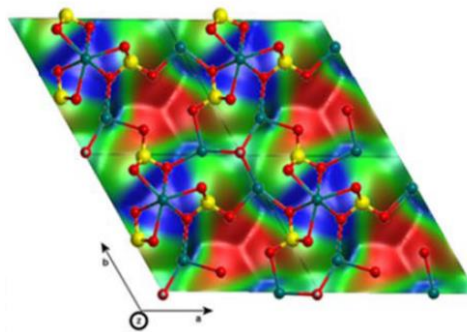


Figura 5: Modelo optimizado de la superficie 001 de la hidroxiapatita superpuesto al potencial electrostático. Las zonas positivas se representan en azul (Ca^{2+}) y las negativas en rojo (PO_4^{3-}). En la estructura los átomos de oxígeno en rojo, cationes calcio en cian y fósforo en amarillo. Fuente: Chiatti et al., 2016

Superficie 011

La superficie 011 se forma cortando diagonalmente respecto al plano definido entre los vectores a o b y el vector c de la estructura total. El corte genera una única superficie estequiométrica, donde los iones hidroxilo se alinean a lo largo del eje c, creando un ligero momento dipolar en la dirección no periódica de la superficie. Los cationes y aniones de la estructura forman franjas de potencial positivo y negativo (Figura 6), eclipsando el momento dipolar generado por los iones hidroxilo. La superficie de exposición es muy pequeña en comparación con las demás superficies.

HAP 011

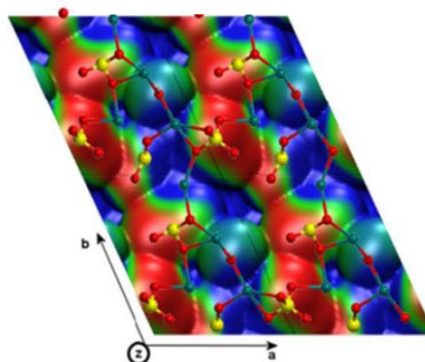
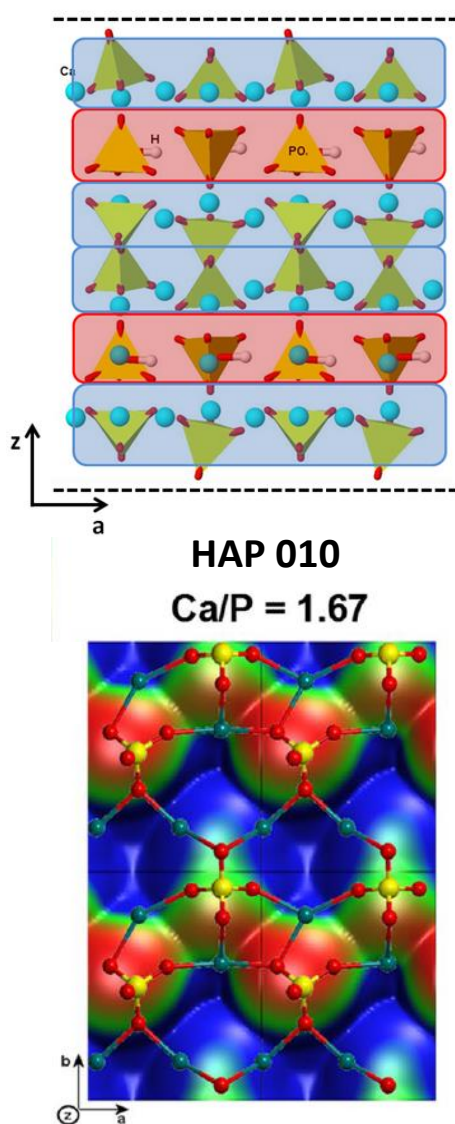


Figura 6: Modelo optimizado de la superficie 011 de la hidroxiapatita superpuesto al potencial electrostático. Las zonas positivas se representan en azul (Ca^{2+}) y las negativas en rojo (PO_4^{3-}). En la estructura los átomos de oxígeno en rojo, cationes calcio en cian y fósforo en amarillo. Fuente: Chiatti et al., 2016

Superficie 010



La superficie 010 se forma cortando el plano ac de la estructura total. A lo largo de la dirección de la superficie encontramos dos tipos de capas o planos de diferente composición: tipo A, $Ca_3(PO_4)_2$, y tipo B, $Ca_4(PO_4)_2(OH)_2$ (Figura 7). La secuencia a lo largo de la cara es A-B-A-A-B-A, aunque es posible en función del corte obtener otras secuencias, solamente esta secuencia se mantiene estequiométrica. Además, mantiene la proporción Ca/P en 1.67.

Figura 7: Vista lateral de la superficie 010 estequiométrica de la hidroxiapatita, tipo A en franja azul y tipo B en franja roja. Los fosfatos se representan por los poliedros amarillos, oxígenos en rojo, calcio en azul e hidrógenos en blanco. Fuente: Chiatti et al., 2016 Electronic Supplementary Information

Este modelo de superficie 010 estequiométrico presenta las caras B escondidas por lo que los hidroxilos no influyen en el potencial electrostático. Los iones Ca^{2+} se encuentran expuestos y son un indicativo de su reactividad con posibles moléculas polares (Figura 8).

La simetría del sistema hexagonal genera seis caras de la superficie 010 de la hidroxiapatita, siendo, no la más estable, sino la más expuesta y reactiva a las diferentes biomoléculas del ambiente (Chiatti et al., 2016a). La polaridad local en la cara 010 tendrá una mayor interacción con moléculas dipolares como el agua o los aminoácidos.

Figura 8: Modelo optimizado de la superficie 010 de la hidroxiapatita superpuesto al potencial electrostático. Las zonas positivas se representan en azul (Ca^{2+}) y las negativas en rojo (PO_4^{3-}). En la estructura los átomos de oxígeno en rojo, cationes calcio en cian y fósforo en amarillo. Fuente: Chiatti et al., 2016

IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS

La formación y/o crecimiento descontrolado de hidroxiapatita en tejidos de sistemas y órganos está involucrado en diversas enfermedades.

La deposición patológica en el tejido óseo conlleva problemas como el sarro, artritis o arterioesclerosis. La calcificación patológica en tejidos blandos, conocida como calcificación ectópica, puede tener consecuencias graves cuando ocurre en órganos vitales como el sistema vascular o renal. En el caso de las arterias puede causar trombosis, ruptura arterial e infarto de miocardio, mientras que en el corazón las lesiones valvulares más comunes son estenosis aórtica producida por la calcificación valvular y puede inducir a un fallo cardíaco. En los riñones, la calcificación del tejido se puede asociar con la formación de cálculos renales o piedras de riñón y en casos extremos, fallo renal (Grases et al., 2007).

Para prevenir y cortar el crecimiento de los nanocristales se han utilizado e investigado distintas moléculas que actúan como inhibidores del crecimiento del cristal de hidroxiapatita. En general, dichos inhibidores de cristalización se enlazan con el núcleo del cristal o con sus caras para perturbar su desarrollo sin afectar a la capacidad celular.

Los pirofosfatos, bifosfonatos y fitatos (*Figura 9*) han demostrado inhibir la cristalización de la calcificación vascular. El etidronato es utilizado para tratar osteoporosis y el fitato es un compuesto natural que se puede ingerir o absorber localmente.

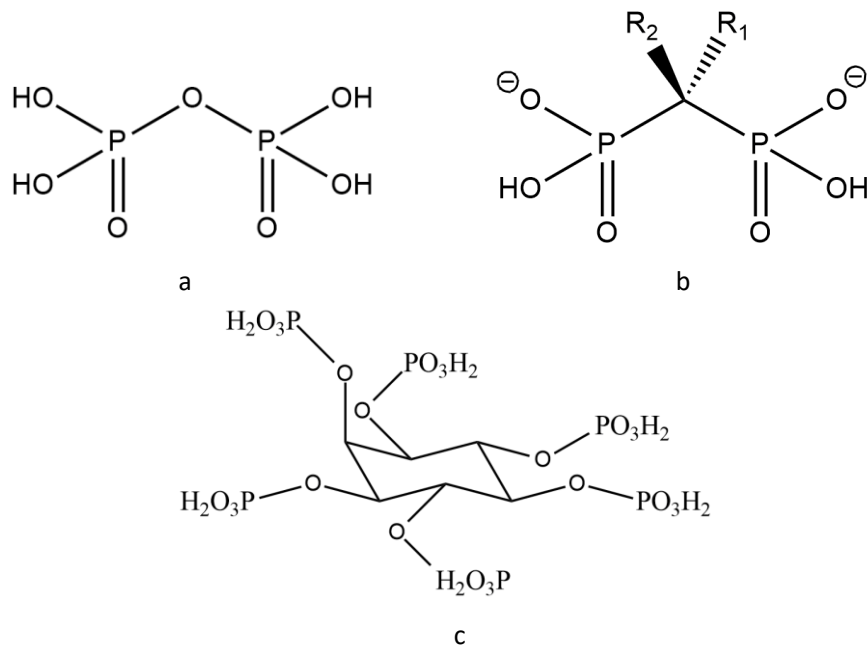


Figura 9: Estructura del pirofosfato (a), bifosfonatos (b) y fitatos (c). Fuente: *Elaboración propia.*

Bifosfonatos

Los bifosfonatos son un grupo análogo, metabólicamente estable, al pirofosfato inorgánico que se han utilizado como inhibidores de calcificaciones y en tratamientos de enfermedades metabólicas del hueso (Fernández et al., 2017a; Fernández et al., 2017b).

El pirofosfato inorgánico es un modulador natural del metabolismo del hueso, es por ello que los bifosfonatos han sido estudiados como inhibidores de calcificación y resorción para tratamientos de enfermedades del hueso. Se ha demostrado que los bifosfonatos se unen a los cristales de hidroxiapatita e inhiben su crecimiento y disolución de una manera similar al pirofosfato (Nancollas et al., 2006).

Dichos bifosfonatos consisten en dos grupos fosfato unidos a un átomo de carbono central (P-C-P), en lugar del átomo central de oxígeno original de los pirofosfatos (P-O-P). Ese carbono otorga a los bifosfonatos su capacidad antiresortiva, ya que los pirofosfatos se hidrolizan en el hueso por la enzima pirofosfatasa antes de que pueda llegar a ser absorbido por el osteoclasto.

Los bifosfonatos son ahora el medicamento más utilizado para enfermedades asociadas a un incremento de la resorción del hueso, como la osteoporosis. Aunque los bifosfonatos actúan directamente en el osteoclasto e interfieren con procesos bioquímicos específicos, su habilidad para adsorberse al mineral del hueso contribuye a su potencia y duración de acción. Una mayor afinidad, y por lo tanto retención, de los bifosfonatos en la superficie de la hidroxiapatita es necesaria para lograr un efecto terapéutico de larga duración, de otra manera, se necesitaría una mayor dosis para lograr la acción terapéutica deseada. Sin embargo, largas dosis de bifosfonatos se han relacionado con indeseables efectos secundarios severos tales como, esofagitis, complicaciones gastrointestinal y renales, dolor musculoesquelético, fibrilación arterial, molestias inflamatorias oculares, osteonecrosis en la mandíbula y un mayor riesgo de fractura subtrocantérea o femoral en mujeres de edad avanzada (Fernández et al., 2017).

El éxito de los bifosfonatos en el tratamiento de enfermedades de resorción ósea se basa en a) su alta afinidad por la superficie del hueso en preferencia a otros órganos, b) su exclusividad a ser absorbidos por los osteoclastos y c) la rápida liberación de las moléculas no absorbidas (Fernández et al., 2013).

Su mecanismo de acción es conocido hoy en día. Primero, el bifosfonato se une a la superficie de la hidroxiapatita e inhibe su solubilidad. Segundo, el bifosfonato es específicamente absorbido por el osteoclasto provocando la apoptosis de la célula (Fernández et al., 2017).

Estudios previos

Algunos estudios teóricos se han realizado con la intención de describir los mecanismos de acción de la superficie de la hidroxiapatita respecto a un largo número de biomoléculas: agua (Chiatti et al., 2016; Zahn & Hochrein, 2003), aminoácidos (Almora-Barrios et al., 2009; Corno et al., 2010), fosfatos y derivados (Rivas et al., 2015). Sin embargo, el nivel de comprensión atómico y electrónico de estos complejos procesos de integración de biomateriales con el cuerpo humano sigue limitado respecto a las investigaciones experimentales. Entender la biomineralización, igual que la biocompatibilidad de materiales analizando su interacción con la hidroxiapatita sigue siendo el objeto de estas publicaciones.

En los últimos años se ha estudiado la adsorción de varios bifosfonatos con las diferentes superficies de la hidroxiapatita: 001 (Fernández et al., 2017) y la 010 (Rivas et al., 2015; Robinson et al., 2006). Esta adsorción se debe principalmente a la interacción de la estructura común del bifosfonato O-P-C-P-O con el ion calcio más expuesto de la superficie mineral del hueso.

La presencia del grupo hidroxilo en la cadena $-R_1$ mejora la afinidad de enlace del bifosfonato con la superficie de la hidroxiapatita, coordinándose con el catión calcio (Fernández et al., 2017). Variando los sustituyentes de la cadena lateral $-R_2$ resulta en diferencias en el potencial de antiresorción de varios ordenes de magnitud.

Muchos bifosfonatos que contienen un nitrógeno primario en una cadena alquil son agentes antiresortivos más potentes que bifosfonatos como el etidronato o el clodronato, que solamente presentan un metil y un cloro en la cadena $-R_2$, respectivamente (Figura 10 a y b). Además, compuestos con más sustituyentes en el nitrógeno presentan una potencia antiresortiva todavía mayor. Los bifosfonatos más potentes son los que contienen un átomo de nitrógeno en un anillo heterocíclico, como ejemplo el risedronato y el zoledronato (Figura 10 c y d) (Nancollas et al., 2006).

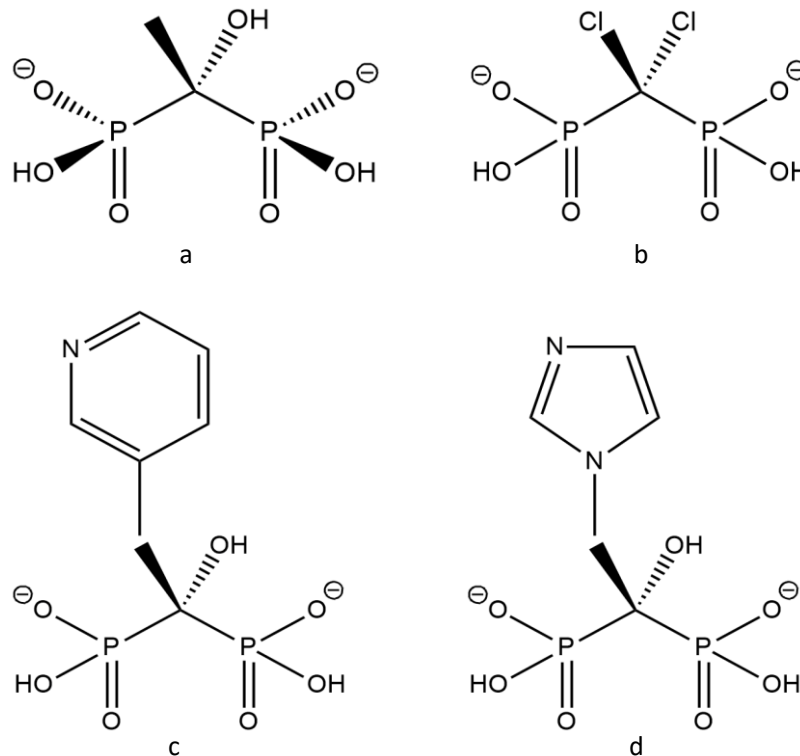


Figura 10: Estructura del etidronato (a), clodronato (b), risedronato(c) y zoledronato (d).
Fuente: *Elaboración propia*

Dos puntos de vista opuestos existen en conexión con el efecto del largo de la cadena lateral $-R_2$. Por una parte, algunos estudios experimentales han demostrado baja o diferencias no significativas en la afinidad del hueso debido a diferentes tamaños de la cadena lateral $-R_2$. Se demostró que la afinidad de unión para el hueso por parte de los hidroxilbifosfonatos cae en un estrecho rango de valores y sugiere que la eficacia antiresortiva depende del tiempo de retención del bifosfonato en el hueso (Leu et al., 2006).

Por otro lado, otros estudios (Kirkham et al., 2002) remarcan diferencias significativas en la afinidad de los bifosfonatos con el hueso en función del tamaño de la cadena lateral $-R_2$, mostrando diferentes energías de adsorción en función de las distintas superficies de la hidroxiapatita. Una comparación de estudios experimentales de la afinidad de bifosfonatos, utilizados clínicamente, con la hidroxiapatita, revelan discrepancias en el rango de afinidades de los bifosfonatos con la hidroxiapatita en función de la cadena lateral $-R_2$ (Fernández et al., 2017).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto consiste en estudiar la interacción entre distintos tipos de bifosfonatos y la superficie 010 de la hidroxiapatita. Para ello, utilizaremos la teoría del funcional de densidad (DFT) para obtener diferentes energías de adsorción. A continuación, con los datos obtenidos podremos discutir específicamente:

1. Cómo afecta la cadena lateral $-R_1$ a la energía de adsorción con la superficie 010 de la hidroxiapatita.
2. Cómo afecta la longitud y los distintos grupos funcionales de la cadena lateral $-R_2$ a la energía de adsorción con la superficie 010 de la hidroxiapatita.
3. Cómo afecta la carga global de las moléculas de bifosfonato a la energía de adsorción con la superficie 010 de la hidroxiapatita.
4. Comparar los resultados obtenidos para la superficie 010 con los que se obtuvieron para la superficie 001 de la hidroxiapatita.

METODOLOGÍA

En este trabajo hemos realizado un estudio Monte Carlo/DFT del efecto de la deposición y adsorción de un conjunto de bifosfonatos con sus energías de adsorción sobre la superficie 010 de la hidroxiapatita (HAP). Incluimos en el estudio los actuales bifosfonatos disponibles clínicamente (*Figura 11*), además de considerar otros bifosfonatos (*Figura 13*) que nos permiten estudiar el efecto del tamaño, carga y el grupo funcional de la cadena lateral -R₂.

Asimismo, las diferencias entre el grupo hidrógeno y el hidroxilo en la cadena -R₁ también se han estudiado mediante los equivalentes del etidronato (1ETI), pamidronato (2PAM) y el zoledronato (7ZOL) (*Figura 12*).

Para afrontar los cálculos entre las diferentes moléculas y la superficie, es necesaria una previa planificación. Los cálculos DFT para estructuras sólidas son muy grandes y no es recomendable lanzarlos como primera opción, por lo que antes, nos aseguramos de obtener una conformación inicial coherente mediante un estudio Monte Carlo (MC).

El protocolo desarrollado ha sido:

1. Creación de un modelo de superficie para la superficie cristalina 010 de la HAP. Usamos la herramienta *Surface* del programa *Material Studio 2016* (MS2016) *Creation of the surface* [Biovia 2015].
2. Estudio de la estructura electrónica de los bifosfonatos del presente trabajo con el programa de Mecánica Molecular (MM) *Forcite* del MS2016 [Biovia 2015].
3. Estudio conformacional de los inhibidores sobre la superficie de la HAP con el programa *Adsorption Locator* del MS2016 [Biovia 2015].
4. Cálculos de la teoría del funcional de la densidad (DFT) con el programa DMOL3 del MS2016 [Biovia 2015].

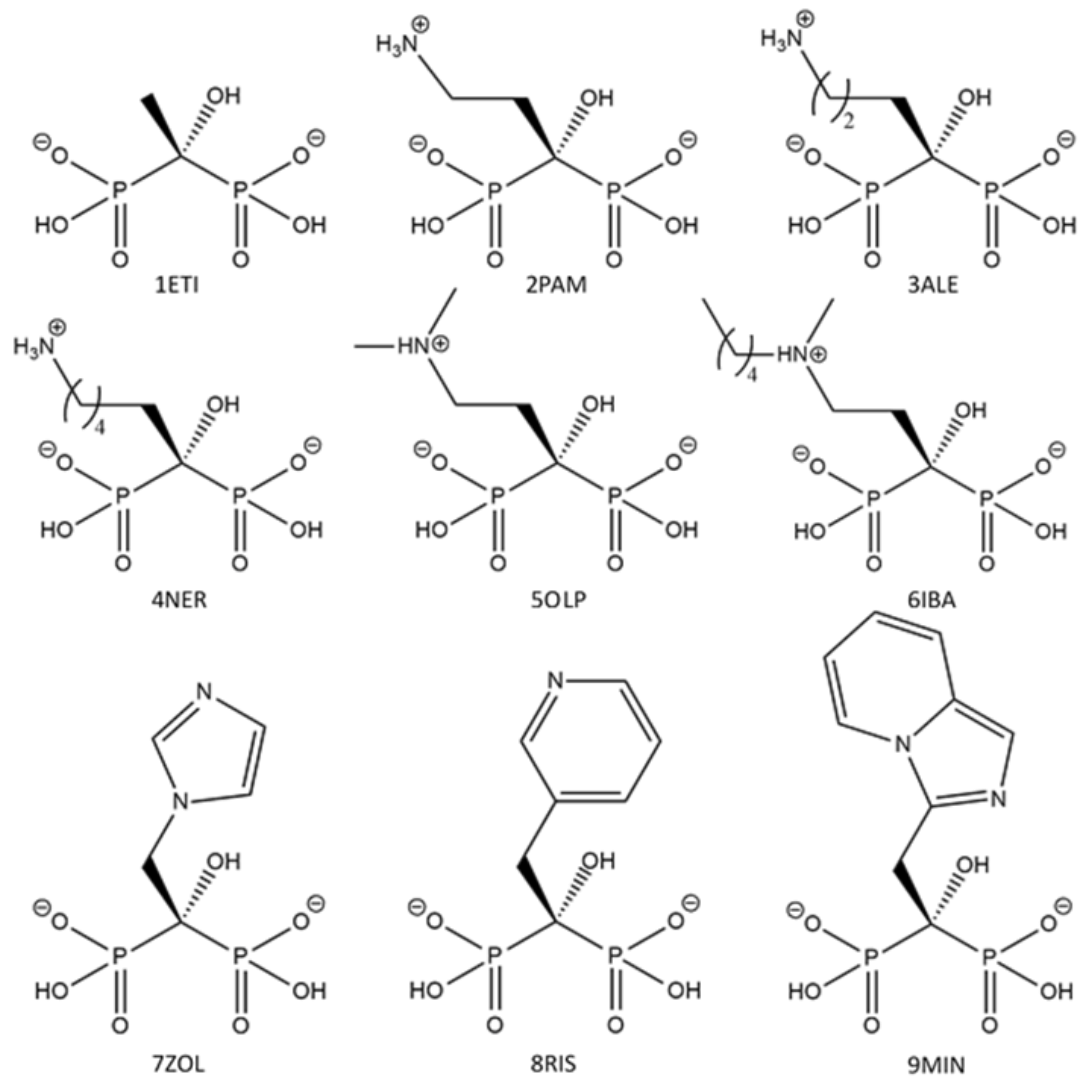


Figura 11: Conjunto de bifosfonatos utilizados clínicamente: etidronato (1ETI), pamidronato (2PAM), alendronato (3ALE), neridronato (4NER), olpadronato (5OLP), ibandronato 6(IBA), zoledronato (7ZOL), risedronato (8RIS), minodronato (9MIN). Fuente: *Elaboración propia*

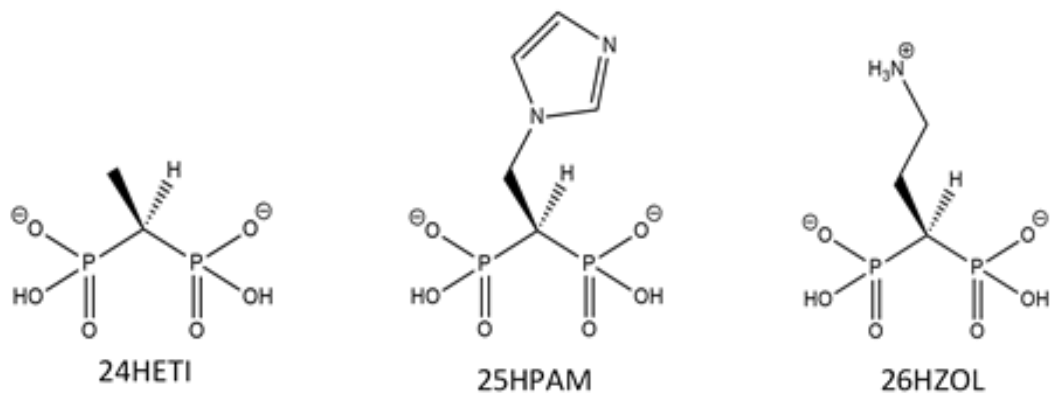


Figura 12: Equivalentes del etidronato (1ETI), pamidronato (2PAM) y zoledronato (7ZOL) con grupo hidrógeno en la cadena lateral -R₁. Fuente: *Elaboración propia*

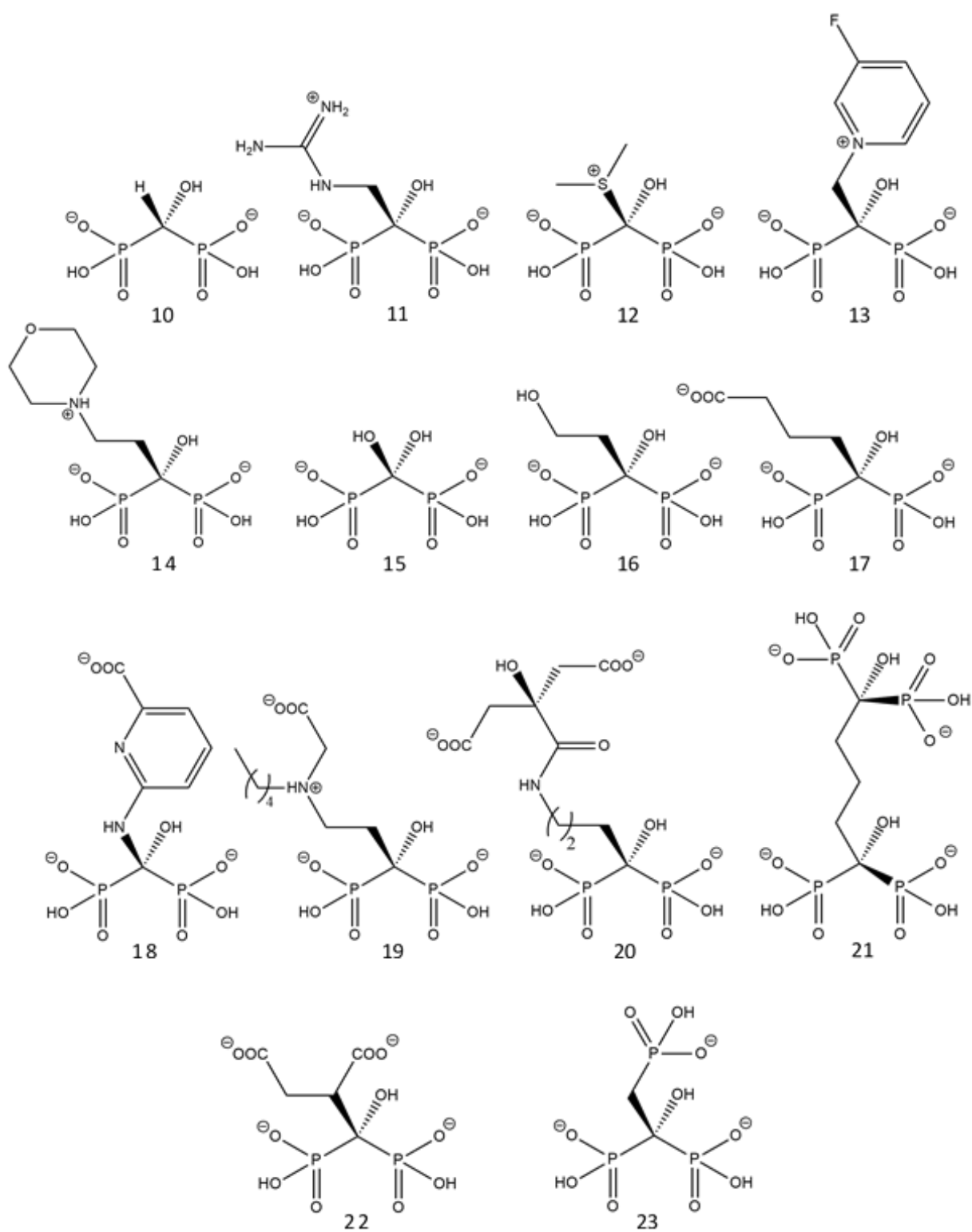


Figura 13: Lista adicional de bifosfonatos para el estudio de la cadena lateral -R₂. Fuente: *Elaboración propia.*

CÁLCULOS MM

En primer lugar, utilizamos cálculos MM con la herramienta *Forcite* con los parámetros de la *Tabla 1* para buscar una estructura optimizada de mínima energía para cada uno de los bifosfonatos:

Tabla 1: Parámetros utilizados en la optimización estructural de los bifosfonatos, con MM, mediante la herramienta *Forcite* de *Material Studio* 2016.

SETUP	TASK	<i>Geometry Optimization</i> ^{*1}
	QUALITY	<i>Fine</i>
ENERGY	FORCIFIELD	<i>COMPASSII</i> ^{*2}
	CHARGES	<i>Gasteiger</i>
	QUALITY	<i>Fine</i>

- ^{*1}**Geometry Optimización:** esta opción busca una estructura de mínima energía. Refinamos la geometría de la molécula iterativamente hasta alcanzar una estructura optimizada, que corresponde a un mínimo en la superficie de energía potencial.
- ^{*2}**COMPASSII:** (Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies) es un campo de fuerza con datos ab initio en el cual debemos introducir el tipo de campo de fuerza de cada átomo por separado, para cada una de las moléculas. Aunque el programa detecta campos de fuerza automáticamente, no es perfecto, debemos asegurarnos manualmente de que se estén utilizando los deseados (*Figura 14*).

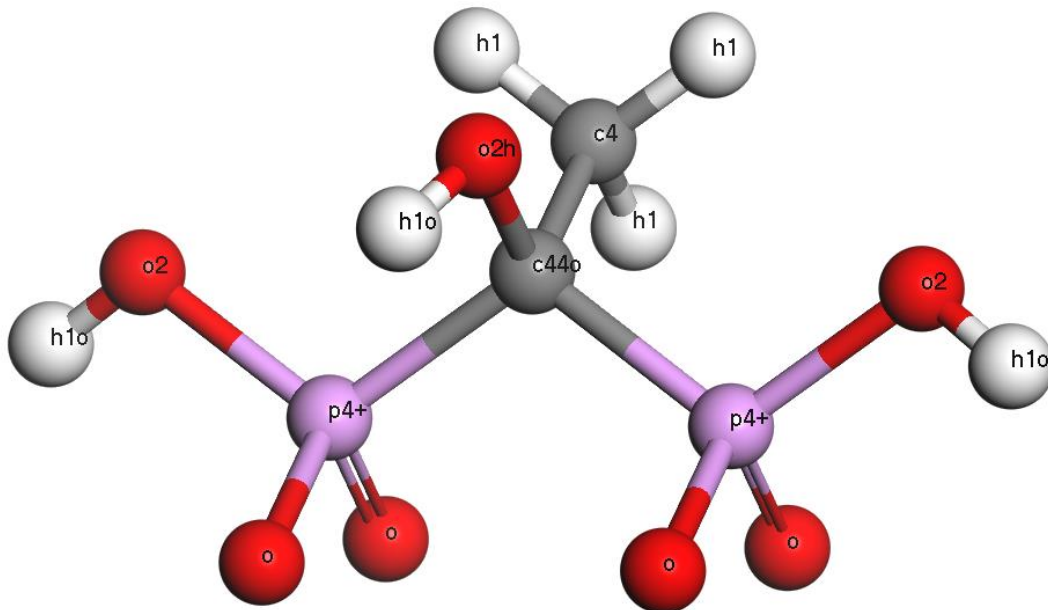
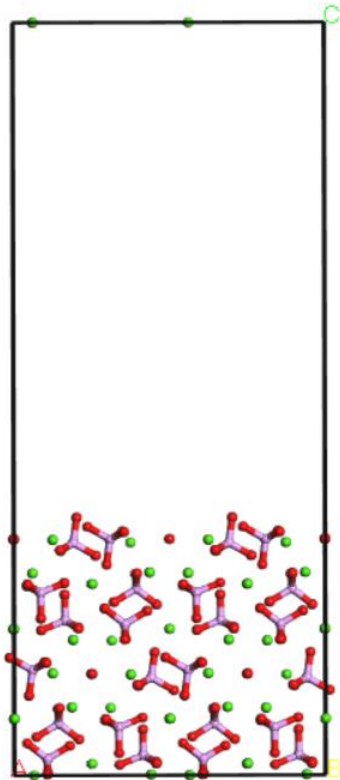


Figura 14: Bifosfonato 1ETI con sus campos de fuerza COMPASSII deseados. Fuente: *Elaboración propia*.

En segundo lugar, creamos el modelo de superficie optimizado de la superficie 010 del cristal de la HAP. Utilizamos la herramienta de superficie en el paquete del programa *Material Studio* 2016.



Las simulaciones de la HAP hexagonal no se pueden realizar con el grupo espacial $P6_3/m$ por la imposibilidad física de duplicar cada hidróxido en el plano de simetría m . En consecuencia, la simetría se reduce al grupo espacial $P6_3$, que establece cada grupo hidróxido igualmente alineado en cada columna. Al bajar la simetría obtenemos tres tipos de iones calcio en lugar de dos: Ca(I) tiene tres oxígenos rodeándole, Ca(II) seis y Ca(III) cuatro (Chiatti et al., 2016a). Además, utilizaremos la configuración B-A-A-B-A-A para conseguir alguna interacción con los hidroxilos de la superficie.

Antes de la construcción de la superficie, las posiciones de los átomos en la celda unidad de la HAP son relajados energéticamente manteniendo los parámetros cristalográficos fijos. La elección del tamaño de la superficie 010 fue suficientemente grande para que la molécula de inositol fosfato aislado sobre la superficie, no interactúe con otra molécula imagen debido a las condiciones periódicas de contorno.

Figura 15: Celda unidad de la superficie 010 de la HAP con un espacio de vacío generado. Los átomos de fósforo se representan de color rosado, los oxígenos en rojo y los cationes calcio en verde. Fuente: *Elaboración propia*.

Un espacio vacío se ha generado al extender el eje c (parámetros de contorno $a=18.86 \text{ \AA}$ $b= 13.76 \text{ \AA}$ y $c= 45.63 \text{ \AA}$; $\alpha= \beta= \gamma= 90^\circ$). El vacío generado en el eje c previene la interacción con la superficie superior (Figura 15).

CÁLCULOS MC

A continuación, usamos la herramienta *Adsorption Location Calculation*, con los parámetros mostrados en la *Tabla 2* para cada una de las moléculas optimizadas anteriormente, realizando un estudio conformacional de la deposición de los bifosfonatos sobre la superficie 010 del mineral. Las estructuras moleculares se optimizan manteniendo los átomos de la superficie 010 de la HAP congelados.

Tabla 2: Parámetros utilizados en los cálculos para la deposición de los bifosfonatos con la superficie 010 de la HAP mediante la herramienta *Adsorption Location Calculation* de *Material Studio 2016*.

SETUP	TASK	<i>Simulated annealing</i> ^{*3}
	QUALITY	<i>Fine</i>
ENERGY	FORCIFIELD	<i>COMPASSII</i>
	CHARGES	<i>Gasteiger</i>
	QUALITY	<i>Fine</i>
LOCATION		<i>Surface region defined by atom set</i>
PROPERTIES		<i>Low energy configurations</i>
		<i>Energy distribution</i>
	Minimum energy difference	<i>100.0 Kcal mol⁻¹</i>

- ***3Simulated annealing:** esta opción nos permite simular un sustrato cargado con el número de moléculas de adsorbato deseadas, utilizando el método Metropolis Monte Carlo (Metropolis et al., 1953), donde posibles configuraciones de adsorción se identifican al llevar a cabo búsquedas Monte Carlo (10 ciclos de 10^5 pasos) de la configuración espacial del sistema sustrato-adsorbato, mientras la temperatura decrece lentamente de 10^5 a 10^2 K.

CÁLCULOS DFT

A cada una de las moléculas de bifosfonato libres y adsorbidas, al igual que a la superficie 010 de la HAP sin adsorbato, las sometemos a una optimización estructural mediante cálculos DFT. Para ello, utilizamos la herramienta DMOL3 con los parámetros de la *Tabla 3*, que nos permite, además, simular un ambiente solvente de agua.

Tabla 3: Parámetros utilizados en los cálculos de optimización estructural de los bifosfonatos libres y adsorbidos, con DFT, mediante la herramienta DMOL3 de Material Studio 2016

SETUP	TASK	<i>Geometry Optimization</i>	
	QUALITY	<i>Customized</i>	
	FUNCTIONAL	<i>GGA*⁴ PBE*⁵</i>	
	CHARGE	<i>Carga correspondiente del bifosfonato</i>	
ELECTRONIC	INTEGRATION ACCURACY	<i>Fine</i>	
	SFC TOLERANCE* ⁶	<i>Medium (10^{-5})</i>	
	BASIS SET	<i>DNP*⁷</i>	
	MORE	SOLVENT	<i>Use solvation model</i>
			<i>Water</i>
		<i>Use COSMO*⁸</i>	

- ***4GGA:** aproximación general de gradiente.
- ***5PBE:** funcional intercambio-correlación de Perdew-Burke-Ernzerhof.
- ***6SFC TOLERANCE:** umbral de convergencia de la matriz densidad.
- ***7DNP:** (Doble Numerical with Polatization) set de bases de los orbitales atómicos.
- ***8COSMO:** (Conductor-like Screening Model) modelo continuo de solvatación.

COMPARACIÓN DE ENERGÍAS DE ADSORCIÓN DEL PROCEDIMIENTO MC Y DFT

Al utilizar la herramienta *Adsorption Location Calculation* podemos obtener, directamente, la energía de adsorción en kcal mol^{-1} en base a cálculos de Monte Carlo (MC). Podemos comparar los resultados antes y después de optimizarlos con cálculos de la teoría del funcional de la densidad (DFT) y ver las diferencias entre ambos tipos de metodologías.

El primer problema que nos encontramos es una diferencia de diez unidades de energía entre ambos cálculos, para poder comparar ambos métodos primero dividimos entre diez los resultados obtenidos con MC. Incluso así obtenemos diferencias de energías de adsorción grandes, una diferencia media del 60%, llegando hasta un 200% en la molécula 21 (*Figura 16*).

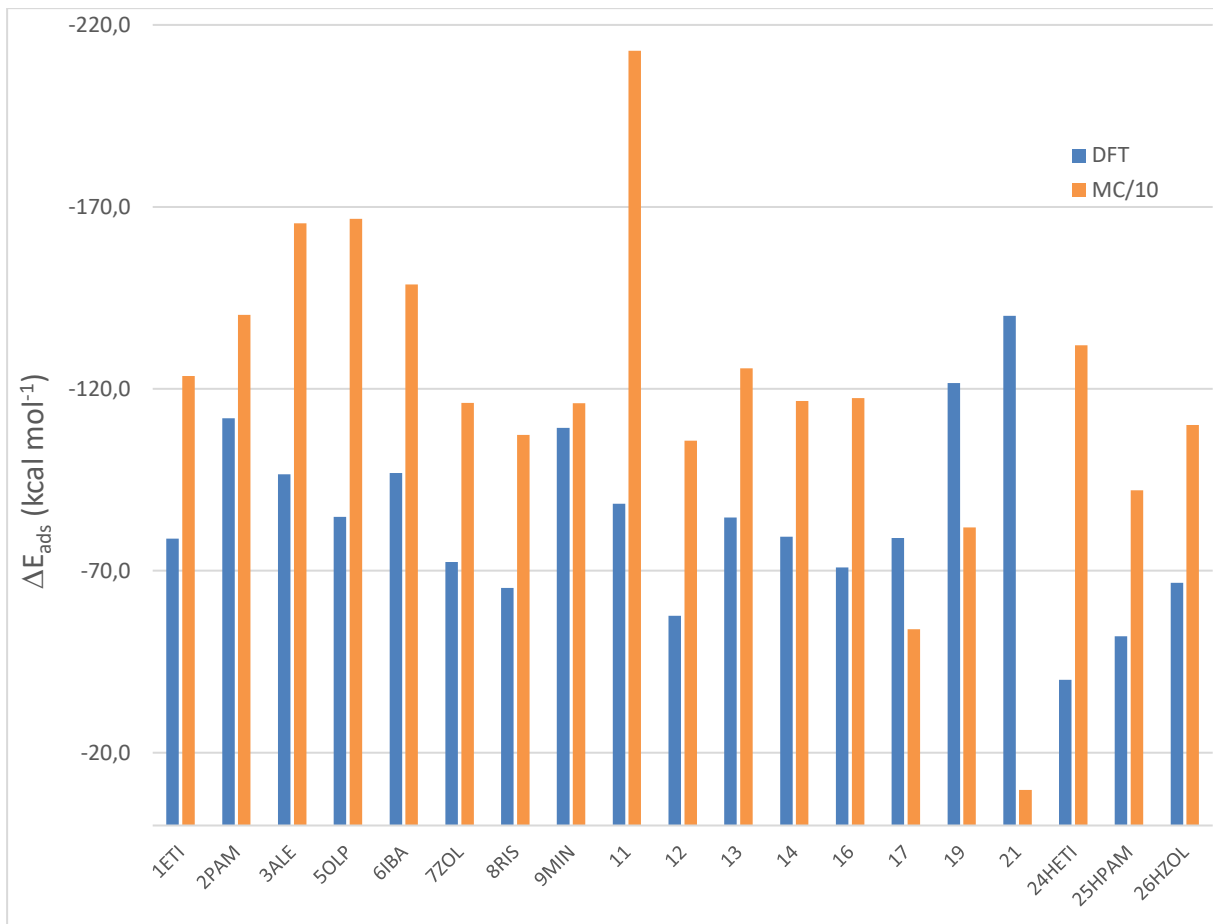


Figura 16: Comparación de los resultados de energías de adsorción de los bifosfonatos con la superficie 010 de la HAP entre los cálculos MC y DFT. Fuente: *Elaboración propia.*

El programa *Adsorption Location Calculation* utiliza campos de fuerza que no consideran la polarizabilidad de las moléculas, ni el efecto solvente, una característica muy importante a la hora de estudiar interacciones electroestáticas con moléculas orgánicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenidas las estructuras optimizadas mediante DFT podemos comparar los resultados. Mediante las energías de adsorción (*Tabla 4*) y las interacciones formadas con la superficie 010 de la hidroxiapatita (HAP), evaluamos cualitativamente el efecto de la cadena lateral -R₁ y la longitud, grupo funcional y carga de la cadena -R₂ de los distintos bifosfonatos (BPs).

La fuerza de interacción entre el inhibidor adsorbido por la superficie 010 de la HAP se ha calculado como la energía electrónica de adsorción de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Delta E_{Ads} = E_{molecula + HAP} - (E_{molecula} + E_{HAP})$$

Donde, E_{molecula + HAP} es la energía total del BP adsorbido en la superficie 010 de la HAP, E_{molecula} es la energía de los BPs solvatados y E_{HAP} la energía de la superficie en contacto con el solvente.

Tabla 4: Energías de adsorción de los diferentes BPs (*Figuras 11, 12 y 13*) con la superficie 010 de la HAP calculadas con DFT en DMOL3. Se ha comparado el incremento de energía cogiendo la molécula 1ETI como referencia ($\Delta\Delta E_{Ads}$).

Bifosfonato	R ₁	R ₂	Carga total	ΔE_{Ads} kcal mol ⁻¹	$\Delta\Delta E_{Ads}$ kcal mol ⁻¹
1ETI	-OH	-CH ₃	-2	-78,8	0,0
2PAM	-OH	-(CH ₂) ₂ -NH ₃ ⁺	-1	-111,9	-33,1
3ALE	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-1	-96,5	-17,7
4NER	-OH	-(CH ₂) ₅ -NH ₃ ⁺	-1	-	-
5OLP	-OH	-(CH ₂) ₂ -NH ⁺ (CH ₃) ₂	-1	-84,8	-6,0
6IBA	-OH	-(CH ₂) ₂ -NH ⁺ (-CH ₃)(-CH ₂) ₄ -CH ₃	-1	-96,9	-18,1
7ZOL	-OH	-CH ₂ -(C ₃ N ₂ H ₃)	-2	-72,4	6,4
8RIS	-OH	-CH ₂ -(C ₅ NH ₅)	-2	-65,3	13,5
9MIN	-OH	-CH ₂ -(C ₇ N ₂ H ₅)	-2	-109,3	-30,5
10	-OH	-H	-2	-	-
11	-OH	-CH ₂ -NH-C-(NH ₂) ₂ ⁺	-1	-88,4	-9,6
12	-OH	-S ⁺ (CH ₃) ₂	-1	-57,6	21,2
13	-OH	-CH ₂ -(C ₅ NH ₄) ⁺ -F	-1	-84,6	-5,8
14	-OH	-CH ₂ -(C ₄ NOH ₅) ⁺	-1	-79,4	-0,6
15	-OH	-OH	-2	-	-
16	-OH	-(CH ₂) ₂ -OH	-2	-70,9	7,9
17	-OH	-(CH ₂) ₃ -COO ⁻	-3	-79,0	-0,2
18	-OH	-NH-(C ₅ NH ₃)-COO ⁻	-3	-	-
19	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH ⁺ (CH ₂ -COO ⁻)-(CH ₂) ₄ -CH ₃	-2	-121,6	-42,8
20	-OH	-(CH ₂) ₃ -NH-CO-C(COO ⁻) ₂ -OH	-4	-	-
21	-OH	-(CH ₂) ₃ -C(PO ₃ H ⁻) ₂ OH	-4	-140,1	-61,3
22	-OH	-CH(COO ⁻)CH ₂ -COO ⁻	-4	-	-
23	-OH	-(CH ₂)-PO ₃ H ⁻	-3	-	-
24HETI	-H	-CH ₃	-2	-40,0	38,8
25HPAM	-H	-(CH ₂) ₂ -NH ₃ ⁺	-1	-52,0	26,8
26HZOL	-H	-CH ₂ -(C ₃ N ₂ H ₃)	-2	-66,7	12,1

Como podemos observar, algunas moléculas (4NER, 10, 15, 18, 20, 22 y 23) no han convergido correctamente y no las hemos considerado en el presente trabajo.

Obtenemos, además, las interacciones efectivas más probables de cada BP con la superficie, y consigo mismo, lo que nos permitirá comprender mejor la naturaleza de la adsorción (*Tabla 5*).

Dichas interacciones las clasificamos en: electroestáticas de los fosfonatos con los iones calcio de la superficie ($O_{BP} \cdots Ca_{HAP}$), enlaces de hidrógeno fuertes entre los hidróxidos de la HAP y los fosfonatos ($OH_{HAP} \cdots OPO_{2BP}$) o grupo hidróxido de las moléculas con los fosfatos de la HAP ($OH_{BP} \cdots OPO_{4HAP}$), enlaces de hidrógeno débiles entre los distintos grupos funcionales y los fosfatos o hidroxilos de la HAP ($CH_{BP} \cdots OPO_{4HAP}$, $OH_{BP} \cdots OH_{HAP}$, $NH_{BP} \cdots OH_{HAP}$) e interacciones de enlace de hidrógeno intramoleculares ($NH \cdots O$, $CH \cdots O$).

Tabla 5: Características geométricas de los diferentes BPs adsorbidos a la superficie 010 de la HAP. Número de interacciones en función de su fuerza.

<i>Bifosfonato</i>	Electroestáticos $O_{BP} \cdots Ca_{HAP}$	Enlace H fuerte $OH_{HAP} \cdots OPO_{2BP}$ / $OH_{BP} \cdots OPO_{4HAP}$	Enlace H débil $CH_{BP} \cdots OPO_{4HAP}$ / $OH_{BP} \cdots OH_{HAP}$ / $NH_{BP} \cdots OH_{HAP}$	Enlace H Intramolecular $NH \cdots O$ / $CH \cdots O$
1ETI	2	2	-	-
2PAM	2	3	1	2
3ALE	2	1	-	-
5OLP	2	-	-	1
6IBA	2	-	-	2
7ZOL	2	1	-	3
8RIS	2	2	-	1
9MIN	1	2	-	2
11	2	2	1	2
12	1	2	-	-
13	2	3	-	1
14	2	3	-	3
16	2	2	-	-
17	2	2	-	-
19	3	2	1	-
21	4	2	1	-
24HETI	2	1	-	-
25HPAM	2	2	-	2
26HZOL	2	1	-	1

El programa nos indica la distancia exacta de dichas interacciones, sin embargo, estas no se tomarán en cuenta, y se discutirán los resultados en función del número y naturaleza de las interacciones (*Figura 17*).

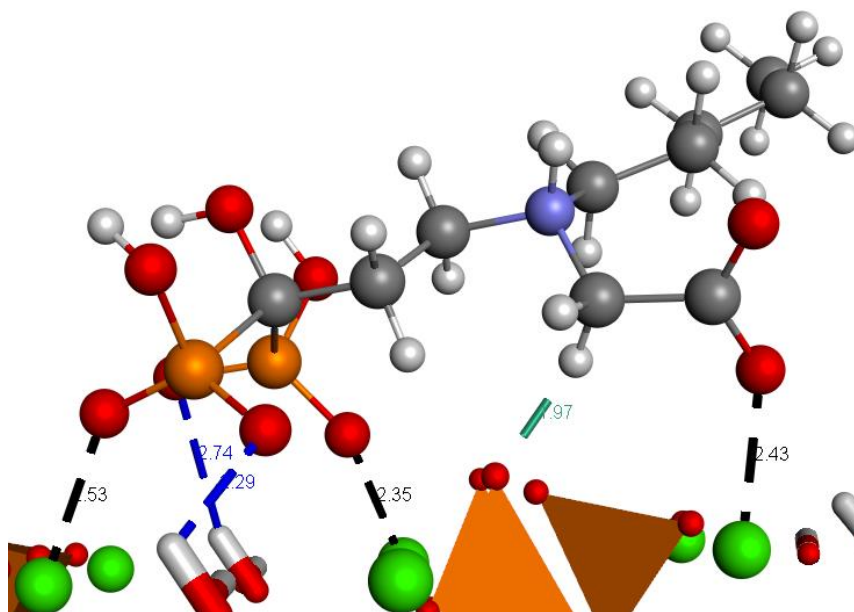


Figura 17: Resultado del bifosfonato 19 y su interacción con HAP 010 para los cálculos DFT en DMOL3. En negro se muestran las posibles interacciones electroestáticas, en azul enlaces de H fuertes y en turquesa enlaces de H débiles. Fuente: *Elaboración propia*.

Para comparar mejor los resultados, hemos referenciado todos los BPs con la molécula 1ETI (*Tabla 4*). De esta manera, podemos observar rápidamente qué BPs poseen mayor o peor energía de adsorción (*Figura 18*).

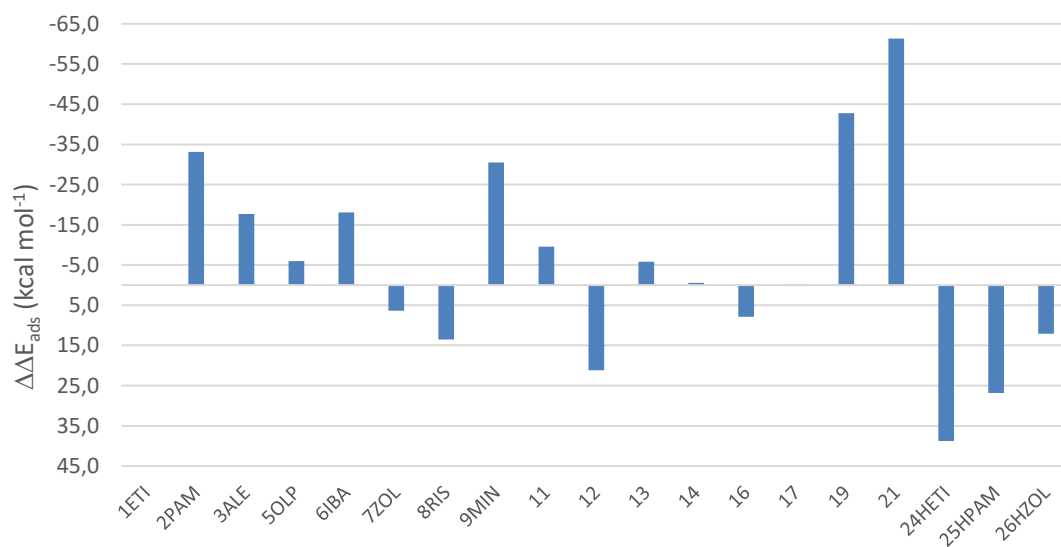


Figura 18: Diferencias en energías de adsorción de los BPs con la superficie 010 de la HAP en referencia a la molécula 1ETI ($\Delta\Delta E_{Ads}$). Fuente: *Elaboración propia*.

CADENA LATERAL -R₁

Cuando sustituimos el grupo funcional de la cadena lateral -R₁ de las moléculas de etidronato (1ETI), pamidronato (2PAM) y zoledronato (7ZOL) por un grupo menos electronegativo, como el hidrógeno, obtenemos peores energías de adsorción para las tres moléculas (*Figura 19*). La diferencia de los bifosfonatos análogos con hidrógeno en su energía de adsorción es de 5.7 kcal mol⁻¹ como mínimo, ZOL/HZOL, y de hasta 59.9 kcal mol⁻¹ en el más extremo de los casos, PAM/HPAM.

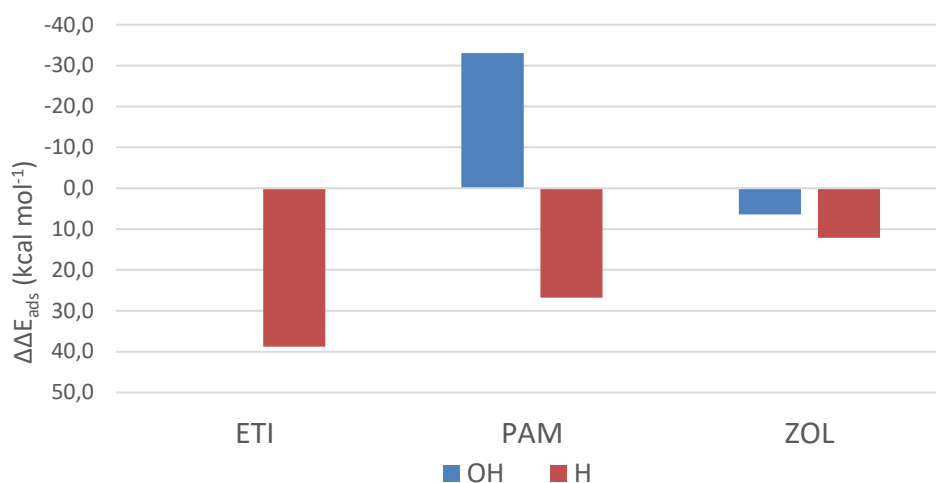


Figura 12: Comparación entre las diferencias de la energía de adsorción ($\Delta\Delta E_{Ads}$) obtenidas para la cadena lateral $-R_1$. Fuente: *Elaboración propia*.

El grupo hidroxilo en la cadena lateral $-R_1$ favorece en los tres casos una interacción de enlace de hidrógeno entre el hidroxilo y un fosfato de la superficie ($\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$), pasando de 2 y 3 interacciones de hidrógeno fuertes para el 1ETI y 2PAM, respectivamente, a 1 y 2 enlaces con el grupo hidrógeno (*Tabla 5*). La poca diferencia con el zoledronato y su análogo, se explica por la imposibilidad que ha presentado el primero de favorecer un enlace de hidrógeno entre los hidroxilos de la superficie y un fosfonato ($\text{OH}_{\text{HAP}} \cdots \text{OPO}_2_{\text{BP}}$), dejando el mismo número de interacciones con la HAP en ambos casos (*Tabla 5*).

CADENA LATERAL $-R_2$

La interpretación de los resultados obtenidos de las moléculas propuestas para estudiar el efecto del tamaño, carga y el resto funcional de la cadena lateral $-R_2$, se ha visto comprometido al no poder contar con varios bifosfonatos clave. Las clasificamos para poder ver mejor las diferencias en las energías de adsorción en función de la longitud de la cadena lateral para un mismo grupo funcional, y en función de la naturaleza del grupo funcional.

Grupo amino

Los bifosfonatos con un grupo amino a lo largo de la cadena $-R_2$ han obtenido mejores energías de adsorción en comparación con el etidronato. Las aminas primarias, pamidronato (2PAM) y alendronato (3ALE) han conseguido mejores resultados que las aminas terciarias, olpadronato (5OLP) e ibandronato (6IBA) (*Figura 18*). Aunque el grupo amino no interacciona directamente con la superficie de la hidroxiapatita, puede llegar a establecer un enlace de hidrógeno intramolecular ($\text{NH} \cdots \text{O}$) con el grupo hidroxilo de la cadena $-R_1$, que parece favorecer los enlaces de hidrógeno fuertes $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ con la superficie.

La molécula 2PAM, que presenta un enlace intramolecular $\text{NH} \cdots \text{O}$ con el grupo hidroxilo de la cadena lateral $-R_1$ y un enlace de hidrógeno fuerte $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ con la superficie, es la que consigue un mayor número de interacciones del grupo amino (*Tabla 5*) y una $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-33,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. En comparación, en el alendronato (3ALE), la cadena más larga aleja el grupo amino no solo de la posible interacción

intramolecular, sino perdiendo también el enlace de hidrógeno fuerte $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ (Figura 20), con una $\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$ de $-17,7 \text{ kcal mol}^{-1}$.

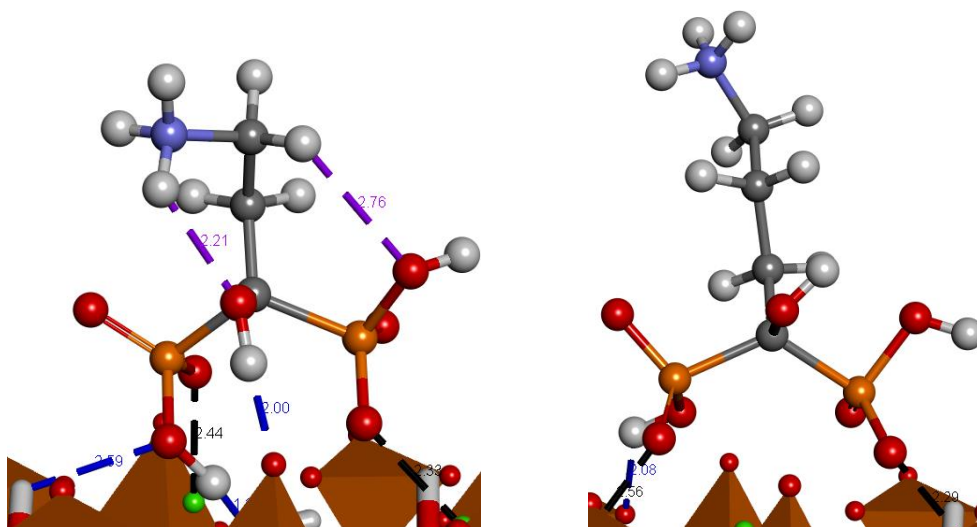


Figura 20: Comparación de las características geométricas de las moléculas 2PAM y 3ALE. En negro se muestran las interacciones electroestáticas, en azul enlaces de H fuertes y en violeta enlaces de H intramoleculares. Fuente: *Elaboración propia*

Ninguna de las aminas terciarias presenta ninguna interacción $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ (Tabla 5) mostrando una energía de adsorción más parecida al etidronato. La diferencia de energías de adsorción de estas últimas podría deberse únicamente a la sustitución de las aminas siendo $\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$ de -6 kcal mol^{-1} en el olpadronato (50LP) y de $-18,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ en el ibandronato (6IBA).

Grupo aromático

El zoledronato (7ZOL), risedronato (8RIS) y minodronato (9MIN) y la molécula 13 (Figura 13) contienen nitrógenos aromáticos en la cadena lateral $-\text{R}_2$ y, a excepción del minodronato, presentan un incremento positivo o prácticamente nulo en las energías de adsorción en comparación al 1ETI. Ninguna de las moléculas consigue alguna interacción de la cadena $-\text{R}_2$ con la superficie, aunque sí que condicionan enlaces de hidrógeno intramoleculares $\text{CH} \cdots \text{O}$ (Tabla 5).

El risedronato (8RIS), con la diferencia en positivo más alta entre el grupo aromático, $\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$ de $+13.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, presenta un único enlace intramolecular $\text{CH} \cdots \text{O}$ (Tabla 5) aleja al grupo hidroxilo de la cadena lateral $-\text{R}_1$ de la superficie del mineral, eliminando el enlace $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ (Figura 21). El zoledronato (7ZOL), con $\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$ de $+6.4 \text{ kcal mol}^{-1}$, el minodronato (9MIN), con $\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$ de $-30.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ con enlaces intramoleculares $\text{CH} \cdots \text{O}$ con los fosfonatos de la molécula, pierden la posible interacción electrostática entre el fosfonato y el calcio $\text{O}_{\text{BP}} \cdots \text{Ca}_{\text{HAP}}$, pero no llegan a perder el enlace $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ del hidroxilo. El tamaño del ciclo aromático podría explicar la diferencia de casi 24 kcal mol^{-1} , llegando a estabilizar al minodronato mediante la nube electrónica pi, por resonancia o mediante interacción electrostática con una franja catiónica de la superficie 010 como ya vimos en la Figura 8. La molécula 13, con $\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$ de $-5.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, aún con enlaces intramoleculares $\text{CH} \cdots \text{O}$ con el fosfonato no pierde ninguna interacción. Siendo la única molécula aromática con carga positiva la comentaremos en el grupo catiónico.

Grupos catiónicos

Los bifosfonatos 11, 12, 13 y 14 (*Figura 13*) presentan grupos funcionales con carga positiva de facto, a diferencia del grupo amino, que los consideramos con carga por la protonación a pH fisiológico.

En el caso de la molécula 12, el grupo tiol terciario entorpece las interacciones con la superficie, $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $+21.2 \text{ kcal mol}^{-1}$, debido a la pérdida de una interacción electrostática $O_{BP}\cdots Ca_{HAP}$. La molécula 11, con $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-9.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, pierde el enlace de hidrógeno del hidroxilo de la cadena $-R_1$, pero logra dos interacciones de enlace de hidrógeno favorables, fuerte $OH_{HAP}\cdots OPO_2_{BP}$ y débil $CH_{BP}\cdots OPO_4_{HAP}$, consiguiendo una interacción débil más que la 1ETI. Ambas moléculas 13, con $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-5.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, y 14, con $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-0.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, ganan un enlace $OH_{HAP}\cdots OPO_2_{BP}$. La adición de un flúor u oxígeno, respectivamente, no ha contribuido en la interacción con el mineral. Todos estos cambios en las características geométricas se pueden observar en la *tabla 5*.

La carga positiva, aunque no afecte de forma directa, parece perjudicar a la adsorción de los bifosfonatos con la superficie 010 del mineral.

Grupos neutros

El único bifosfonato con grupo neutro, no aromático, que hemos podido obtener una energía de adsorción, es la molécula 16, que contiene un grupo hidroxilo al final de la cadena $-R_2$. Al igual que en la cadena $-R_1$, el efecto del grupo hidroxilo debería ser favorable para aumentar el número de enlaces de hidrógeno $OH_{BP}\cdots OPO_4_{HAP}$, sin embargo, la cadena lateral $-R_2$ no es suficientemente larga para aproximar el grupo hidroxilo a la superficie (*Tabla 5*), en consecuencia, obtenemos una energía de adsorción muy parecida a la del etidronato con un $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $+7.9 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Grupos aniónicos

La introducción de grupos funcionales aniónicos como el grupo carboxílico, 17 y 19, u otro bifosfonato, 21, ha resultado en un incremento negativo considerable en la energía de adsorción, cuando este grupo es capaz de interactuar eficientemente con la superficie 010 de la hidroxiapatita.

La molécula 17 con $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ pierde una interacción electrostática $O_{BP}\cdots Ca_{HAP}$ del fosfonato con los cationes calcio de la superficie, para ganar la misma con el grupo carboxílico del final de la cadena lateral $-R_2$ (*Tabla 5*). Aumentando la distancia de un enlace sigma, la molécula 19 (*Figura 16*) es capaz de conseguir el mismo resultado sin perder la posición favorable del bifosfonato, resultando en $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-42.8 \text{ kcal mol}^{-1}$. En el proceso, además, gana un enlace de hidrógeno débil $CH_{BP}\cdots OPO_4_{HAP}$ que contribuye a esta estabilización. Para finalizar, la molécula 21, con $\Delta\Delta E_{Ads}$ de $-61.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, sobrepasa a todas las demás en energía de adsorción, al añadir un grupo bifosfonato idéntico al final de la cadena lateral $-R_2$, también se duplican los enlaces electrostáticos $O_{BP}\cdots Ca_{HAP}$ (*Tabla 5*), en consecuencia, mejora enormemente la energía de adsorción.

Es necesario remarcar la importancia de la longitud de la cadena ya que únicamente aquellos con, al menos, cuatro átomos de distancia hasta el grupo funcional han conseguido que este interactúe con la superficie. Además, cuando se ha priorizado la interacción de la cadena lateral -R₂, como ha ocurrido en estos últimos casos, se ha perdido cualquier enlace que pudiera tener la cadena lateral -R₁, como podemos ver en la *Figura 17*.

CARGA GLOBAL

Si consideramos únicamente la carga total de la molécula, como si fueran una esfera cargada, para estudiar su comportamiento con la superficie 010 de la hidroxiapatita, notamos una cierta inclinación a una mayor estabilidad cuanto mayor sea la carga negativa (*Figura 21*). Sin embargo, analizando cada bifosfonato en función de su carga, vemos muchas discrepancias dentro de un mismo grupo, confirmando una mayor importancia en la efectividad del grupo funcional de cada bifosfonato en conseguir un enlace electrostático o de hidrógeno, más que su efecto en la carga global para una interacción electrostática superficial.

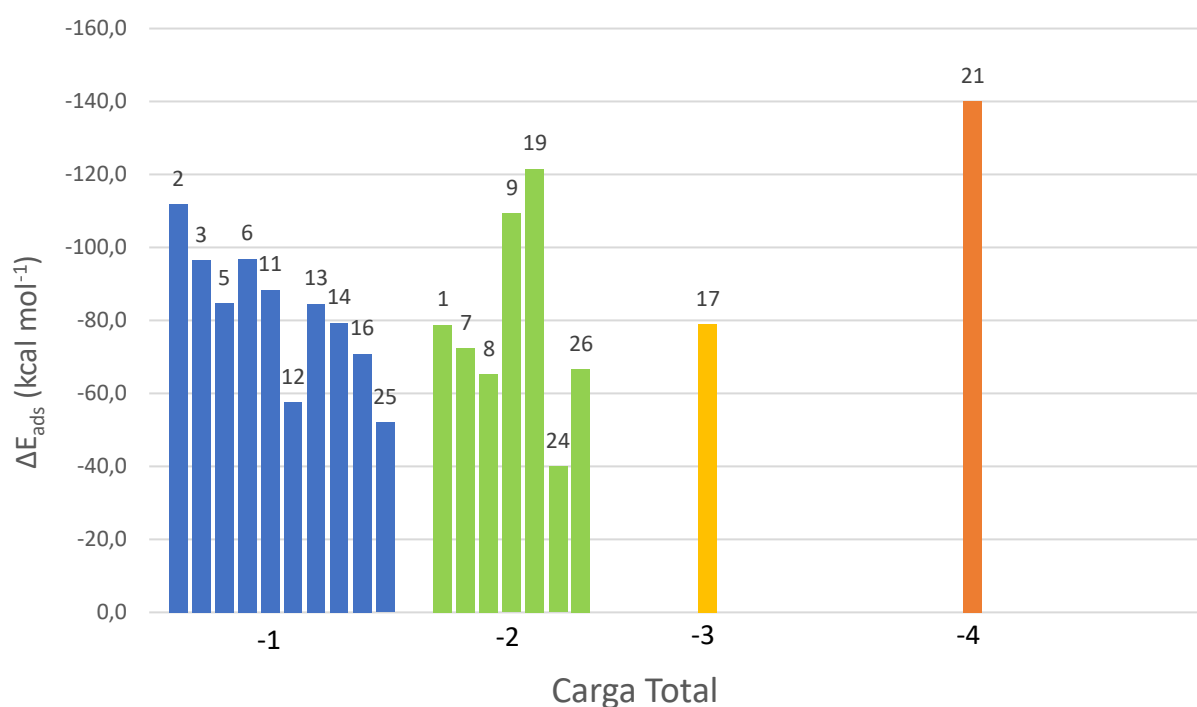


Figura 21: Agrupación de los distintos bifosfonatos propuestos (*Figuras 11, 12 y 13*) según su carga total y en función de la ΔE_{Ads} con la superficie 010 de la hidroxiapatita. Fuente: *Elaboración propia*.

COMPARACIÓN HIDROXIAPATITA 010 Y 001

En el trabajo realizado por Fernández et al., 2017, utilizando cálculos DFT para el estudio de la adsorción de los mismos 26 bifosfonatos en la cara 001 de la hidroxiapatita, se demostró, que las cargas negativas son las que más generan una interacción electrostática favorable entre el bifosfonato y la superficie de la hidroxiapatita. También remarca la importancia del largo de la cadena, que permita la formación de dicha interacción.

Es interesante saber cómo interaccionan los bifosfonatos en ambas caras, ya que esta diferencia o semejanza puede tener un efecto importante en su eficiencia como inhibidor. Utilizando los datos obtenidos por Fernández et al., 2017 para la superficie 001 de la hidroxiapatita y comparando estos resultados con los obtenidos en nuestro trabajo observamos diferencias significativas en la mayoría de las moléculas. Hemos realizado un estudio estadístico mediante una prueba t de dos colas, con un nivel de confianza del 95%, resultando en una $t_{\text{estadística}}$ de 2.95 frente a una $t_{\text{crítica}}$ de 2.10. Podemos asegurar que el conjunto de bifosfonatos se comporta de distinta forma si interaccionan con la superficie 001 o en la superficie 010.

Si comparamos los resultados en referencia al etidronato (Figura 22) podemos tener una imagen más clara sobre la diferencia antes mencionada.

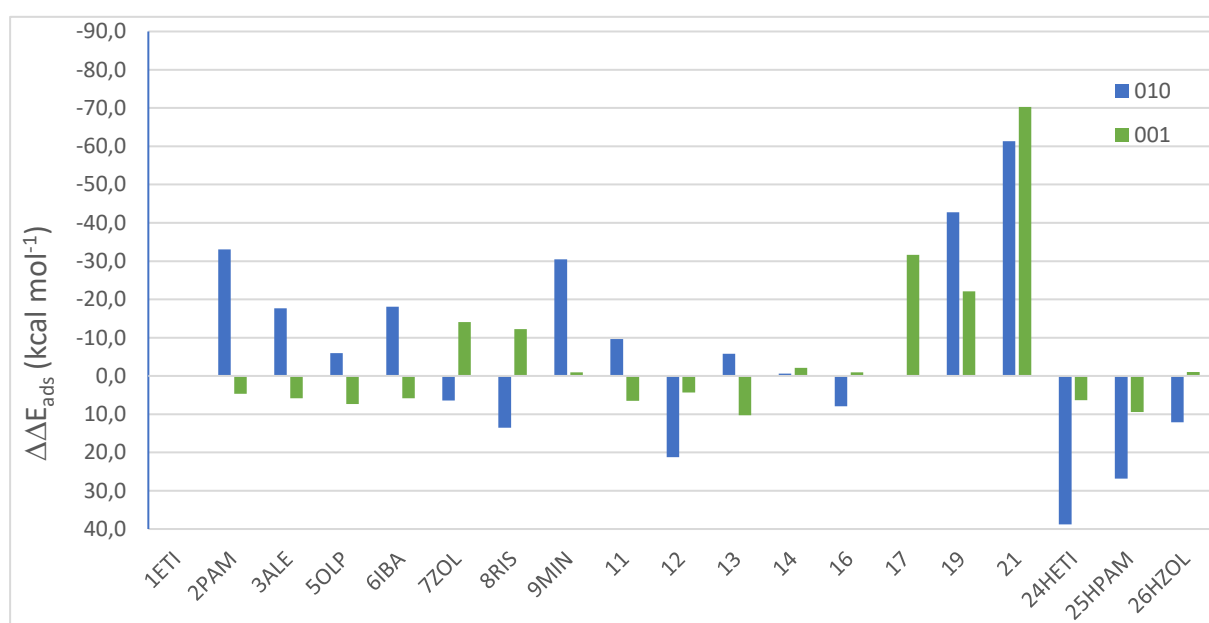


Figura 22: Comparación de los resultados de energías de adsorción de los bifosfonatos con la superficie 010 y 001 de la hidroxiapatita relativas al etidronato ($\Delta\Delta E_{\text{Ads}}$). Fuente: *Elaboración propia.*

La peculiaridad de la superficie 010 es que el potencial electrostático se reparte en franjas (Figura 8), mientras que la superficie 001 presenta zonas discretas y periódicas, más parecido a una red iónica (Figura 5). Esta diferencia podría explicar, por ejemplo, la estabilidad que presentan los grupos amino con la superficie 010 frente a la 001.

El principal anclaje de los bifosfonatos reside en la unión del grupo fosfonato con los cationes calcio de la superficie, esto posiciona en primera instancia al bifosfonato en una franja positiva en la superficie 010, dejando la cadena lateral $-R_2$, si la longitud lo permite, cerca de dos franjas negativas. La carga positiva derivada de la protonación de las aminas parece estabilizar en estas condiciones el bifosfonato en la superficie 010, cosa que no consigue en la 001.

Aun así, ambas superficies presentan energías de adsorción favorables para las moléculas 19 y 21, siendo las mejores candidatas como bifosfonatos para su adsorción con la hidroxiapatita.

CONCLUSIONES

Podemos concluir, en base a los resultados teóricos obtenidos de las energías de adsorción con los diferentes bifosfonatos con la superficie 010 de la hidroxiapatita, y los datos expuestos por el grupo de Fernández et al., 2017 que:

1. Un grupo hidroxilo en la cadena lateral $-R_1$ es capaz de formar enlaces de hidrógeno fuertes $\text{OH}_{\text{BP}} \cdots \text{OPO}_4_{\text{HAP}}$ que estabilizan la adsorción de los bifosfonatos en la superficie 010 de la hidroxiapatita entre 5.7 y 59.9 kcal mol⁻¹.
2. La longitud de la cadena lateral $-R_2$ es importante para conseguir una posición eficiente de los grupos funcionales. Aunque parece que los grupos funcionales con carga mejoran la estabilidad en la adsorción de los bifosfonatos en la superficie 010, aquellas moléculas con grupos aniónicos han obtenido mejores resultados.
3. La carga global de los bifosfonatos es menos importante que la eficiencia de los grupos funcionales de las diferentes moléculas para interactuar con la superficie.
4. Las superficies 010 y 001 de la hidroxiapatita pueden llegar a tener comportamientos bastante diferentes, con las cargas de los grupos funcionales de los bifosfonatos utilizados, debido a su diferencia en la distribución de su potencial electrostático. Los bifosfonatos 19 y 21 presentan energías de adsorción favorables en ambas caras.

BIBLIOGRAFÍA

Almora-Barrios, N., Austen, K. F., & De Leeuw, N. H. (2009). Density functional theory study of the binding of glycine, proline, and hydroxyproline to the hydroxyapatite (0001) and (0110) surfaces. *Langmuir*, 25(9), 5018–5025.

Biovia 2015. Biovia Material Studio 2016. Copyright 2015. Dassault Systemes.

Chiatti, F., Delle Piane, M., Ugliengo, P., & Corno, M. (2016a). Water at hydroxyapatite surfaces: the effect of coverage and surface termination as investigated by all-electron B3LYP-D* simulations. *Theoretical Chemistry Accounts*, 135(3), 1–15.

Chiatti, F., Delle Piane, M., Ugliengo, P., & Corno, M. (2016b). Water at hydroxyapatite surfaces: the effect of coverage and surface termination as investigated by all-electron B3LYP-D* simulations. *Theoretical Chemistry Accounts*, 135(3), 54.

Corno, M., Rimola, A., Bolis, V., & Ugliengo, P. (2010). Hydroxyapatite as a key biomaterial: Quantum-mechanical simulation of its surfaces in interaction with biomolecules. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(24), 6309–6329.

Fernández, D., Ortega-Castro, J., & Frau, J. (2013). Human farnesyl pyrophosphate synthase inhibition by nitrogen bisphosphonates: A 3D-QSAR study. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(8), 739–754.

Fernández, D., Ortega-Castro, J., & Frau, J. (2017a). Theoretical study of the deposition and adsorption of bisphosphonates on the 001 hydroxyapatite surface: Implications in the pathological crystallization inhibition and the bone antiresorptive action. *Applied Surface Science*, 392, 204–214.

Fernández, D., Ortega-Castro, J., & Frau, J. (2017b). Theoretical study of the HAP crystal growth inhibition potency of pyrophosphate, etidronate, citrate and phytate. Deciphered the adsorbed conformation of phytate on the HAP(001) surface. *Applied Surface Science*, 408, 110–116.

Grases, F., Sanchis, P., Perelló, J., Isern, B., Prieto, R. M., Fernández-Palomeque, C., & Torres, J. J. (2007). Effect of crystallization inhibitors on vascular calcifications induced by vitamin D - A pilot study in Sprague-Dawley rats. *Circulation Journal*, 71(7), 1152–1156.

Hochrein, O., Kniep, R., & Zahn, D. (2005). Atomistic simulation study of the order/disorder (monoclinic to hexagonal) phase transition of hydroxyapatite. *Chemistry of Materials*, 17(8), 1978–1981.

Kay, M. I., Young, R. A., & Posner, A. S. (1964). Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature*, 204(4963), 1050–1052.

Kirkham, J., Brookes, S. J., Shore, R. C., Wood, S. R., Smith, D. A., Zhang, J., Chen, H., & Robinson, C. (2002). Physico-chemical properties of crystal surfaces in matrix-mineral interactions during mammalian biomineralisation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(1–2), 124–132.

Leu, C. T., Luegmayr, E., Freedman, L. P., Rodan, G. A., & Reszka, A. A. (2006). Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone*, 38(5), 628–636.

Ma, G., & Liu, X. Y. (2009). Hydroxyapatite: Hexagonal or monoclinic? *Crystal Growth and Design*, 9(7), 2991–2994.

Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., & Teller, E. (1953). Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1087–1092.

Mugnaioli, E., Reyes-Gasga, J., Kolb, U., Hemmerlé, J., & Brès, É. F. (2014). Evidence of noncentrosymmetry of human tooth hydroxyapatite crystals. *Chemistry - A European Journal*, 20(23), 6849–6852.

Nancollas, G. H., Tang, R., Phipps, R. J., Henneman, Z., Gulde, S., Wu, W., Mangood, A., Russell, R. G. G., & Ebetino, F. H. (2006). Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*, 38(5), 617–627.

Rivas, M., Casanovas, J., Del Valle, L. J., Bertran, O., Revilla-López, G., Turon, P., Puiggali, J., & Alemán, C. (2015). An experimental-computer modeling study of inorganic phosphates surface adsorption on hydroxyapatite particles. *Dalton Transactions*, 44(21), 9980–9991.

Robinson, J., Cukrowski, I., & Marques, H. M. (2006). Modelling the interaction of several bisphosphonates with hydroxyapatite using the generalised AMBER force field. *Journal of Molecular Structure*, 825(1–3), 134–142.

Suda, H., Yashima, M., Kakihana, M., & Yoshimura, M. (1995). Monoclinic to Hexagonal Phase Transition in Hydroxyapatite Studied by X-ray Powder Diffraction and Differential Scanning Calorimeter Techniques. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(17), 6752–6754.

Takahashi, H., Yashima, M., Kakihana, M., & Yoshimura, M. (2001). A differential scanning calorimeter study of the monoclinic transition in hydroxyapatite. *Thermochimica Acta*, 371, 53–56.

Zahn, D., & Hochrein, O. (2003). Computational study of interfaces between hydroxyapatite and water. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(18), 4004–4007.