



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

JOÃO RUFINO BEZERRA NETO

ABORDAGEM *AB INITIO* DO  
ALENDRONATO MOLECULAR E TRÊS DE  
SEUS CRISTAIS

FORTALEZA

2014

JOÃO RUFINO BEZERRA NETO

ABORDAGEM *AB INITIO* DO  
ALENDRONATO MOLECULAR E TRÊS DE  
SEUS CRISTAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química da Matéria Condensada.

Orientador:

Prof. Dr. Pedro de Lima Neto

Co-orientador:

Prof. Dr. Valder Nogueira Freire

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- B469a Bezerra Neto, João Rufino.  
Abordagem *ab initio* do alendronato molecular e três de seus cristais / João Rufino Bezerra Neto. – 2014.  
120 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Química da Matéria Condensada.  
Orientação: Prof. Dr. Pedro de Lima Neto.  
Coorientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.
1. Osteoporose. 2. Alendronato. 3. Raman, Espectroscopia de. I. Título.

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Físico-Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

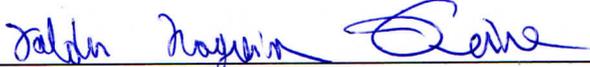
  
João Rufino Bezerra Neto

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 04/02/2014 .

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Pedro de Lima Neto  
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Valder Nogueira Freire  
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Paula Homem de Mello  
Universidade Federal do ABC – UFABC

*Dedico essa  
Dissertação à minha  
mãe  
e  
amigos próximos*

# AGRADECIMENTOS

Agradeço à orientação do prof. Pedro de Lima Neto do Departamento de Química, e a coorientação do prof. Valder Nogueira Freire do Departamento de Física, que me guia-ram em todas as etapas desse trabalho, muito contribuindo para minha aprendizagem e amadurecimento na química teórica;

Aos meu colegas, físicos e químicos, que sempre estiveram à disposição para discussões, contribuindo com críticas e sugestões diversas para o desenvolvimento desse trabalho, além de companhia durante as madrugadas de estudo no laboratório de simulação com-putacional Saturno do Departamento de física da UFC;

Quero agradecer também a minha mãe, Francisca Da Penha Pinheiro do Amarante, que sempre torceu por meu sucesso profissional, conferindo total apoio às minhas decisões; Aos amigos e familiares que sempre manifestaram sua torcida e crença no meu potencial durante todo o curso de mestrado.

Ao apoio financeiro da CAPES.

Ao meu amigo e colega de trabalho José Gadelha que forneceu uma ajuda fundamental no entendimento dos fundamentos teóricos.

E, claro, à amiga "irmã" Ana Lúcia, que sempre me forneceu um ótimo café, fundamental para me deixar esperto através da cansativa jornada de elaboração desta dissertação.

# RESUMO

Terapias estabelecidas para o tratamento da osteoporose, síndrome caracterizada por aumento na fragilidade óssea e fraturas, consistem primariamente de drogas que previnem a perda óssea, como os bisfosfonatos. Entre eles, o alendronato  $(\text{PO}_3)-(\text{OH})-\text{C}-((\text{CH}_2)_3\text{NH}_3)-(\text{PO}_3)$  é um dos tratamentos escolhidos na clínica, pois possui o  $\text{IC}_{50}=50$  nM. Neste trabalho é realizado um estudo do alendronato molecular e de três de seus cristais (alendronato de sódio trihidratado e anidro, e alendronato de cálcio) utilizando da Teoria do Funcional da Densidade (DFT). No primeiro caso, o foco são os confôrmeros de menor energia do alendronato molecular no vácuo, em meio aquoso de acordo com o modelo contínuo polarizável (PCM), e interagindo com três moléculas de água e um átomo de sódio de acordo com as características estruturais reveladas por difração de raios-X do cristal do alendrontao de sódio trihidratado; seus espectros vibracionais no infravermelho e Raman são calculados para explicar com detalhes as abundantes assinaturas do grupo fosfato no intervalo de frequência  $400\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ , com as atribuições dos modos vibracionais mais importantes. No caso dos cristais, são obtidas suas propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas na aproximação da gradiente generalizado levando-se em conta a descrição do termo de correlação e troca de Tchatschenko (GGA+TS); é apresentada a análise populacional de Hirshfeld na qual verificou-se que o alendronato nos três cristais encontra-se no estado zwitterionico. A partir do cálculo de estrutura de banda, foi obtido GAPs com valores muito próximos para os três cristais, porém, com densidade de estados bem característica para cada cristal. São apresentadas as massas efetivas, função dielétrica e absorções ópticas teóricas para todos os cristais.

# ABSTRACT

Well known therapies for the treatment of osteoporosis, syndrome characterized by increased bone fragility and fracture consist primarily of drugs which prevent bone losses, such as bisphosphonates. Among them, alendronate ( $\text{PO}_3$ )-(OH)-C-(( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub> NH<sub>3</sub>)-(PO<sub>3</sub>) is one of the chosen treatments in the clinic, IC<sub>50</sub> = 50 nM. In this work a study of the molecular alendronate and three of its crystals (sodium alendronate trihydrate and anhydrous and calcium alendronate) is performed in the scope of Density Functional Theory (DFT). In the first case, the focus is the lowest energy conformations of the molecular alendronate in vacuum, in an aqueous medium in accordance with the model of polarization continuum (PCM), and interacting with three molecules of water of a sodium atom based on the characteristics structural relevadas diffraction X-ray crystal alendronate sodium trihydrate; their vibrational infrared and Raman spectra are calculated to explain in detail the abundant signatures of the phosphate group in the frequency range 400-1400 cm<sup>-1</sup> with the assignments of the most important vibrational modes. In the case of crystals, their structural, electronic and optical properties are obtained in the generalized gradient approximation taking into account the description of the term correlation and exchange Puchachenko (GGA+TS); Hirshfeld population analysis in which verified is presented alendronate is that the three crystals is in zwitterionic state. From the calculation of the band structure was obtained GAPS with very close values for the three crystals, however, with the density of states and characteristic for each crystal. The effective masses, dielectric function and theoretical optical absorptions for all crystals are presented.

# Lista de Tabelas

1	Dados Cristalográficos dos cristais: alendronato de sódio trihidratado (AST), alendronato de sódio anidro (ASA) e alendronato de cálcio anidro (ACA) . . . . .	p. 34
2	Energias de estabilização das ligações de hidrogênio na molécula de alendronato obtidas por NBO. . . . .	p. 39
3	Assinalamentos dos modos IR e RAMAN mais importantes dos modos do espectro do cristal AST medido. Número de onda $\omega$ está $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	p. 44
4	Parâmetros de rede (em Å), volume da célula unitária (em $\text{Å}^3$ ), ângulo $\beta$ (em graus) e desvios em relação aos valores experimentais das células unitárias otimizadas dos cristais AST, ASA e ACA calculados em GGA+Ts. . . . .	p. 51
5	Cargas atômicas de Hirshfeld por átomos e por grupos nos cristais AST, ASA e ACA, calculados no funcional GGA+Ts . . . . .	p. 56
6	Assinalamentos dos modos IR e RAMAN mais importantes para o sistema de alendronato em VAC. Número de onda $\omega$ está $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	p. 113
7	Assinalamentos dos modos IR e RAMAN mais importantes para o sistema de alendronato em PCM. Número de onda $\omega$ está $\text{cm}^{-1}$ . . . . .	p. 114

# Lista de Figuras

- 1 A estrutura hierárquica de um osso típico em várias escalas. . . . . p. 18
- 2 Mecanismo simplificado do processo de remodelagem óssea. O ligante osteoclastogênico, RANKL, ativa os precursores de osteoclastos. Há uma fase de transição marcada pela comutação entre a reabsorção e formação de osso, incluindo a participação de alguns fatores (pentágonos e triângulos amarelos), moléculas de membrana. . . . . p. 19
- 3 (a) Postura de uma pessoa com osteoporose. (b) Radiografia de uma fratura na bacia e a comparação entre um osso normal e com osteoporose. p. 20
- 4 Desenho das moléculas de pirofosfato, e bifosfonatos que tem sido usados no tratamento da osteoporose (adaptada de [14]). . . . . p. 22
- 5 Custos mensais de alguns BPss que tem sido usados no tratamento da osteoporose. . . . . p. 23
- 6 Mecanismo de ação simplificado dos Non-N-BPs e N-BPs sobre a inibição de osteoclastos. . . . . p. 24
- 7 (a) Ligação N-H-O favorece a afinidade sobre a HAP. (b) Ângulo de  $132^\circ$  favorece a formação da ligação de hidrogênio 9 (adaptada de [17]). . . . p. 26
- 8 (a) Curva da porcentagem versus pH para os nove estados de protonação com os respectivos valores de  $pK_a$ ; (b) nove estados de protonação para o ácido alendrônico. . . . . p. 31
- 9 (a) Representação planar do Alend5 e Ângulos diedros  $\alpha$  e  $\beta$ ; (b) Superfície de Energia Potencial gerada em vácuo; (c) Superfície de Energia Potencial gerada em PCM, considerando como solvente a água. . . . . p. 36
- 10 Estruturas resultantes do Scan, realizado em vácuo, selecionadas para serem otimizadas. Suas energias relativas são apresentadas em Kcal/mol. p. 37

## Lista de Figuras

- 11 Estruturas do alendronato otimizadas no vácuo com suas respectivas energias relativas (em Kcal/mol). Em destaque os átomos que realizam ligação de hidrogênio e o comprimento de cada ligação. . . . . p. 38
- 12 Estruturas resultantes do Scan, realizado em PCM, selecionadas para serem otimizadas. . . . . p. 40
- 13 Estruturas otimizadas em PCM com suas energias relativas em Kcal/mol. p. 40
- 14 Estrutura baseada nos dados cristalográficos do cristal de alendronato de sódio trihidratado. . . . . p. 41
- 15 Espectros IR teóricos calculados em DFT da molécula de alendronato em vácuo e em PCM (solvente água).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente. . . . . p. 42
- 16 Espectros IR medido do cristal alendronato de sódio trihidratado (EXP); espectro IR calculado em DFT da molécula de alendronato interagindo com três moléculas de água e um íon sódio (CLA).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente. . . . . p. 45
- 17 Deslocamentos atômicos na molécula de alendronato associados aos modos IR 420,33, 475,08, 780,78, 1174,26, 1250,71 e 1270,25  $\text{cm}^{-1}$ . . . . . p. 47
- 18 Espectro Raman teóricos calculados em DFT da molécula de alendronato em vácuo e em PCM (solvente água).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente. . . . . p. 48
- 19 Espectros Raman medido do cristal alendronato de sódio trihidratado (EXP); espectro Raman calculado em DFT da molécula de alendronato interagindo com três moléculas de água e um íon sódio (CLA).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente. . . . . p. 49
- 20 Deslocamentos atômicos na molécula de alendronato associados aos modos Raman 675,18, 1092,80, 1346,80, and 1371,17  $\text{cm}^{-1}$ . . . . . p. 50
- 21 (a)molécula de AST presente no cristal.(b)Estrutura da célula unitária do cristal AST. (c) colunas de água e íons Sódio presentes o cristal AST. p. 53

## Lista de Figuras

22	(a)molécula de ASA presente no cristal.(b)Estrutura da célula unitária do cristal ASA. (c) colunas de água e íons Sódio presentes o cristal ASA.	p. 54
23	(a)molécula de ACA presente no cristal.(b)Estrutura da célula unitária do cristal ACA. (c) colunas de água e íons Sódio presentes o cristal ACA.	p. 55
24	Estrutura de Banda calculada em GGA+Ts do cristal AST. . . . .	p. 57
25	Estrutura de Banda calculada em GGA+Ts do cristal ASA. . . . .	p. 58
26	Estrutura de Banda calculada em GGA+Ts do cristal ACA. . . . .	p. 59
27	Densidade de estados em GGA+Ts dos cristais AST, ASA e ACA. . . .	p. 61
28	Massas efetivas calculadas em torno do ponto de alta simetria $\Gamma$ para o cristal AST. . . . .	p. 62
29	Massas efetivas calculadas em torno do ponto de alta simetria $\Gamma$ para o cristal ASA. . . . .	p. 63
30	Massas efetivas calculadas em torno do ponto de alta simetria $\Gamma$ para o cristal ACA. . . . .	p. 63
31	Partes real(preto) e imaginária(vermelho) da função dielétrica do cristal AST. Diferentes planos de polarização para a radiação incidente são indicados no canto superior direito de cada gráfico. O caso de radiação incidente sobre uma amostra policristalina também é indicado (POLI).	p. 65
32	Partes real(preto) e imaginária(vermelho) da função dielétrica do cristal ASA. Diferentes planos de polarização para a radiação incidente são indicados no canto superior direito de cada gráfico. O caso de radiação incidente sobre uma amostra policristalina também é indicado (POLI).	p. 66
33	Partes real(preto) e imaginária(vermelho) da função dielétrica do cristal ACA. Diferentes planos de polarização para a radiação incidente são indicados no canto superior direito de cada gráfico. O caso de radiação incidente sobre uma amostra policristalina também é indicado (POLI).	p. 66
34	Absorções teóricas em GGA+Ts para os cristais AST, ASA e ACA. . .	p. 67
35	Tipos de ossos quanto a sua forma. . . . .	p. 72
36	Estrutura do osso com suas principais regiões e organização. . . . .	p. 73
37	Principais células ósseas. . . . .	p. 75

## *Lista de Figuras*

38	Unidade Multicelular Básica (UMB) da remodelagem óssea. . . . .	p. 77
39	Comparação entre o osso normal e o osso com osteoporose . . . . .	p. 78
40	Estruturas químicas do pirofosfato (à esquerda) e bifosfonato (à direita).	p. 81
41	Classificação dos BPs quanto ao seu modo de ação: non-BPs (Bifosfonatos não nitrogenados e N-BPs Bifosfonatos nitrogenados. . . . .	p. 83
42	(a) Mecanismo de ação dos non-BPs. (b) Estrutura do ATP e metabólitos análogos do ATP . . . . .	p. 86
43	Caminho metabólico do mevalonato . . . . .	p. 87
44	Sistema de coordenada molecular: $i, j$ = elétrons; $I, J$ = núcleos. . . . .	p. 90
45	Curva de potencial para um estado eletrônico $m$ de um sistema diatômico.	p. 92

# Lista de Siglas

HAP	Hidroxiapatita
BPs	Bifosfonatos
Non-N-BPs	Bifosfonatos não nitrogenados
N-BPs	Bifosfonatos nitrogenados
PDB	Protein Data Bank
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
AST	Alendronato de Sódio Trihidratado
ASA	Alendronato de Sódio Anidro
ACA	Alendronato de Cálcio Anidro
PBE	Perdew-Burke-Ernzerhof
GGA	Generalized Gradient Approximation
BFGS	Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno
SEP	Superfície de Energia Superficial
NBO	Natural Bond Order
IR	Espectroscopia Infravermelho
ZB	Zona de Brillouin
UMB	Unidade Multicelular Básica
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
BMD	Bond Mineral Density
PPi	Pirofosfato
FPFS	Farnesyl Pyrophosphate Synthase
non-BPs	Bifosfonatos não-nitrogenados
ATP	Trifosfato de adenosina

## *Lista de Siglas*

N-BPs	Bifosfonatos nitrogenados
$Ap_4A$	Tetrafosfato de diadenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
MK	mevalonato kinase
PMK	Fosfomevalonato Kinase
ADP	Difosfato de adenosina
IPP	isopentil-5-PP
FPP	Farnesil difosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	p. 18
<b>2</b>	<b>MÉTODOS E SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS</b>	p. 29
2.1	Procedimentos para a molécula . . . . .	p. 29
2.1.1	Estados de protonação . . . . .	p. 29
2.1.2	Estudo dos confômeros . . . . .	p. 32
2.1.3	Cálculo das propriedades vibracionais . . . . .	p. 32
2.2	Procedimento para os cristais . . . . .	p. 32
2.3	Procedimento Experimental . . . . .	p. 34
<b>3</b>	<b>ALENDRONATO MOLECULAR</b>	p. 35
3.1	Conformações do alendronato molecular . . . . .	p. 35
3.2	Espectros IR e RAMAN dos sistemas moleculares . . . . .	p. 39
<b>4</b>	<b>OS TRÊS CRISTAIS DO ALENDRONATO</b>	p. 51
4.1	As estruturas cristalinas convergidas . . . . .	p. 51
4.2	As propriedades eletrônicas . . . . .	p. 52
4.2.1	Análise Populacional de Hirshfeld . . . . .	p. 52
4.2.2	Estrutura de banda e densidade de estados . . . . .	p. 56
4.2.3	Massas efetivas . . . . .	p. 62
4.3	As propriedades Ópticas . . . . .	p. 64
4.3.1	Função dielétrica . . . . .	p. 64
4.3.2	Absorção Óptica . . . . .	p. 67

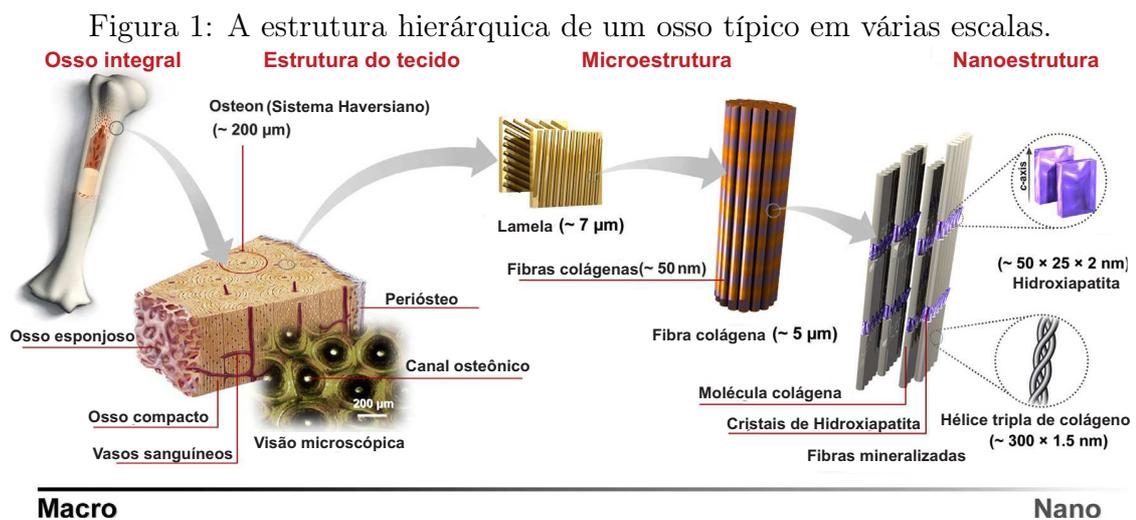
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	p. 68
<b>Apêndice A – Tecido ósseo:constituição, estrutura e funções</b>	p. 71
A.1 Estrutura e composição do Tecido Ósseo . . . . .	p. 72
A.1.1 Matriz óssea . . . . .	p. 73
A.1.2 Células presentes nos ossos . . . . .	p. 74
A.2 Processo de modelagem e remodelagem do tecido ósseo . . . . .	p. 75
A.3 Disfunções ósseas . . . . .	p. 77
A.3.1 Osteoporose . . . . .	p. 78
A.3.2 Doença de Paget . . . . .	p. 80
A.3.3 Raquitismo . . . . .	p. 80
<b>Apêndice B – Bifosfonatos</b>	p. 81
B.1 Propriedades químicas dos bifosfonatos . . . . .	p. 82
B.2 Classificação dos bifosfonatos . . . . .	p. 82
B.3 Adsorção dos bifosfonatos sobre a hidroxiapatita . . . . .	p. 83
B.3.1 Geometria espacial dos bifosfonatos . . . . .	p. 83
B.3.2 Potencial Zeta . . . . .	p. 84
B.4 Mecanismo de ação . . . . .	p. 84
B.4.1 Mecanismo de ação de bifosfonatos não nitrogenados . . . . .	p. 85
B.4.2 Mecanismo de ação de bifosfonatos nitrogenados . . . . .	p. 85
<b>Apêndice C – Fundamentos Teóricos</b>	p. 89
C.1 Mecânica Quântica . . . . .	p. 89
C.2 O Hamiltoniano Eletrônico . . . . .	p. 89
C.3 Aproximação de Born-Oppenheimer . . . . .	p. 91
C.4 Orbitais e Determinante de Slater . . . . .	p. 94
C.4.1 Orbitais espaciais e orbitais de spin . . . . .	p. 94

## *Sumário*

C.4.2	Produto Hartree . . . . .	p. 96
C.4.3	Determinante de Slater . . . . .	p. 97
C.5	Teoria do Funcional Densidade . . . . .	p. 98
C.5.1	Densidade Eletrônica . . . . .	p. 98
C.5.2	Teoremas de Hohenberg-Kohn . . . . .	p. 98
C.5.3	A pesquisa restrita de Levy e Lieb . . . . .	p. 101
C.5.4	A Formulação de Khon-Sham . . . . .	p. 102
 <b>Apêndice D – Artigo com Resultados da Dissertação</b>		 p. 105
 <b>Apêndice E – Tabelas complementares</b>		 p. 113
 <b>Referências</b>		 p. 115

# 1 Introdução

Os sais de fosfato de cálcio são os maiores constituintes minerais dos ossos em vertebrados. Como mostrado na figura 1, que representa o osso em diferentes escalas, desde macro a nano, o osso pode ser considerado um composto anisotrópico natural, consistindo em biominerais mergulhados numa matriz proteica, outros materiais orgânicos e água [1]. A fase biomineral, constituída por um ou mais tipos de fosfatos de cálcio, compreende de 65-70% do osso, a água entre 5 e 8% e o restante a fase orgânica formada praticamente por fibras colágenas. O colágeno, responsável pela resistência elástica do osso, serve como matriz para a deposição e crescimento de minerais [2]. Dentre os sais de cálcio, a hidroxiapatita HAP,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , como é, termodinamicamente, a fase cristalina mais estável dos sais de fosfatos de cálcio, é dotada de uma grande similaridade à parte mineral do osso.



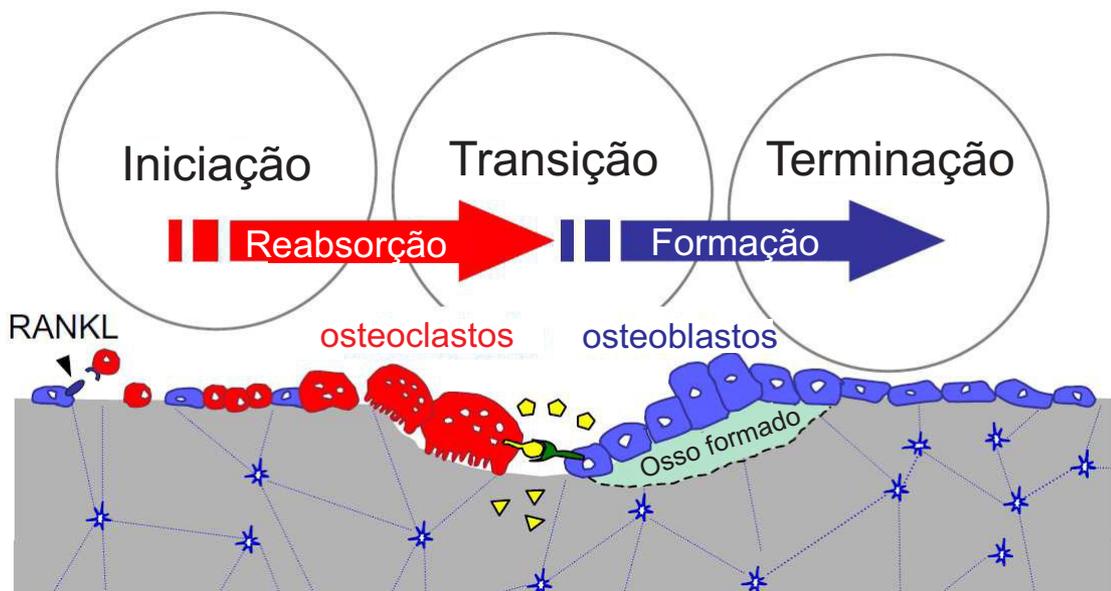
Fonte: Adaptada de [1].

O estudo microscópico do tecido ósseo distingue a substância óssea compacta e a

substância óssea esponjosa, representado na figura 1. Os vasos sanguíneos são responsáveis por nutrir as células ósseas com nutrientes e oxigênio. Dentre as células presentes no tecido ósseo, destacam-se: os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz; os osteoclastos, células multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo; e os osteócitos, o tipo de célula mais abundante no osso, cuja apoptose marca o início do ciclo da remodelagem óssea, processo pelo qual o osso é renovado [3, 4].

O osso passa por um processo de modelagem, construção do tecido ósseo sem ter ocorrido reabsorção, e remodelagem, na qual o osso é primeiro reabsorvido por osteoclastos e então formado na mesma localização por osteoblastos. A modelagem e remodelagem são os processos responsáveis por fornecer força para o suporte de cargas e leveza para a locomoção, pois há uma distribuição de massa óssea onde é necessário, assim como a remoção de onde não é necessário, tendo como consequência a modificação do tamanho e forma do osso [5]. Esse mecanismo pode ser visto simplificado na figura 2 e em mais detalhes no Apêndice A, Tecido ósseo: constituição, estrutura e funções

Figura 2: Mecanismo simplificado do processo de remodelagem óssea. O ligante osteoclastogênico, RANKL, ativa os precursores de osteoclastos. Há uma fase de transição marcada pela comutação entre a reabsorção e formação de osso, incluindo a participação de alguns fatores (pentágonos e triângulos amarelos), moléculas de membrana.



Fonte: Adaptada de [5].

Devido a inúmeros fatores, tais como idade, o ato de fumar, alcoolismo, dentre outros, a taxa de reabsorção torna-se maior que a taxa de formação óssea. Em consequência algumas doenças ósseas se manifestam, destacando-se a osteoporose, que afeta, aproxima-

damente, quarenta e quatro milhões de homens e mulheres a partir de 50 anos de idade nos Estados Unidos, enquanto no Brasil mais de dez milhões de pessoas, e há evidências que esse número tende a aumentar, acompanhando o aumento da expectativa de vida. Estatísticas similares são observadas na Europa, Ásia e Austrália. Essa síndrome é caracterizada por aumento na fragilidade óssea e fraturas. As fraturas osteoporóticas causam uma significativa morbidez e em muitos indivíduos levam à perda de produtividade e redução na qualidade de vida. A taxa de mortalidade nos primeiros anos após uma fratura no quadril é de 20-30% e mais da metade dos indivíduos que sobrevivem a uma fratura desse tipo são incapazes de retornar ao seu estilo de vida como antes. Os custos com tratamentos para a osteoporose são estimados em cerca de 17 a 20 bilhões de dólares anuais [6, 7].

Figura 3: (a) Postura de uma pessoa com osteoporose. (b) Radiografia de uma fratura na bacia e a comparação entre um osso normal e com osteoporose.



Fonte: criada pelo autor.

A osteoporose é considerada uma doença silenciosa, pois possui um longo período de latência até o aparecimento clínico da doença, e durante esse tempo há profundas alterações na remodelagem óssea, processo que controla o balanço de cálcio no organismo. Desequilíbrios na remodelagem óssea, muitas vezes devidos à remodelação óssea acelerada, são causados por aumento da reabsorção óssea ou formação óssea reduzida relativa à reabsorção. O resultado final é uma perda líquida de massa óssea e as alterações quali-

tativas na arquitetura esquelética e ambas aumentam significativamente o risco de fratura de um indivíduo [7]. Uma comparação entre um osso normal e um osso osteoporótico, com redução de sua massa óssea, pode ser vista na figura 3

A prevenção de osteoporose envolve, principalmente, a adoção de um estilo de vida mais saudável que consiste na prática de exercícios físicos e uma alimentação rica em vitamina D e cálcio. Até recentemente, as opções de tratamento para a osteoporose eram limitadas a agentes que impediram a perda óssea e parcialmente reduziram o risco de fraturas suprimindo a reabsorção óssea, assim recalibrando a unidade de remodelagem óssea para um novo estado estável que diminui a reabsorção, mantendo a densidade mineral óssea [7, 8].

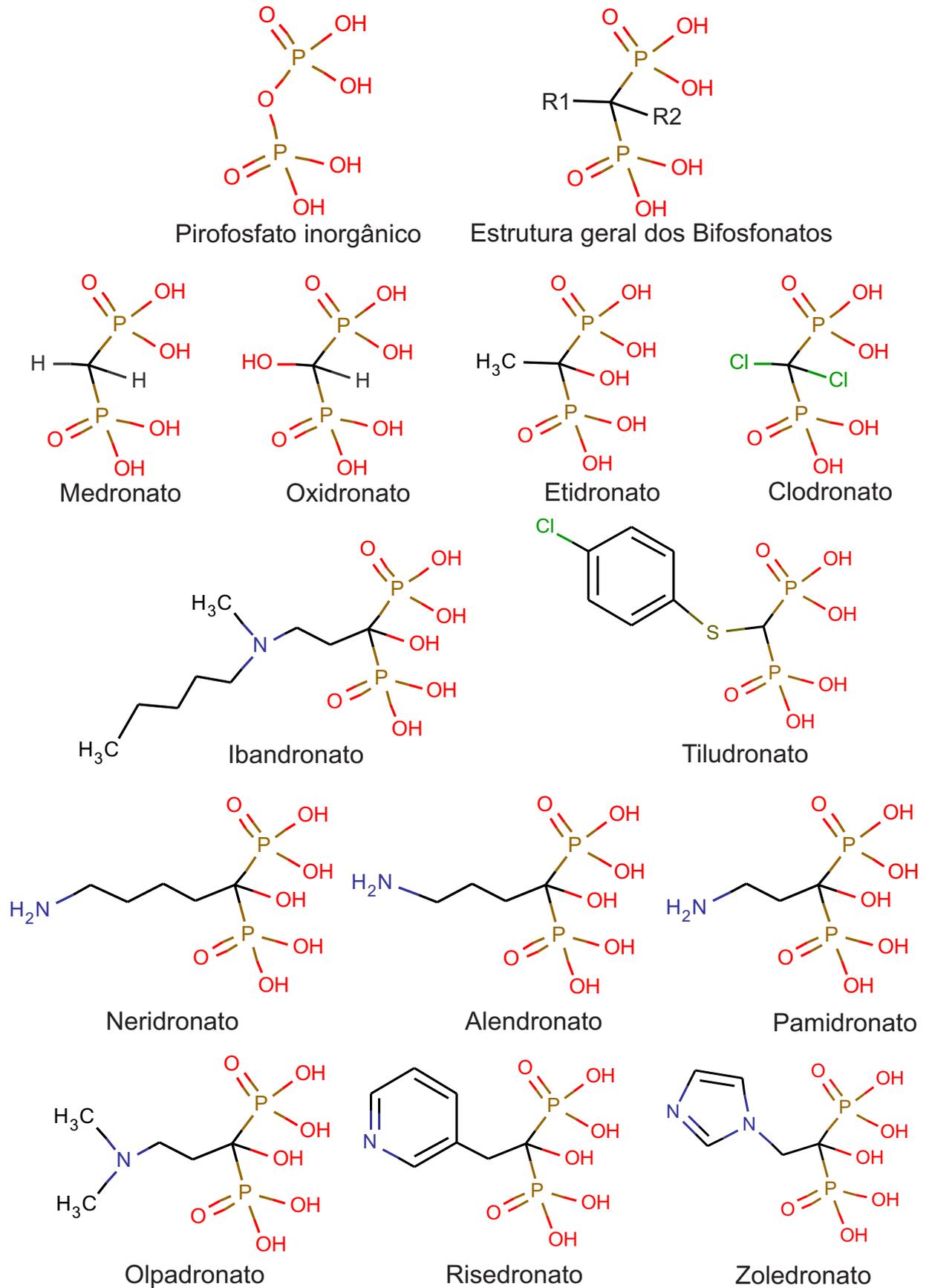
Novos agentes farmacológicos, como os bifosfonatos (BPs), que atuam na formação óssea, oferecem possibilidades para a construção de um tratamento com maiores sucessos. Esse otimismo é devido, em parte, a uma maior compreensão dos acontecimentos a nível celular e molecular que ocorrem durante a aquisição do pico de massa óssea na adolescência e remodelação óssea em adultos. Portanto, torna-se fundamental, uma abordagem a nível molecular, visando o melhoramento de fármacos utilizados no tratamento de osteoporose [7].

Os BPs são atualmente a classe de medicamentos mais utilizados para a prevenção e tratamento da osteoporose, devido aos seus efeitos potentes na inibição da reabsorção óssea, a facilidade de frequência de administração e a falta de efeitos não-esqueléticos graves a longo prazo [9–11].

Os BPs, representados na figura 4, são análogos estáveis dos pirofosfatos inorgânicos. Essa estabilidade é conferida pelo átomo de carbono que substitui o átomo de oxigênio nos pirofosfatos que liga os dois grupamentos fosfatos. Isto garante aos BPs resistência à degradação biológica [12]. Como resultado eles não são convertidos em metabólitos no organismo e são excretados inalterados [13]. Os principais BPs utilizados no tratamento de osteoporose são: alendronato, risedronato, etidronato, ibandronato e o desenvolvido mais recentemente, zoledronato [8]. Todas essas drogas são potentes inibidores da reabsorção óssea e reduzem o risco de fraturas vertebrais por 40-70% e fraturas de quadril por 40-50%. No geral, fraturas não-vertebrais (isto é, fraturas, que não incluam coluna ou quadril) são suprimidas por apenas 20-40% com alendronato, risedronato ou zoledronato, não havendo eficácia no uso de ibandronato para esses tipos de fraturas.

Na escolha do bifosfonato que será utilizado no tratamento de osteoporose, além de sua eficácia, é importante também considerar o valor gasto no tratamento. Uma dose anual de zoledronato, bifosfonato mais potente, é muito mais caro do que o alendronato

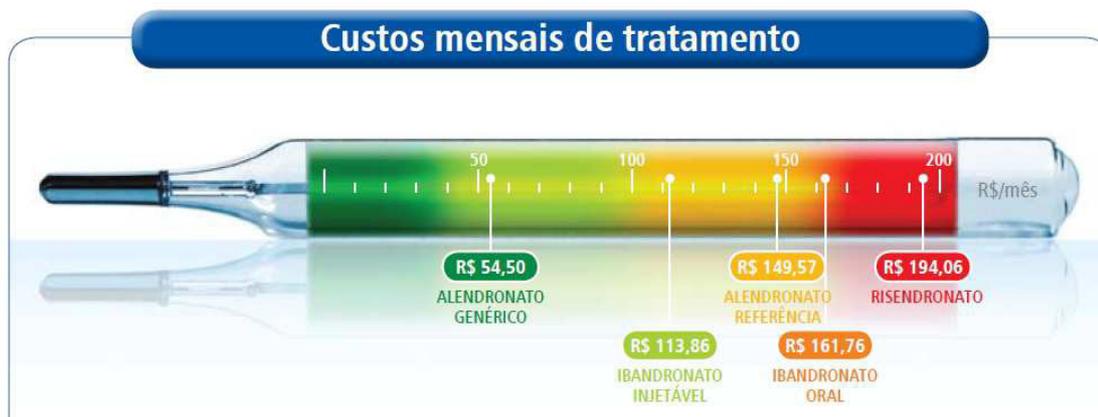
Figura 4: Desenho das moléculas de pirofosfato, e bifosfonatos que tem sido usados no tratamento da osteoporose (adaptada de [14]).



Fonte: criada pelo autor.

genérico, enquanto que o risedronato e ibandronato possuem valores intermediários [7]. Na figura 5 estão representados os valores gastos mensalmente no tratamento a base de alendronato, ibandronato e risedronato. O alendronato genérico tem o menor custo, R\$ 54,50 por mês, enquanto o risedronato é mais caro, custando R\$ 194,06 mensais.

Figura 5: Custos mensais de alguns BPss que tem sido usados no tratamento da osteoporose.



Fonte: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

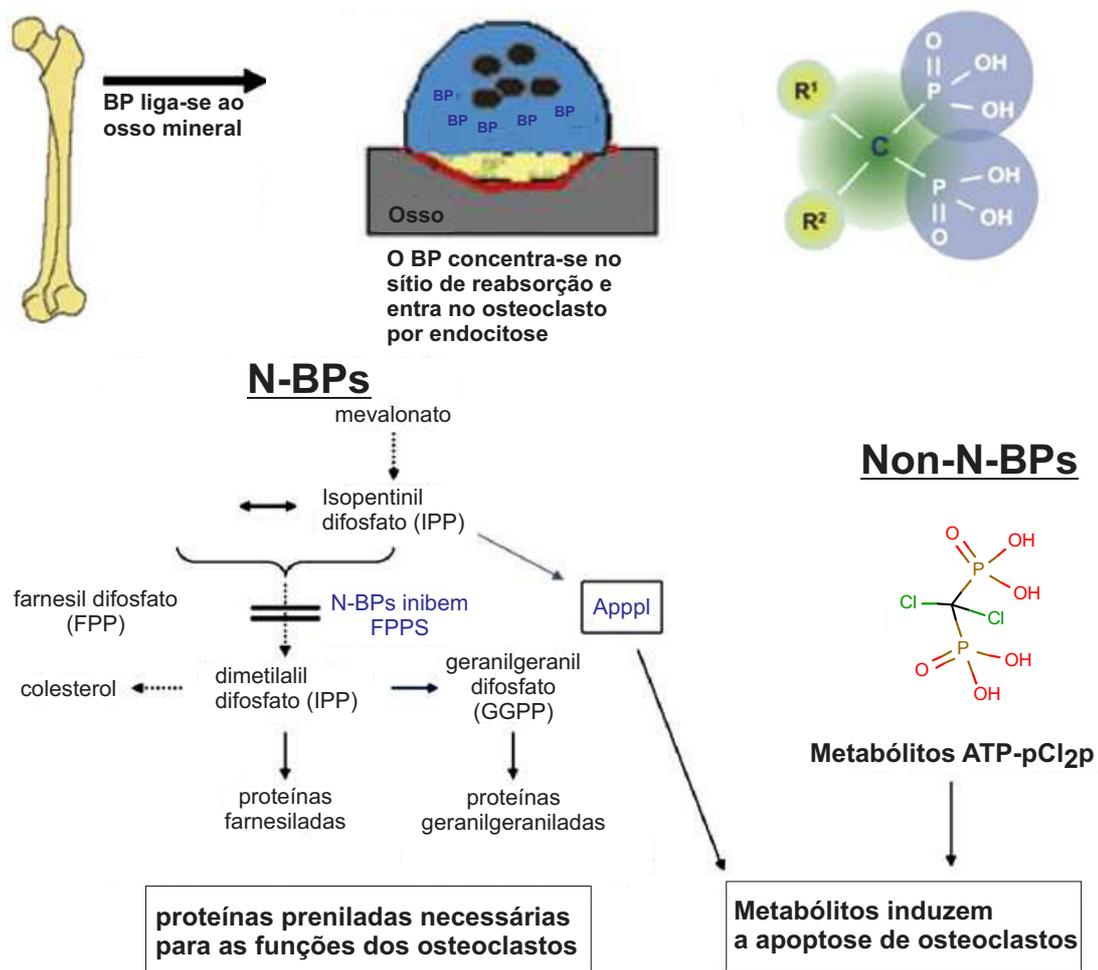
As cadeias laterais  $R_1$  e  $R_2$ , que caracterizam estruturalmente cada um dos diferentes tipos de BPs, são as responsáveis pelas propriedades químicas, tais como a quimissorção sobre a HAP e o poder de inibição sobre a reabsorção óssea. Vários experimentos com variações em ambas as cadeias foram realizados revelando essa influência. Em geral uma boa correlação entre, a estrutura-atividade e a potência de inibição da osteoporose, foi observada em vitro e em vivo. [14]

Os BPs podem ser classificados quanto a presença de nitrogênio na sua estrutura em não-nitrogenados (Non-N-BPs) e nitrogenados (N-BPs). Dependendo do tipo de bifosfonato, o mecanismo de ação, representado simplificada na figura 6, será diferente para a inibição da reabsorção óssea em osteoclastos. O mecanismo de Non-N-BPs consiste na produção de metabólitos que em excesso são tóxicos para os osteoclastos. Por serem muito semelhantes aos pirofosfatos, eles são tratados como análogos daqueles e são metabolicamente incorporados em análogos não hidrolisáveis de ATP. Os metabólitos resultantes contendo a porção P-C-P, no lugar dos grupos  $\beta$ ,  $\gamma$ -fosfatos do ATP acumulam-se no meio intracelular dos osteoclastos inibindo suas funções e consequentemente, causando a morte da célula. [15]

Os N-BPs, por sua vez, interferem numa via metabólica específica, o caminho biossintético do mevalonato, também representado na figura 6, que leva à síntese de colesterol e

outros esteroides, além da prenilação de proteínas, processo importante para as funções e sobrevivência dos osteoclastos. As enzimas neste caminho metabolizam lipídeos isoprenoídes contendo pirofosfatos, que são progressivamente condensados em cadeias mais longas. Os N-BPs são capazes de inibir várias enzimas participantes dessas reações, mas o maior alvo para a antireabsorção por N-BPs é a Farnesil Pirofosfato Sintase (FPPS) [14]. Dessa forma, o caminho sendo interrompido pela inibição da FPPS, as proteínas não passam pelo processo de prenilação e, conseqüentemente, ocorre apoptose dos osteoclastos.

Figura 6: Mecanismo de ação simplificado dos Non-N-BPs e N-BPs sobre a inibição de osteoclastos.



Fonte: adaptada de [15].

Estudos experimentais, têm sido realizados visando o entendimento dos fatores que influenciam no poder de ação dos BPs. Dunford *et al* [16] analisaram a relação da estruturalidade de vários BPs (Clodronato, etidronato, alendronato, risedronato, pamidronato, ibandronato, incadronato, zoledronato e minodronato) sobre a FPPS in vitro, chegando

à seguinte ordem decrescente de atividade: Zoledronato, minodronato, risedronato, incadronato, ibandronato, alendronato, pamidronato, etidronato e clodronato. Com esse resultado verificou-se que pequenas mudanças na estrutura das cadeias laterais altera a potência de antireabsorção afetando a habilidade de inibir a FPPS.

Além de estudos experimentais, estudos computacionais também têm sido feitos com os BPs. Nancollas *et al.* por exemplo realizou um estudo [13] comparando a afinidade de ligação de seis BPs sobre a HAP, obtendo a seguinte ordem decrescente de afinidade: zoledronato, alendronato, ibandronato, risedronato, etidronato e clodronato. A ligação de BPs à parte mineral óssea é a base para a captação seletiva desses compostos pelo osso. O acúmulo dessas drogas sobre o osso também pode influenciar o comportamento do cristal de forma que contribua em sua ação farmacológica.

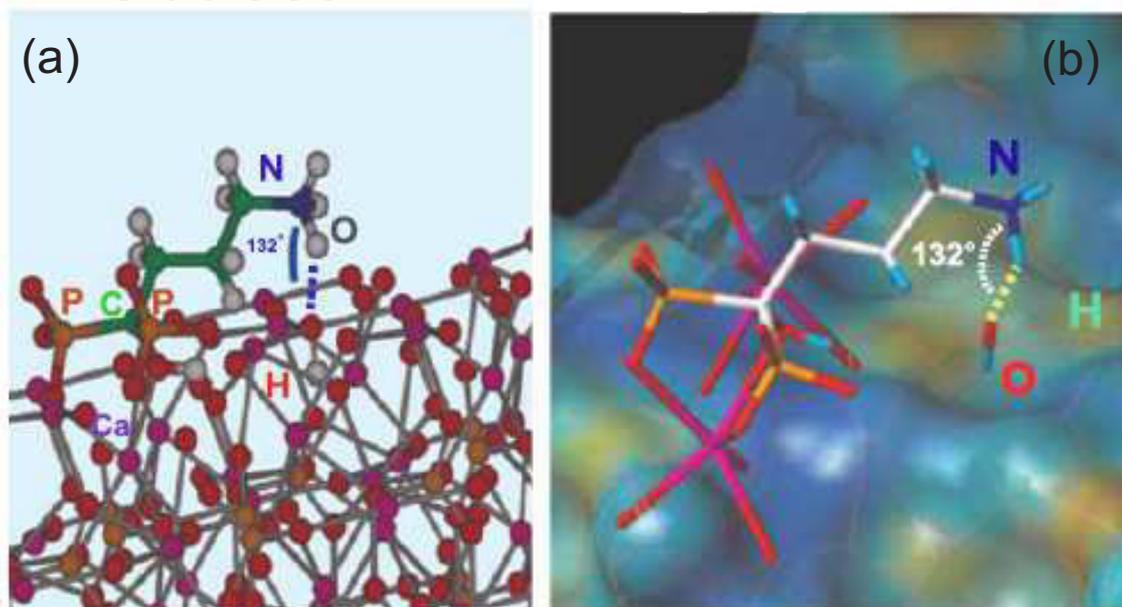
Esses estudos, experimentais e teóricos, sugerem uma relação com a geometria e a forma em que ocorre a interação com a HAP. O alendronato, por exemplo, é usado em doses clínicas similares ao risedronato, mesmo tendo uma potência de inibição *in vitro* menor, porém, é compensado pela maior afinidade com a HAP. Outros fatores, tais como potencial zeta e ligações de hidrogênio também se mostram determinantes no poder de inibição [17] como pode ser visto na Fig.7 na qual temos a influência da ligação N-H-O e o ângulo de 132° sob o qual ocorre a formação da ligação de hidrogênio.

Alguns estudos a nível molecular já foram feitos no intuito de entender as interações dos N-BPs no sítio da enzima FPPS. Ohno *et al.* utilizou estruturas cristalográficas de alguns BPs presentes num banco de dados de proteínas (PDB) para analisar os aminoácidos formadores do sítio que estabelecem a maior interação com os BPs [18]

Além de estudos sobre a ação de BPS sobre os osteoclastos e adsorção sobre a HAP, os BPs também são alvos de outras aplicações. A funcionalização de nanopartículas de ouro com alendronato foi analisada como agente de contraste em Raios-X [19] e cinco novos complexos de metais com rizedronato apresentaram atividades antichagas [20].

Embora os BPs sejam agentes extremamente úteis para a redução do risco de fraturas, algumas preocupações surgem relacionadas ao seu uso a longo prazo. Osteonecrose da mandíbula, uma condição dolorosa com o osso exposto na cavidade oral, tem recebido, a maior atenção. O risco desta complicação parece ser maior em pacientes com câncer que recebem altas doses mensais de zoledronato ou pamidronato. Um tipo específico de fratura femoral (subtrocanteriana) tem sido relacionado ao uso de BPs [7]. Portanto, mesmo que já tenham havido muitos avanços no conhecimento sobre a ação de BPs, ainda tornam-se necessários estudos de forma a entender a causa dos efeitos colaterais para que estes possam ser suprimidos.

Figura 7: (a) Ligação N-H-O favorece a afinidade sobre a HAP. (b) Ângulo de  $132^\circ$  favorece a formação da ligação de hidrogênio 9 (adaptada de [17]).



Fonte: adaptada de [17].

A finalidade desta dissertação é estudar, usando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) as propriedades estruturais e vibracionais da molécula de alendronato e as propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas de três sistemas cristalinos constituídos por diferentes sais de alendronato: alendronato de sódio trihidratado (AST), alendronato de sódio anidro (ASA) e alendronato de cálcio anidro (ACA). A escolha do alendronato como material de pesquisa deve-se ao fato deste bifosfonato ter um alto poder inibitório, alta afinidade com a HAP e ser de baixo custo. A partir dos resultados obtidos é possível entendermos estruturalmente como as ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares influenciam nas conformações da molécula e das células unitárias dos cristais. E, com as propriedades vibracionais, pode-se caracterizar o espectro experimental, podendo ser utilizado em trabalhos futuros como auxílio à identificação de picos referentes à ligações P-O de grupos fosfatos.

No capítulo 2, são descritos detalhes computacionais e experimentais empregados na obtenção dos resultados. Inicialmente os parâmetros teóricos são descritos em detalhes juntamente com os parâmetros experimentais das células unitárias dos três cristais de alendronato. Os dados cristalográficos obtidos por raio-X constituem a estrutura inicial dos cristais empregados nas otimizações seguido do cálculo das propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas. Em seguida é feita a descrição dos parâmetros empregados para a

molécula de alendronato, incluindo a análise do estado de protonação. O capítulo é finalizado com detalhes sobre as medidas experimentais de IR, RAMAN e absorção óptica.

No terceiro capítulo os resultados obtidos para a molécula são expostos e discutidos. Os *scans* e otimizações foram feitas em fase gasosa e considerando a influência da água pelo modelo de solvatação implícita (PCM). Foram selecionadas seis estruturas em vácuo e duas em solução aquosa, além de um terceiro modelo cuja construção foi baseada no ambiente químico que o alendronato encontra-se no cristal de alendronato de sódio trihidratado (CLA). Como resultado das otimizações a partir das estruturas provenientes do scan, encontraram-se quatro conformações estáveis em vácuo, VAC1 à VAC4 e duas em solução aquosa, PCM1 e PCM2, além da terceira estrutura otimizada, CLA, todas com energias relativas muito semelhantes. Discute-se também a interferência das ligações de hidrogênio presentes nas conformações obtidas em vácuo por análise NBO, além da influência do meio no estado de protonação. As conformações em fase gasosa perdem seu estado de protonação, enquanto em solução aquosa, esse estado é mantido. E por fim, fez-se a atribuição dos modos normais de vibração para os espectros teóricos, além de um estudo comparativo das propriedades espectroscópicas, IR e RAMAN, entre as conformações mais estáveis obtidas em vácuo e em solução aquosa, o CLA e os espectros obtidos experimentalmente para o alendronato de sódio trihidratado.

No capítulo quatro são apresentados resultados teóricos das propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas dos cristais Alendronato de Sódio Trihidratado, Alendronato de Sódio Anidro e Alendronato de Cálcio Anidro. As estruturas das células unitárias obtidas via DFT com o funcional GGA+Ts são apresentadas e comparadas com os valores experimentais. As cargas de Hirshfeld foram analisadas e verificou-se que o alendronato nos três cristais encontra-se no estado zwitterionic. A partir do cálculo de estrutura de banda, foi obtido um GAP com valores muito próximos para os três cristais, porém, com densidade de estados bem característica para cada cristal. São apresentadas as massas efetivas, função dielétrica e absorções ópticas teóricas para todos os cristais.

O capítulo cinco encerra esta dissertação apresentando as conclusões relativas aos resultados obtidos, além de perspectivas para o desenvolvimento de futuras pesquisas relacionadas ao trabalho desenvolvido nesta dissertação.

O apêndice A, Tecido ósseo: constituição, estruturas e funções, fornece informações sobre os principais componentes do tecido ósseo, e como eles se estruturam e se organizam de forma que o osso seja capaz de realizar suas funções no organismo. O apêndice B, Bifosfonatos, consiste numa revisão sobre os BPs, principal classe de medicamentos no tratamento para osteoporose. Aqui, o leitor poderá encontrar detalhes sobre esse grupo

de compostos, tais como: um pouco do histórico do desenvolvimento dos BPs, as propriedades químicas, fatores importantes na quimissorção sobre a HAP e o mecanismo de ação de BPs não nitrogenados e nitrogenados. O apêndice C, Fundamentos Teóricos, traz uma breve abordagem dos métodos baseados em DFT. No apêndice D, está o artigo que será submetido baseado no trabalho desta dissertação. O apêndice E traz as tabelas complementares com resultados adicionais aos apresentados nos capítulos da dissertação.

---

## 2 Métodos e Simulações Computacionais

---

O estudo de moléculas em fase gasosa e considerando a solvatação implícita é de grande relevância para a obtenção das propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas. Porém, é de extrema importância também considerar o estado de protonação da molécula em função do pH antes do cálculo dessas propriedades. Os possíveis estados de protonação foram obtidos com o programa Marvin Sketch [21] e para as demais propriedades, as técnicas computacionais adotadas foram baseadas na abordagem da Teoria do Funcional da Densidade.

Para o estudo dos cristais de alendronato de sódio trihidratado, alendronato de sódio anidro e alendronato de cálcio anidro, foi utilizado como ponto de partida os resultados obtidos a partir do método de difração de raios-X [22–24] e foram realizados estudos computacionais no código CASTEP [25] considerando a aproximação generalizada do gradiente com correção da dispersão (GGA+Ts) [26].

### 2.1 Procedimentos para a molécula

#### 2.1.1 Estados de protonação

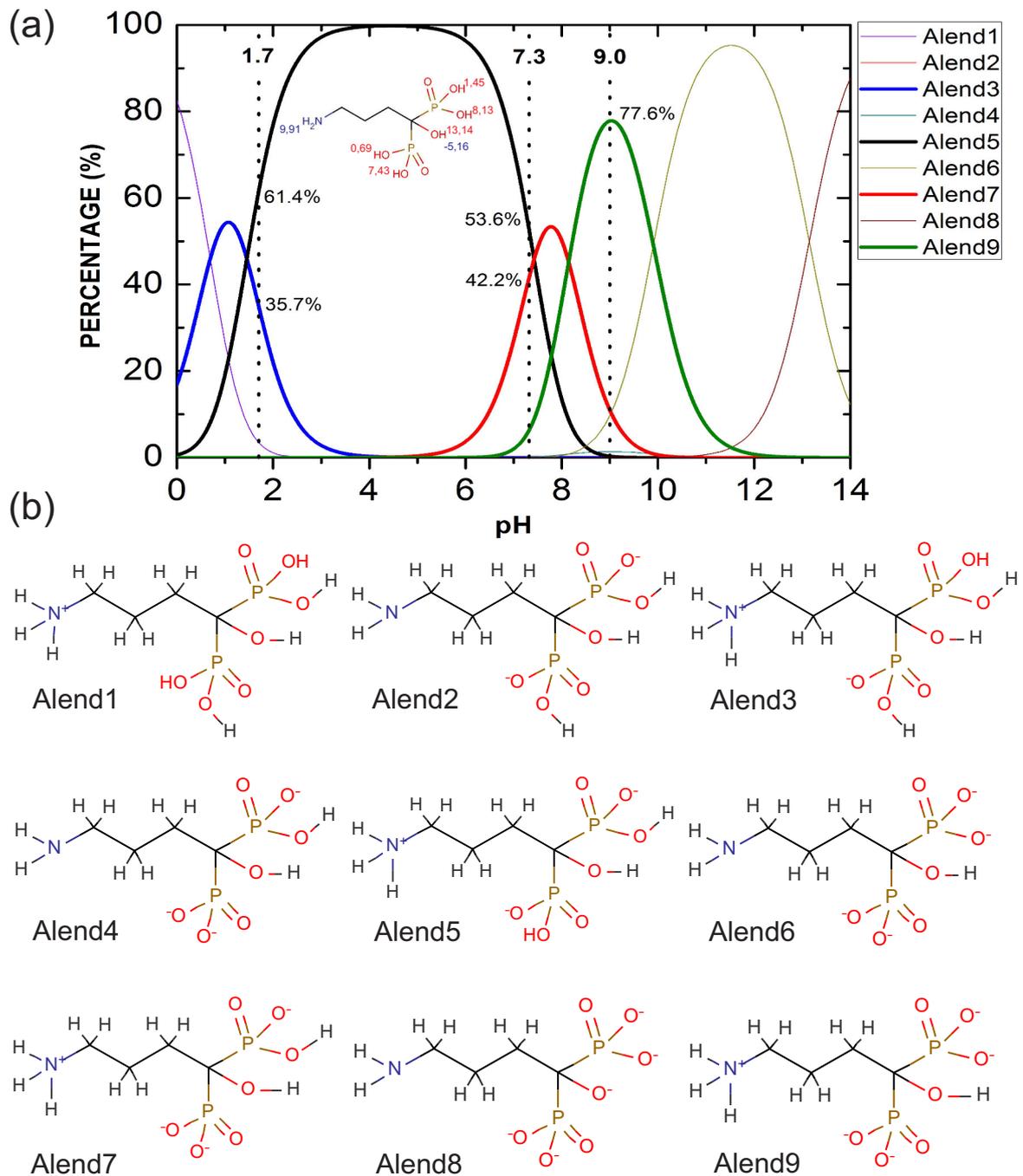
A molécula do ácido alendrônico,  $C_4O_7P_2NH_{13}$ , possui vários hidrogênios ionizáveis e isso implica na formação de várias estruturas moleculares com diferentes estados de protonação. Portanto, para podermos estudar as propriedades vibracionais e eletrônicas do alendronato, foi necessário fazer um estudo inicial dos possíveis estados de protonação em função do pH no qual se encontra o alendronato. Esse estudo foi feito por meio do programa Marvin Sketch [21], que analisa os valores de  $pK_a$  com base na fórmula estrutural da molécula. A estrutura 2D do ácido alendrônico foi usada como modelo inicial para

o cálculo dos valores de  $pK_a$ , que representam as constantes de ionização no equilíbrio entre a forma protonada e desprotonada. O modo utilizado foi o macro, pois a molécula é multiprótica, ou seja, possui vários hidrogênios ionizáveis. A variação de  $pK_a$  considerada foi de -10 a 20 e a faixa de pH de 0 a 14 na temperatura de 298,15 K. Não foi utilizado nenhum dado experimental para o cálculo e não verificou-se a ocorrência de tautômeros.

O alendronato é um medicamento ministrado oralmente e, portanto, sofre a influência de diferentes meios quanto ao pH, como por exemplo: o pH altamente ácido do estômago (em torno de 1,7) e o pH sanguíneo (em torno de 7,3). Logo é de extrema importância analisar os possíveis estados de protonação do ácido alendrônico antes que os cálculos via DFT sejam realizados. Os estados de protonação obtidos com o programa Marvin estão representados na figura 8. Ao todo, foram encontrados nove estados possíveis. Porém, apenas o estado 5 (Alend5) foi escolhido para uma análise de suas conformações bem como a influência destas nos espectros teóricos. Essa escolha foi baseada nos seguintes fatos: (a) o estado 5 abrange uma extensa faixa de pH (1,7 - 7,3), estando presente, portanto, em maior porcentagem, no pH do estômago e no pH sanguíneo, no pH 1,7 há 61,4% do estado 5 que chega a 100% na faixa de 3,4 a 5,5 e reduz-se à 53,6% no pH 7,3; e (b) o mesmo estado está presente nos cristais de alendronato obtido experimentalmente por dados de raio-X [22–24]. O estado 5 (estado zwitterionic) possui dois grupos fosfatos carregado negativamente e um grupo amina protonado carregado positivamente oposto aos grupos fosfatos.

Os valores de  $pK_a$  em vermelho e representados na figura 8 expressam a constante de ionização ácida entre o ácido neutro e sua base conjugada, os valores em azul, por sua vez, expressam a constante de ionização ácida entre a base neutra e seu ácido conjugado. Os dois menores valores de  $pK_a$  correspondem às duas ionizações com maiores valores de constante de ionização, ou seja, há uma maior taxa de ionização envolvendo esses dois hidrogênios. Enquanto o alto valor de  $pK_a$  em azul indica um alto caráter básico do grupamento amino e portanto a protonação desse grupo é favorecida. Logo, esses valores de  $pK_a$ , justificam o fato do estado 5 estar em maior porcentagem em uma maior faixa de pH, uma vez que, os demais valores de  $pK_a$  em vermelho são bem maiores e os valores em azul são muito menores, tanto que, apenas o  $pK_a$  azul da hidroxila ainda está dentro dos limites de  $pK_a$  considerado (-10 a 20).

Figura 8: (a) Curva da porcentagem versus pH para os nove estados de protonação com os respectivos valores de  $pK_a$ ; (b) nove estados de protonação para o ácido alendrônico.



Fonte: criada pelo autor.

### 2.1.2 Estudo dos confôrmeros

Após a determinação da estrutura do estado de protonação de interesse (estado mais provável em pH 7,2), a etapa seguinte consistiu, utilizando o programa gaussian 09 [27], na realização do Scan (varredura) naquela estrutura. Nessa etapa foram determinados dois diedros em torno dos grupos fosfatos, no qual ambos giram um em relação ao outro em 9 ângulos de 40 (graus) totalizando uma varredura de 360 °, gerando ao final oitenta e uma conformações. O scan foi realizado empregando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) [28], funcional m062x [29], o conjunto de base 6-311G e a adição de uma função difusa e as funções de polarização d e p [30]. As conformações cujas energias relativas foram menores ou igual à três foram usadas como geometrias iniciais na otimização, utilizando-se do mesmo método, funcional e conjunto de base. Todos os procedimentos de scan e otimizações foram feitos em fase gasosa e considerando o modelo contínuo de polarização (SCRF-PCM) [31], tendo como solvente a água. Além das estruturas provenientes do scan e otimizações, em vácuo e pcm, um terceiro modelo foi utilizado, apenas em pcm, para o cálculo do espectro teórico. Este modelo foi baseado em dados cristalográficos do alendronato de sódio trihidratado [22], ou seja, foram consideradas as condições do alendronato no cristal, estado de protonação com carga total -1, um íon sódio e três moléculas de águas explícitas. Todas as estruturas foram desenhadas no programa gaussview 5.09, visualizador do gaussian.

### 2.1.3 Cálculo das propriedades vibracionais

O cálculo dos modos vibracionais foi feito confirmando a otimização das estruturas obtidas pela ausência de frequências imaginárias. A interpretação dos espectros teóricos foi feita com o auxílio do programa VEDA4 [32]. Este programa faz uma análise da distribuição de energia potencial, evitando erros resultantes de uma análise apenas visual. A comparação entre frequências teóricas e experimentais foi realizada por meio da comparação visual, na qual atribuímos aos modos experimentais prováveis modos teóricos.

## 2.2 Procedimento para os cristais

Os cálculos foram feitos usando o código CASTEP [25] para minimizar a energia total da célula unitária. Os parâmetros de rede e posições atômicas dos três cristais de alendronato, medidos experimentalmente [22–24], foram utilizados para preparar a estrutura

inicial para os cálculos. Os compostos obtidos experimentalmente foram encontrados na forma zwitterionic, possuindo um grupo amina terminal protonado, portanto, carregado positivamente e os grupos fosfatos, oposto à amina, carregado negativamente e interagindo com o íon  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  [22–24]. O cristal AST e ASA foram encontrados como sendo monoclinico, com grupo espacial  $P2_1/n$  e o cristal ACA, também monoclinico, porém com grupo espacial  $C2/c$  cujos parâmetros de rede estão representados na tabela 1. Para fornecer uma melhor precisão dos dados experimentais, principalmente com relação as posições dos átomos de hidrogênio é necessário realizar uma otimização da geometria para avaliar tanto os parâmetros da célula unitária como as coordenadas atômicas.

Todas as otimizações foram realizadas em nível DFT usando o parâmetro Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) [33] para o *Generalized Gradient Approximation* (GGA) com uma correção de dispersão extra proposto por Tkatchenko e Scheffler [26]. O funcional PBE leva a resultados próximos aos obtidos usando o funcional Perdew-Wang, enquanto a correção de dispersão evita a necessidade de utilizar um método quântico de alto nível para descrever as interações de Van der Waals [34]. Foram adotados pseudopotenciais para substituir os elétrons das camadas mais internas. Uma amostragem de  $2 \times 2 \times 1$  Monkhorst-Pack foi empregada para avaliar as integrais no espaço recíproco. Tal grade Monkhorst-Pack é suficiente para fornecer uma boa estrutura eletrônica convergida.

Parâmetros de rede, ângulos e posições atômicas foram otimizadas a um mínimo global de energia para a célula unitária dos três cristais de alendronato. Para a otimização da geometria os seguintes critérios de convergência foram considerados ao longo de sucessivas etapas auto-consistentes: variação de energia total menor que  $0,5 \times 10^{-5}$  eV/átomo, força máxima por átomo inferior a  $0,01$  eV/Å, pressão menor que  $0,02$  GPa e o deslocamento atômico máximo inferior a  $0,5 \times 10^{-3}$  Å. O algoritmo minimizador Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) foi empregado para executar a otimização da célula unitária. Para cada etapa do campo auto-consistente, os parâmetros de minimização eletrônica foram uma energia total/tolerância de convergência atômica de  $0,5 \times 10^{-6}$ , uma auto-energia eletrônica de no máximo  $0,3051 \times 10^{-6}$  e uma janela de convergência de 3 ciclos. Um conjunto de bases foi adotado para representar os orbitais Kohn-Sham, com energia de corte escolhida após estudos de convergência, para ser  $830$  eV no funcional GGA+Ts.

Após a otimização da geometria, a análise populacional de Hirshfeld, a estrutura de banda, densidade de estados total e parcial por grupo e função dielétrica foram analisadas para os cristais otimizados em GGA+Ts, bem como a absorção óptica para uma amostra policristalina. Devido às limitações do código CASTEP, as propriedades ópticas foram calculadas usando somente pseudopotenciais norma-conservada com uma onda plana e

energia de corte de 830 eV.

Tabela 1: Dados Cristalográficos dos cristais: alendronato de sódio trihidratado (AST), alendronato de sódio anidro (ASA) e alendronato de cálcio anidro (ACA)

Fonte: criada pelo autor.

Cristal	AST	ASA	ACA
Simetria	monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo Espacial	$P2_1/n$	$P2_1/n$	$C2/c$
a (Å)	7,28	7,63	15,92
b (Å)	9,00	9,15	12,40
c (Å)	19,50	14,46	11,43
$\beta(^{\circ})$	100,61	112,6	123,5
Volume (Å <sup>3</sup> )	1255,4	931,4	1883,6

## 2.3 Procedimento Experimental

A amostra de Alendronato de sódio trihidratado foi adquirida em pó de Sigma-Aldrich. Todas as medidas de absorção foram realizadas com pastilha de KBr (100 mg), utilizando um espectrofotômetro FTLA 2000 da marca Bomem. Os espectros foram coletados com 120 varreduras com uma resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$ . O espectro FT RAMAN foi medido no espectrômetro RAMAN-IR VERTEX 70 (Bruker Optics), da marca Perkin Elmer, com o módulo RAM II FT-RAMAN equipado com uma fonte de laser DPSS Nd:YAG ( $\lambda = 1064\text{ nm}$ ). A resolução espectral foi de  $4\text{ cm}^{-1}$  e adquiridos com 512 varreduras em uma potência do laser de 500 nW. Os espectros de absorção no UV-VIS, na região de 200 a 800 nm, foram obtidos para as amostras utilizando um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 Diode Array.

---

## 3 Alendronato Molecular

---

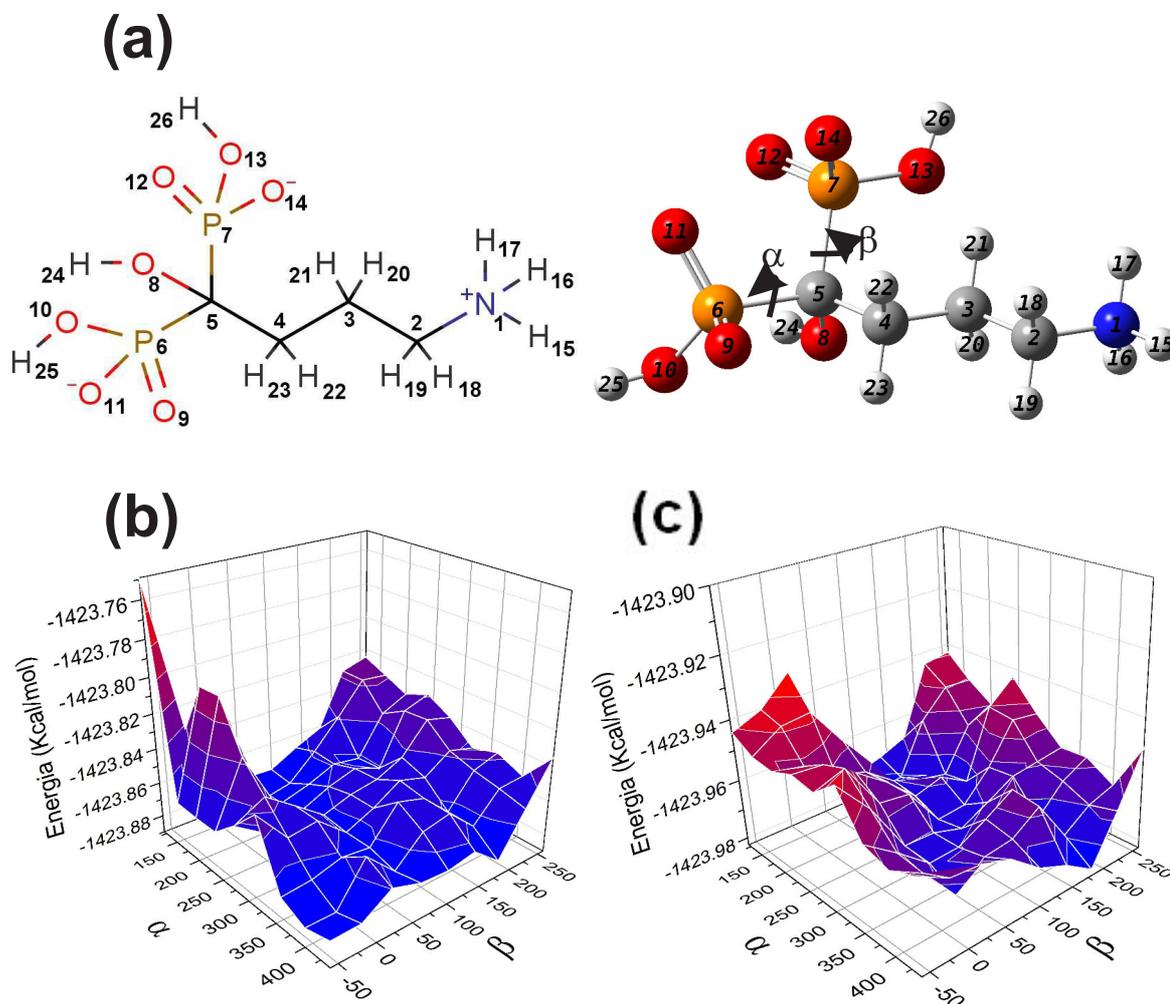
### 3.1 Conformações do alendronato molecular

A realização do Scan consiste em gerar uma Superfície de Energia Potencial (SEP) sendo esta, uma relação matemática entre a energia eletrônica da molécula e sua geometria. Portanto, induzindo modificações na geometria da molécula e calculando a energia de cada geometria resultante gera-se um conjunto de várias conformações no qual pode-se analisar a energia individual de cada conformação. No caso do Alend5 (carga total -1), a modificação induzida consistiu em dois ângulos diedros,  $\alpha$ (C4-C5-P6-O11) e  $\beta$ (C4-C5-P7-O14), mostrados na figura 9, nos quais os grupos fosfatos giram um em relação ao outro em 9 etapas de 40 graus, totalizando oitenta e uma estruturas que constituem a SEP em ambos os meios, vácuo e "pcm".

A importância em realizar o scan nesse trabalho deve-se, principalmente, à existência de múltiplas ligações de hidrogênio intramoleculares na molécula de alendronato. De fato, uma estrutura inicial que já possui ligações de hidrogênio formadas, pode não se modificar geometricamente, de modo a alcançar uma conformação de energia menor, pois, rapidamente, pode satisfazer os critérios de convergência estabelecidos. O scan permite que ocorra a rotação em torno de determinadas ligações e, desta forma, ligações de hidrogênio são rompidas e novas ligações de hidrogênio se formam numa nova conformação, mais estável ou não.

A partir das energias relativas das conformações que constituem a SEP obtida no vácuo, seis estruturas, representadas na figura 10 juntamente com suas respectivas energias relativas, foram selecionadas para serem otimizadas. É importante observar que todas essas estruturas perderam sua forma zwitterionic, pois um dos átomos de hidrogênio migra para um dos átomos de oxigênio, estabelecendo uma ligação química covalente e mantendo a carga total igual a -1, no entanto, não há mais separação de carga na molécula. Isso já é esperado, uma vez que, os cálculos estão sendo feitos em fase gás. Alguns estudos

Figura 9: (a) Representação planar do Alend5 e Ângulos diedros  $\alpha$  e  $\beta$ ; (b) Superfície de Energia Potencial gerada em vácuo; (c) Superfície de Energia Potencial gerada em PCM, considerando como solvente a água.

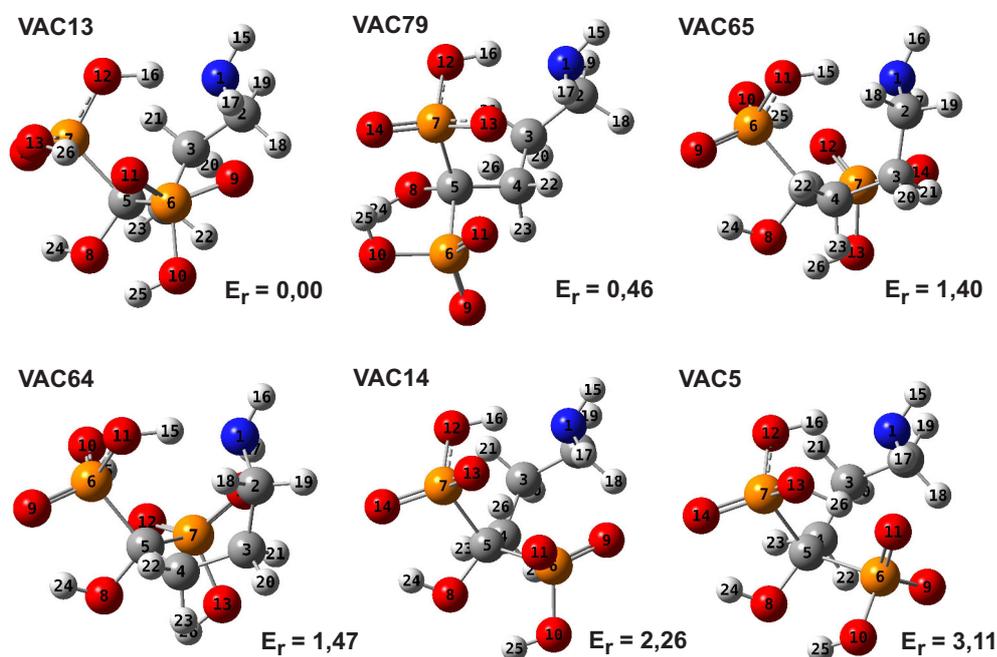


Fonte: criada pelo autor.

realizados em aminoácidos tentam encontrar o número mínimo de moléculas de água que constituirão a primeira camada de solvatação, de modo que o estado zwitterionic se mantenha nos resultados das otimizações [35–37]. Porém, esse não é o objetivo deste trabalho e esse problema é resolvido quando a molécula de alendronato é colocada num meio de solvatação implícita.

Como resultado da otimização, foram obtidas quatro estruturas resultantes, VAC1, VAC2, VAC3 e VAC4 representadas na figura 11, uma vez que, a VAC64 e VAC65 convergiram para a mesma estrutura, denominada agora de VAC1, assim como a VAC13 e VAC14 convergiram para a VAC2. A conformação VAC79 otimizada tornou-se VAC3 e

Figura 10: Estruturas resultantes do Scan, realizado em vácuo, selecionadas para serem otimizadas. Suas energias relativas são apresentadas em Kcal/mol.

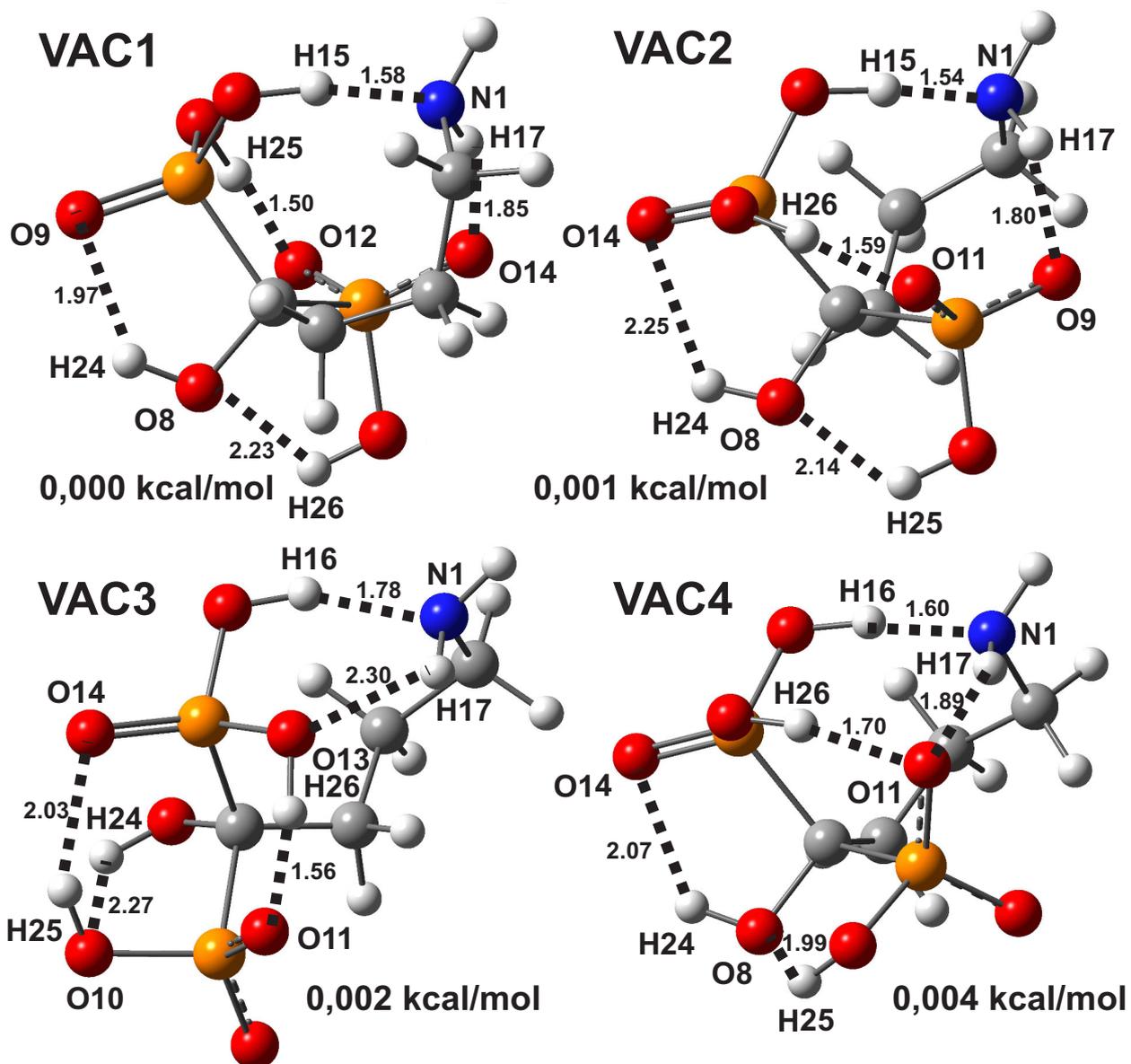


Fonte: criada pelo autor.

VAC5 converge para a conformação agora nomeada VAC4. Todas as conformações possuem cinco ligações de hidrogênio intramoleculares. Estas são mostradas na figura 11 juntamente com os átomos que realizam essas ligações e as energias relativas de cada conformação. As quatro estruturas são muito semelhantes em termos de energia. A mais energética tem apenas uma diferença de 0,004 Kcal/mol em relação a mais estável. Uma análise quantitativa mais detalhada das ligações de hidrogênio foi feita por análise NBO como pode ser observado na Tabela 2. As energias na tabela representam a estabilidade das ligações de hidrogênio que se estabelecem na molécula. As energias mais altas ocorrem nos confôrmeros VAC1 e VAC2, enquanto nos demais essa energia é menor. Porém nas conformações VAC3 e VAC4 as energias não seguem a ordem de estabilidade, mostrando que outros fatores, como a disposição da cadeia de carbonos, também influenciam a estabilidade dos confôrmeros.

No modelo de solvatação implícita, apenas duas estruturas das oitenta e uma resultantes do scan, foram selecionadas para otimização. Essas estruturas, PCM79 e PCM14, estão representadas na Figura 12. Após a otimização foram obtidas duas estruturas com energias muito próximas, uma delas 0,003 Kcal/mol menos estável. As estruturas se aproximam consideravelmente das conformações obtidas em vácuo. A PCM1, conformação

Figura 11: Estruturas do alendronato otimizadas no vácuo com suas respectivas energias relativas (em Kcal/mol). Em destaque os átomos que realizam ligação de hidrogênio e o comprimento de cada ligação.



Fonte: criada pelo autor.

mais estável proveniente da PCM79, apresenta cinco ligações de hidrogênio intramoleculares, enquanto a PCM2, conformação menos estável resultante da PCM14, apresenta quatro ligações. O estado zwitterionico se mantém em ambas as estruturas. As ligações de hidrogênio com seus respectivos comprimentos são mostrados na figura 13.

Tabela 2: Energias de estabilização das ligações de hidrogênio na molécula de alendronato obtidas por NBO.

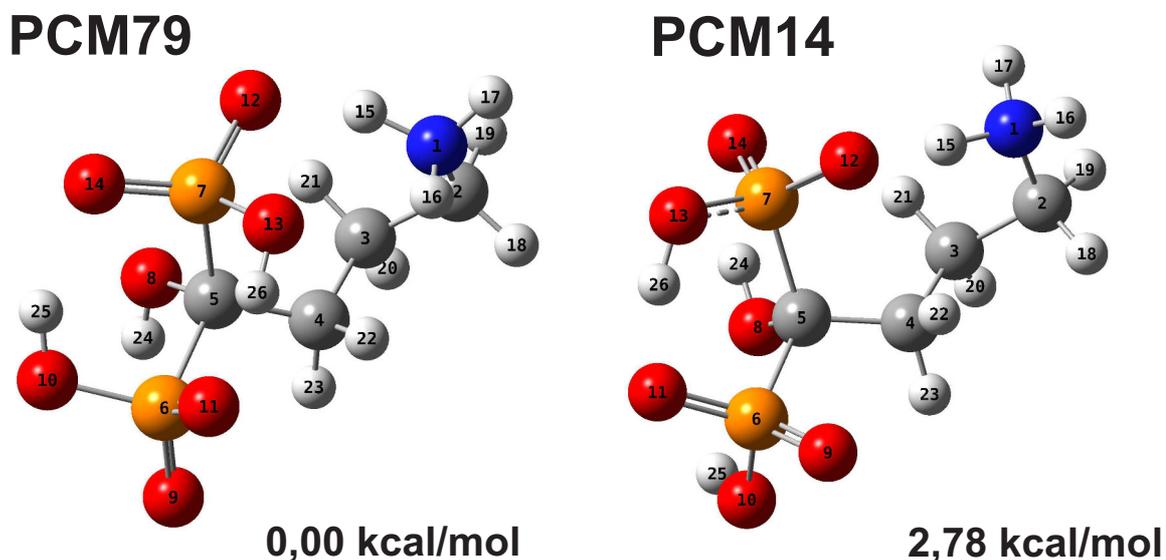
Confôrmeros	Ligação de H.	Comprimento(Å)	Energia(Kcal/mol)
VAC1	H15—N1	1,58	55,94
	H25—O12	1,50	50,47
	H17—O14	1,85	8,37
	H24—O9	1,97	6,22
	H26—O8	2,23	0,62
VAC2	H16—N1	1,54	67,51
	H17—O9	1,80	10,05
	H26—O11	1,59	31,44
	H24—O14	2,25	1,91
	H25—O8	2,14	1,05
VAC3	H26—O11	1,56	39,81
	H16—N1	1,78	26,83
	H24—O10	2,27	1,70
	H17—O13	2,30	1,38
	H25—O14	2,03	3,69
VAC4	H16—N1	1,60	55,27
	H26—O11	1,70	15,31
	H17—O11	1,89	3,68
	H25—O8	1,99	2,77
	H24—O14	2,07	1,03

Fonte: criada pelo autor.

## 3.2 Espectros IR e RAMAN dos sistemas moleculares

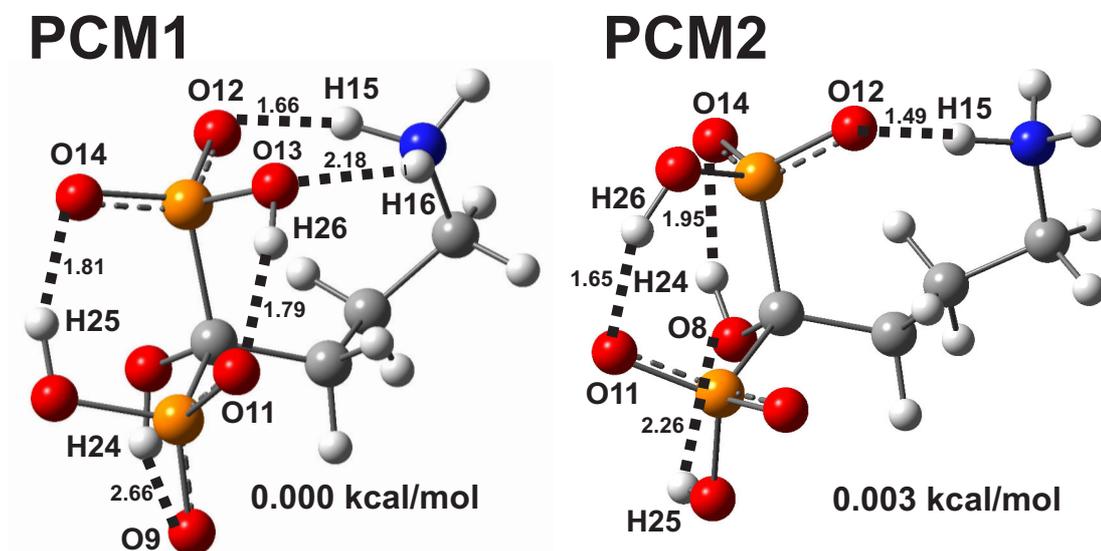
O modelo baseado nos dados cristalográficos do cristal de alendronato de sódio trihidratado foi otimizado e sua conformação resultante, CLA, está representada na figura 14. Todas as ligações de hidrogênio existentes na estrutura são intermoleculares. A cadeia de carbono se mantém mais aberta, colocando o nitrogênio, ao contrário das conformações anteriores, mais distante aos grupos fosfatos. O estado zwitterionico também se mantém

Figura 12: Estruturas resultantes do Scan, realizado em PCM, selecionadas para serem otimizadas.



Fonte: criada pelo autor.

Figura 13: Estruturas otimizadas em PCM com suas energias relativas em Kcal/mol.

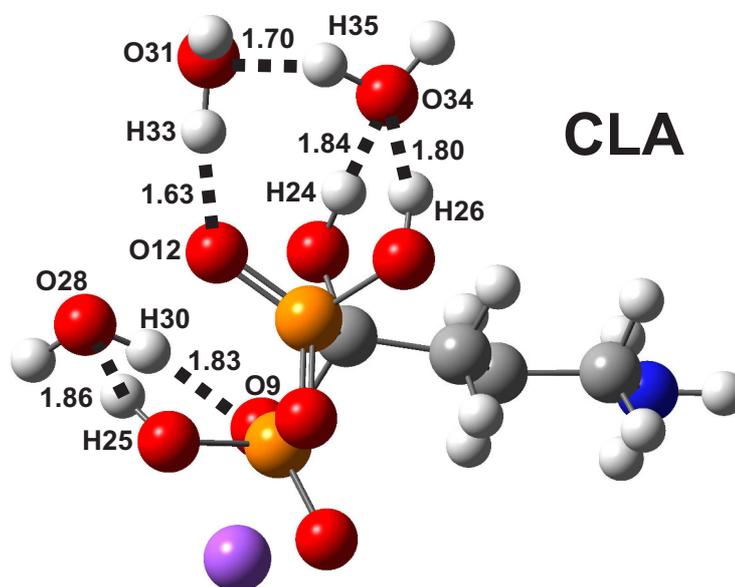


Fonte: criada pelo autor.

após a otimização.

Recentemente, revisões sobre assinalamentos em espectros infravermelho IR e Raman da qualidade do osso foram publicados [38]. Há um consenso de que a análise espectroscópica IR e RAMAN é uma ferramenta poderosa em determinar as propriedades materiais

Figura 14: Estrutura baseada nos dados cristalográficos do cristal de alendronato de sódio trihidratado.



Fonte: criada pelo autor.

importantes que contribuem para a força do osso e, portanto, é útil para um melhor entendimento das mudanças na fragilidade do osso. O IR de ossos possui bandas de grupos fosfatos pertencentes à hidroxiapatita na faixa de frequência  $960\text{-}1143\text{ cm}^{-1}$ , sendo bem característico um pico largo em torno de  $1056\text{ cm}^{-1}$ . O espectro RAMAN, por sua vez, possui picos equivalentes em  $450, 580\text{ e }950\text{ cm}^{-1}$ .

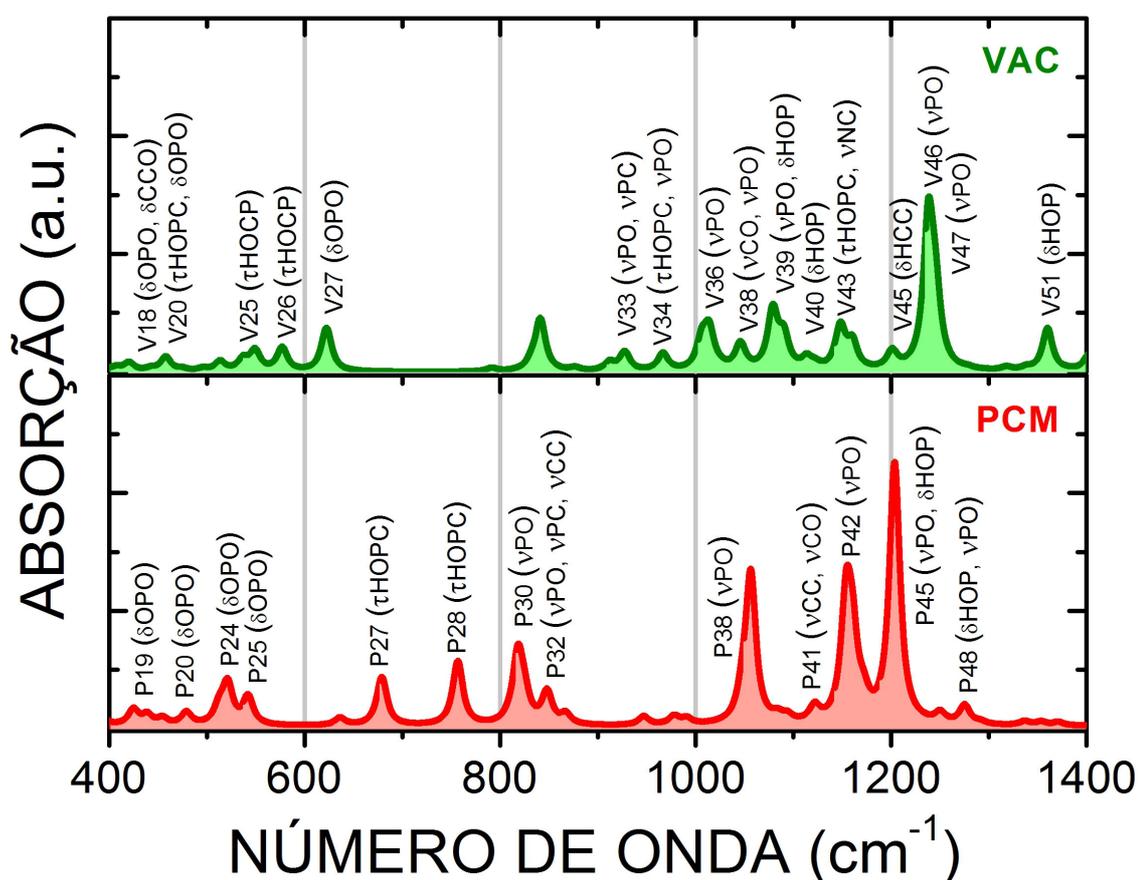
Como uma maior contribuição para a análise de bandas pertencentes a grupos fosfatos em paciente tratados com alendronato, algumas atribuições dos modos vibracionais, principalmente àquelas pertencentes a grupos fosfatos, foram realizadas por meio de espectros teóricos e experimentais. O espectros experimentais, IR e RAMAN, foram medidos a partir do cristal de alendronato de sódio trihidratado, enquanto os teóricos foram calculados a partir das estruturas otimizadas, em fase gasosa e em solução aquosa (PCM), mais estáveis. Portanto, foram obtidas, para comparação com os dados experimentais, três estruturas, citadas a seguir: VAC, correspondente a conformação mais estável no vácuo, PCM, a estrutura de menor energia considerando o meio por solvatação implícita, e CLA, modelo otimizado baseado no cristal.

Uma vez que, as medidas experimentais tenham sido feitas em cristal e os cálculos considerando apenas a molécula, em vácuo e pcm, a região abaixo de  $400\text{ cm}^{-1}$  e acima de  $1400\text{ cm}^{-1}$  não foi considerada, pois essas regiões sofrem fortes influências de forças

intermoleculares presentes no cristal. No apêndice E encontram-se a atribuição teórica completa das três estruturas selecionadas.

A maioria dos modos vibracionais na faixa de  $400\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  está relacionado ao grupamento fosfato, como mostrado na figura 15 (há também vários picos de absorção relacionados a grupos fosfatos de pequena intensidade abaixo de  $400\text{ cm}^{-1}$  não apresentados aqui). Os modos são representados por letras gregas como segue:  $\delta$ (scissoring),  $\nu$ (stretching),  $\tau$ (torsão),  $\rho$ (rocking),  $\phi$ (out),  $\gamma$ (wagging) e  $\psi$ (twist). Outros modos na faixa de  $400$  à  $1400\text{ cm}^{-1}$  (veja no apêndice E a tabela 3 para mais detalhes) não são relacionados a grupos fosfatos e são apenas visíveis nas medidas experimentais.

Figura 15: Espectros IR teóricos calculados em DFT da molécula de alendronato em vácuo e em PCM (solvente água).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente.



Fonte: criada pelo autor.

Uma comparação entre o espectro teórico infravermelho de uma única molécula de alendronato em vácuo e o espectro teórico da mesma molécula solvatada em água, usando o modelo de polarização contínua, para o mesmo modo normal de vibração revela várias

diferenças. Por exemplo, os modos V18-V27 na faixa 420-622  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser caracterizados por oscilações scissors e torções HOCP parecem estar compreendidos entre os modos P19-P25 entre 425 e 542  $\text{cm}^{-1}$ . Há dois modos, P27 e P28 (em 679 e 757  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, atribuídos à torções HOPC envolvendo o átomos de fósforo P6 e P7) que são ausentes no espectro VAC. O modo V30 em 841  $\text{cm}^{-1}$  está deslocado para o P30 em 818  $\text{cm}^{-1}$ . Os modos V33 e V34 em 928 e 967  $\text{cm}^{-1}$  envolvem, respectivamente, o stretching simétrico e assimétrico do grupo O10-P6-O11 e parece estar relacionado com o modo P32 em 848  $\text{cm}^{-1}$ , que, entretanto, está atribuído a um stretching assimétrico de C5-P6-O10. O modo V35 em 1014  $\text{cm}^{-1}$  é menos intenso do que o modo P38 em 1057  $\text{cm}^{-1}$ , e ele pode ser descrito como produzido pelo stretching de O10-P6-O11, enquanto o segundo origina-se principalmente do stretching simétrico de O12-P7-O14. Os dois picos de absorção no infravermelho mais intensos para o sistema alendronato em PCM ocorre para o P42 e P45, modos normais em 1154 e 1204  $\text{cm}^{-1}$ , sendo assinalado para stretching PO (e também stretchings CC ao longo da cadeia de carbono da molécula de alendronato para P42), enquanto para o vácuo o pico mais intenso é o V46 em 1238  $\text{cm}^{-1}$ , envolvendo o stretching da ligação covalente P6-O9. O modo V51 em 1360  $\text{cm}^{-1}$  pode ser relacionado ao modo normal P48 em 1275  $\text{cm}^{-1}$ , e é devido principalmente ao movimento de scissoring de H25-O10-P6. A solvatação em pcm desloca os modos IR dos grupos fosfatos para número de onda menores comprimindo os picos de absorção e, por conseguinte, a produção de bandas de absorção mais amplas.

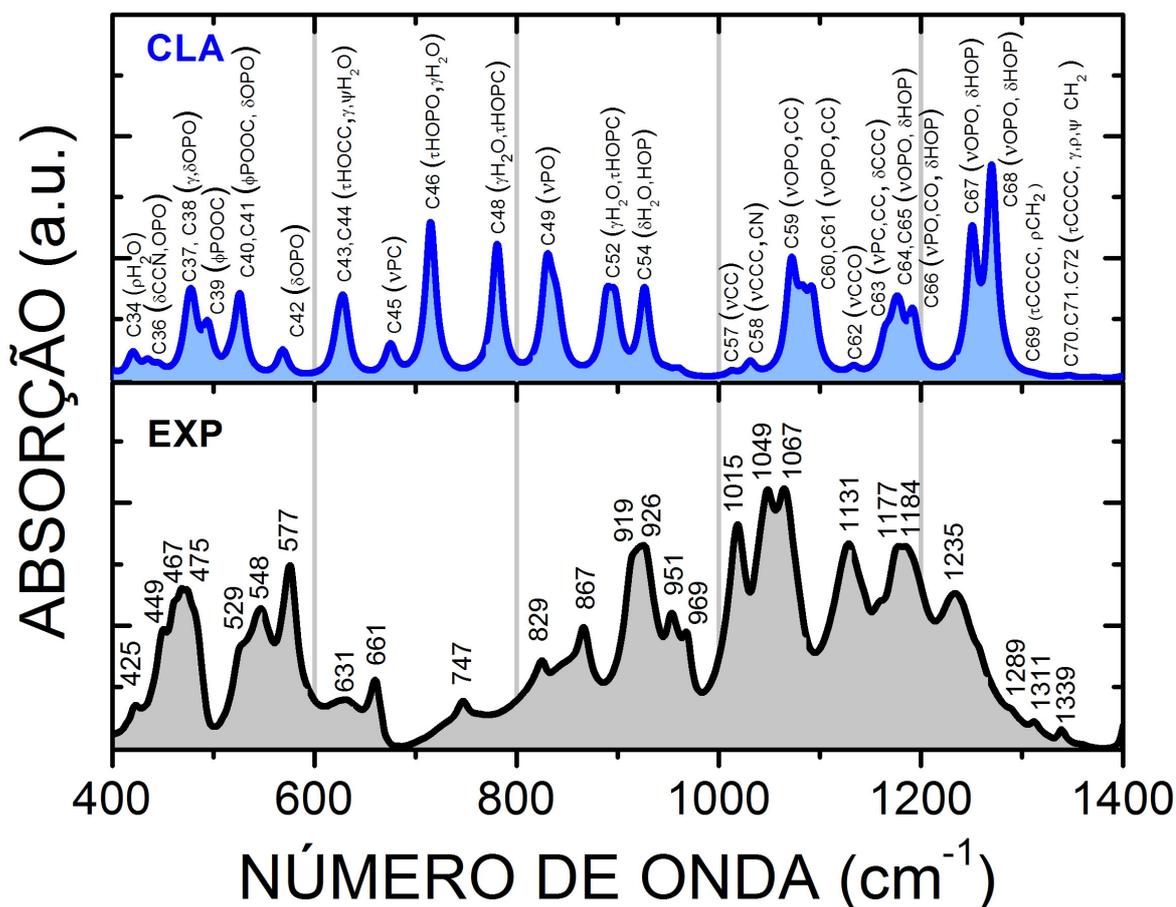
Uma comparação direta de resultados teóricos com dados experimentais para o alendronato de sódio trihidratado pode ser feita por meios dos cálculos para o sistema molecular constituído por uma molécula de alendronato, três moléculas de água e um íon sódio com posições similares às do cristal (CLA) e também considerando o modelo pcm. A figura 16 e Tabela 3 mostram a comparação entre os modos teóricos e experimentais. Alguns modos normais do CLA também são detalhados esquematicamente na figura 16. Inicialmente pode ser feita uma breve comparação mostrando as similaridades e diferenças entre o modelo pcm e o sistema CLA. Pode-se observar, por exemplo, que o modo P45 em 1204  $\text{cm}^{-1}$  é deslocado para um número de onda maior em 1251  $\text{cm}^{-1}$  (modo C68), enquanto entre os número de onda para os modos P27 e P28 observa-se a vibração C46 com uma contribuição proveniente de um modo normal wagging de moléculas de água. Os modos P30 e C49, por outro lado, assinalados para o stretching de ligações PO, diferem de apenas 12  $\text{cm}^{-1}$  (o modo C49 tem número de onda maior). Os modos C52, C53 e C54 possuem alta intensidade no modelo CLA, enquanto, no modelo pcm, a intensidade

Tabela 3: Assinalamentos dos modos IR e RAMAN mais importantes dos modos do espectro do cristal AST medido. Número de onda  $\omega$  está  $\text{cm}^{-1}$ .

N	$\omega_{CLA}$	$\omega_{EXP}$	Assinalamento
C33	397.014	404	$\delta O9P6O10, \delta O12P7O14$
C34	420.33	425	$\rho H32O31H33, \rho H35O34H36$
C36	445.513	449	$\delta N1C2C3, \delta O9P6O10, \delta O12P7O13$
C37	475.08	467	$\delta O9P6O11, \delta O13P7O14$
C38	479.404	475	$\gamma O9P6O10, \delta O12P7O14$
C39	494.454	491	$\phi P6O9O10C5, \phi P7O8O12C5$
C40	516.356	529	$\phi P6O11O10C5, \phi P7O8O14C5$
C41	526.06	539	$\phi P7O13O12O14, \delta O10P6O11$
C42	568.697	548	$\delta O9P6O11, \delta O13P7O14$
C43	623.495	577	$\tau H24O8C5C4, \gamma H35O34H36$
C44	629.126	631	$\tau H25O10P6C5, \psi H29O28H30$
C45	675.176	661	$\nu P6C5$
C46	714.97	–	$\tau H26O13P7O12, \gamma H32O31H33$
C48	780.779	747	$\gamma H29O28H30, \tau H25O10P6C5$
C49	830	–	$\nu P6O10, \nu P7O13$
C52	889.061	829	$\tau H26O13P7O12, \gamma H35O34H36$
C54	926.626	867	$\delta O12H33O31, \delta H33O12P7$
C55	948.84	–	$\nu_s N1C2C3$
C56	960.56	–	$\nu N1C2, \nu_s C3C4C5$
C57	1012.61	919	$\nu_s C2C3C4, \nu C4C5$
C58	1030.98	926	$\nu_s C4C5O8, \nu N1C2$
C59	1071.9	951	$\nu_s O9P6O11, \nu C4C3$
C61	1092.8	969	$\nu_s O12P7O14, \nu P6O11$
C62	1133.52	–	$\nu_a C4C5O8$
C63	1164.75	1015	$\nu P6C5, \nu C2C3, \delta C3C4C5$
C64	1174.26	1031	$\delta H26O13P7, \nu_a O12P7O14$
C64	1174.26	1049	$\delta H26O13P7, \nu_a O12P7O14$
C65	1178.98	1067	$\nu_a O9P6O10, \delta H25O10P6$
C66	1192.33	1131	$\nu P6O9, \nu P7O12, \nu C5O8, \delta H25O10P6, \delta H26O13P7$
C67	1250.71	1177	$\nu_a O12P7O14, \delta H26O13P7$
C67	1250.71	1184	$\nu_a O12P7O14, \delta H26O13P7$
C67	1250.71	1200	$\nu_a O12P7O14, \delta H26O13P7$
C68	1270.25	1235	$\nu_a O9P6O11, \delta H25O10P6$
C69	1285.41	1265	$\tau C2C3C4C5, \rho C2H_2, \rho C3H_2, \rho C4H_2$
C70	1312.63	1289	$\tau C2C3C4C5, \gamma C2H_2, \gamma C3H_2, \gamma C4H_2$
C71	1346.8	1311	$\rho C2H_2, \psi C3H_2, \psi C4H_2$
C72	1371.17	1339	$\tau C2C3C4C5, \psi C2H_2, \psi C3H_2, \psi C4H_2$
C73	1398.96	1363	$\nu_a C3C4C5, \gamma C2H_2, \gamma C3H_2, \gamma C4H_2$

Fonte: criada pelo autor.

Figura 16: Espectros IR medido do cristal alendroanto de sódio trihidratado (EXP); espectro IR calculado em DFT da molécula de alendronato interagindo com três moléculas de água e um íon sódio (CLA).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente.



Fonte: criada pelo autor.

dos modos correspondentes são muito baixas. O primeiro origina-se de um movimento de wagging de moléculas de água com os átomos de oxigênio O31 e O34. Modos normais de moléculas de água explícita também contribuem para o modo C34 ( $420\text{ cm}^{-1}$ , movimento de rocking), C43 ( $623\text{ cm}^{-1}$ , wagging), C44 ( $629\text{ cm}^{-1}$ , twisting), e C48 ( $781\text{ cm}^{-1}$ , wagging). Como o modelo teórico não reproduz exatamente a estrutura do cristal, nós não poderíamos sempre corresponder em um para um os modos calculados com os modos experimentais, como pode ser visto para os picos C64 e C67 na tabela 3, correspondendo aos número de onda experimentais  $1031, 1049, 1177, 1184$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

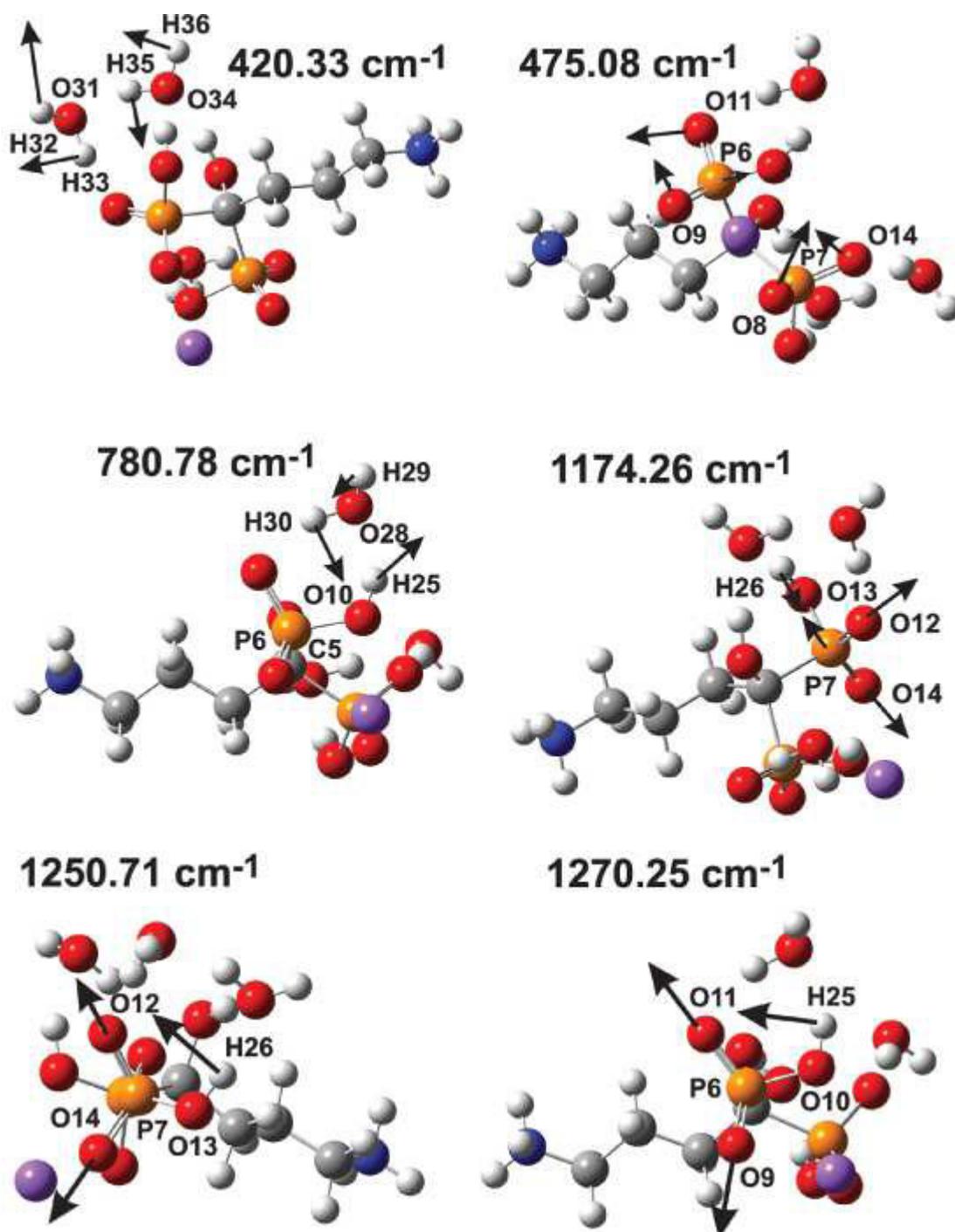
As bandas de absorção mais fortes no espectro experimental aparece em  $1015, 1049$  e  $1067\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser aproximadamente atribuído, respectivamente, ao modos C63,

C64 e C65 no espectro IR do CLA, nos quais estão envolvidos stretching CC, PC e PO. Os modos experimentais 919 e 926  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos aos modos C57 e C58, respectivamente, e correspondem a mudanças no comprimento das ligações CC e CN. O modo normal C59, por outro lado, é relacionado com o modo experimental 951  $\text{cm}^{-1}$  e consiste principalmente em um stretching simétrico das ligações O9-P6-O11 e C3-C4. Finalmente, os modos experimentais em 1131, 1177, 1184 e 1235  $\text{cm}^{-1}$  podem estar relacionados às vibrações C66, C67 e C68 no CLA, envolvendo stretching PO e scissoring HOP. Os modos C67 e C68 são mostrados na figura 17 para os números de onda 1250,71 e 1270,25  $\text{cm}^{-1}$ .

O modo experimental com menor comprimento de onda, em 425  $\text{cm}^{-1}$ , está relacionado ao modo normal 420,33  $\text{cm}^{-1}$  em CLA, e envolve o rocking de duas moléculas de água, como mostrado na figura 17. Os modos em 449, 467 e 475  $\text{cm}^{-1}$ , por outro lado, estão relacionados à C36, C37 e C38 envolvendo scissoring e movimentos out de grupos fosfatos. Os modos de absorção experimental entre 529 e 661  $\text{cm}^{-1}$  são assinalados entre os modos normais C40 e C45 (516 a 675  $\text{cm}^{-1}$  em CLA). Os modos C39, C40, C41, C42 e C45 envolve movimentos em grupos fosfatos, enquanto C43 tem contribuições de uma molécula de água e a torção de H24-O8-C5-C4. O pico experimental em 661  $\text{cm}^{-1}$  é correlacionado com o pico C45, enquanto o modo normal C46 não produz uma intensidade significativa no espectro.

Na figura 18, são apresentados os espectros teóricos Raman para os sistemas VAC e PCM, enquanto a figura 19 contém o espectro Raman do CLA e experimental e a figura 20 mostra alguns modos normais envolvidos em alguns modos de intensidade Raman relevantes. Novamente, pode-se fazer algumas comparações entre os espectros teóricos (VAC e PCM). A estrutura do alendronato em vácuo tem um conjunto de vinte picos notáveis, com o mais intenso sendo a vibração V39 em 1079  $\text{cm}^{-1}$ , que é melhor caracterizado como um stretching de O12-P7-O14 e um movimento de scissors de H26-O13-P7. Outros modos Raman são V32 e V30, em 912 e 841  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, ambos atribuídos à stretching de ligações PO. Para o modo V27 em 622  $\text{cm}^{-1}$  há uma combinação de scissors O-P7-O e em 1278  $\text{cm}^{-1}$  há a oscilação V47 com um stretching assimétrico das ligações O12-P7-O14 e P6-O9. Se compararmos esses modos com aqueles para o modelo PCM (que tem treze modos notáveis, como indicado na figura 17), observamos, em PCM, um modo muito intenso, P37, em 1048  $\text{cm}^{-1}$ , que envolve stretching das ligações P-O e C-C, relacionados ao pico V35 em 1006  $\text{cm}^{-1}$ . O modo P26 em 636  $\text{cm}^{-1}$ , por outro lado, ocorre aproximadamente no mesmo número de onda do modo V27 (622  $\text{cm}^{-1}$ ), mas com um assinalamento distinto: enquanto V27 é composto por movimento de scissors do P7 do grupo fosfato, P26 é uma superposição de stretchings das ligações P-C e C-C.

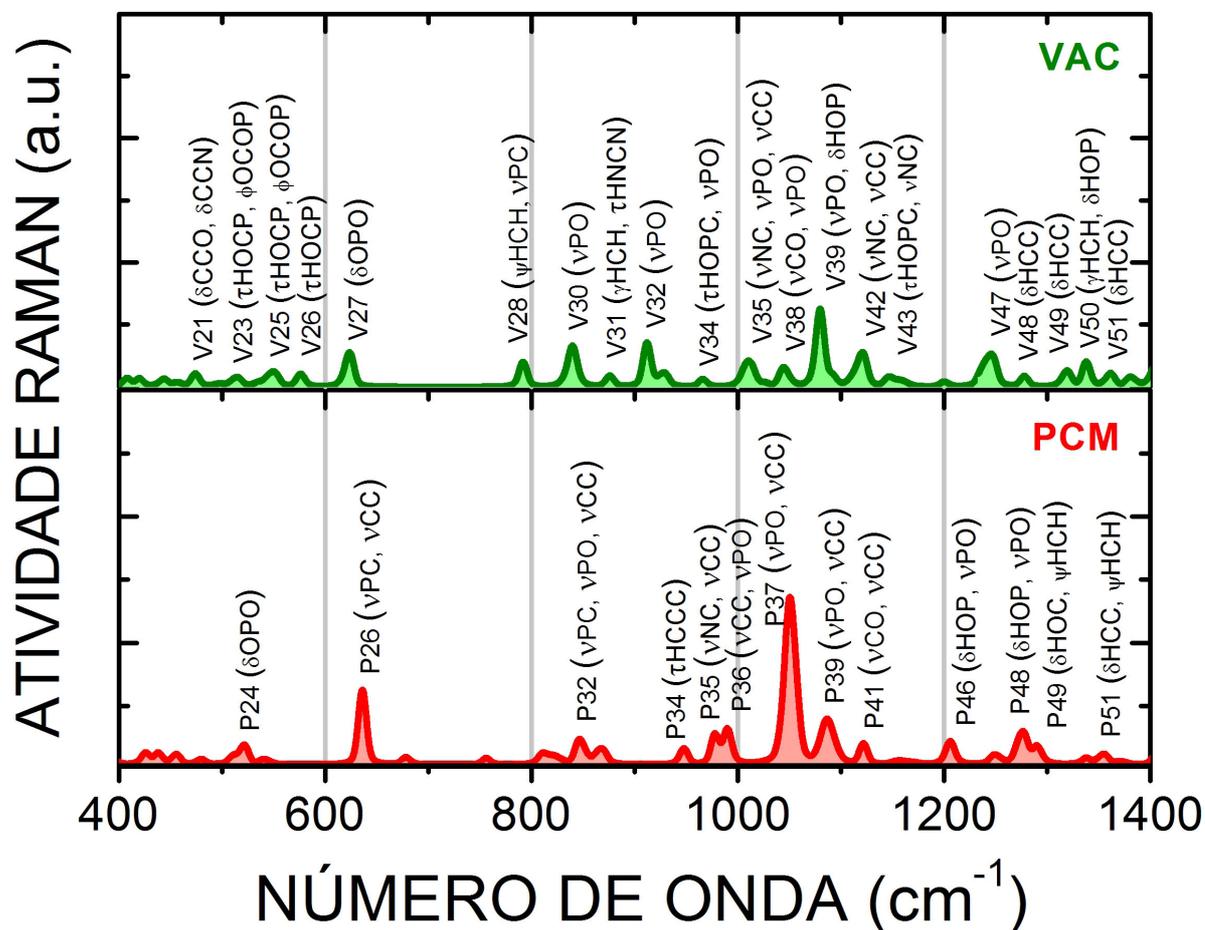
Figura 17: Deslocamentos atômicos na molécula de alendronato associados aos modos IR 420,33, 475,08, 780,78, 1174,26, 1250,71 e 1270,25  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: criada pelo autor.

No espectro Raman experimental representado na figura 19 foram identificados vinte

Figura 18: Espectro Raman teóricos calculados em DFT da molécula de alendronato em vácuo e em PCM (solvente água).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torsão, rocking, out, wagging e twist, respectivamente.

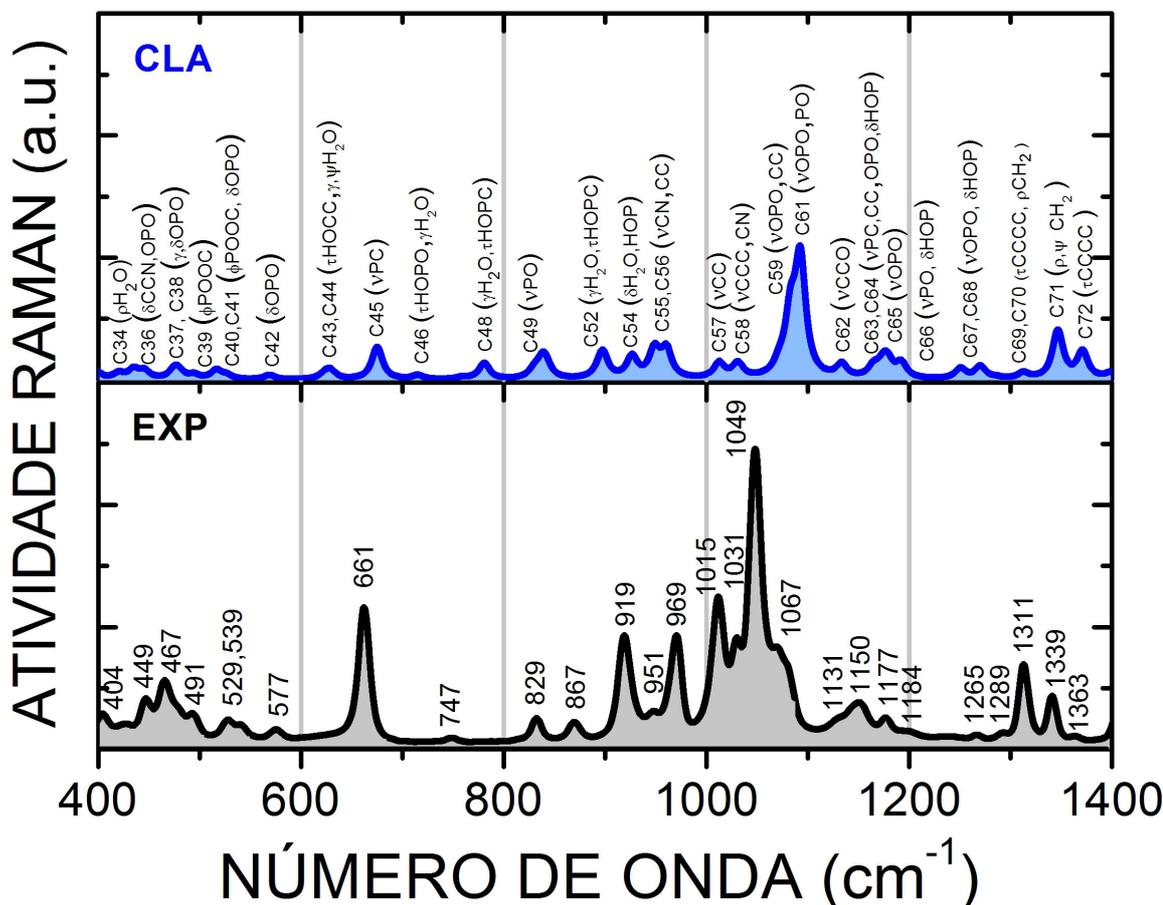


Fonte: criada pelo autor.

e sete picos relevantes entre 400 e  $1400\text{ cm}^{-1}$ , enquanto no espectro teórico do CLA foram identificados trinta e dois picos com intensidades relevantes. Os modos experimentais em  $1049$ ,  $1015$ ,  $661$ ,  $919$  e  $969\text{ cm}^{-1}$  correspondem à C64, C63, C45, C57 e C61, respectivamente. Os dois modos em  $1311$  e  $1339\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos à C71 e C72, respectivamente, o primeiro envolve movimentos scissors e twisting de grupos  $\text{CH}_2$  e o segundo vibrações twisting  $\text{CH}_2$  e torção C2C3C4C5.

Em  $1015$  e  $1031\text{ cm}^{-1}$  foram obtidos modos experimentais atribuídos a C63 e C64, o primeiro envolve stretching de ligações C-C e N-C, e o segundo scissoring HOP e stretching assimétrico OPO. C36, C37, C39 e C40 estão relacionados à vibrações scissors e fora do

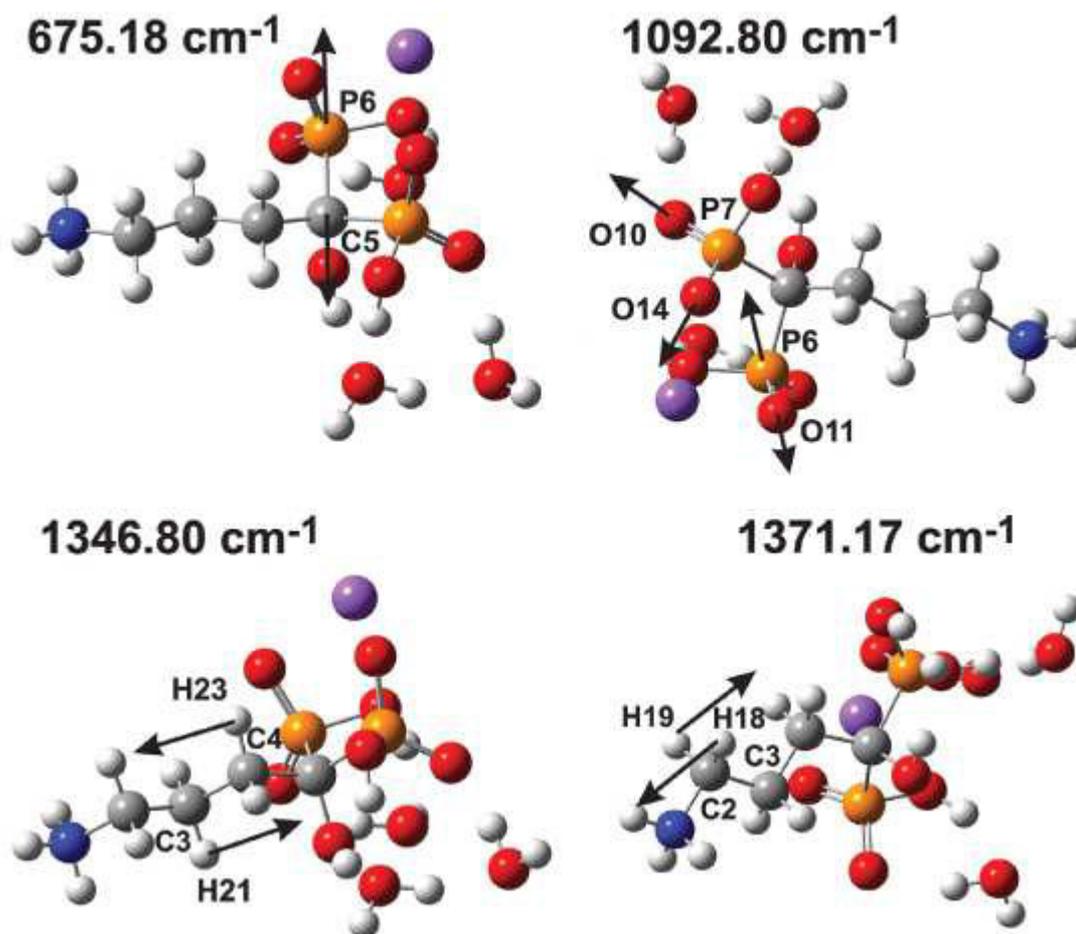
Figura 19: Espectros Raman medido do cristal alendroanto de sódio trihidratado (EXP); espectro Raman calculado em DFT da molécula de alendronato interagindo com três moléculas de água e um íon sódio (CLA).  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$  e  $\psi$  são os modos scissoring, stretching, torção, rocking, out, wagging e twist, respectivamente.



Fonte: criada pelo autor.

plano de grupos fosfatos, e corresponde aos modos experimentais em 449, 467, 491 e 529  $\text{cm}^{-1}$ , na respectiva ordem. Em 661  $\text{cm}^{-1}$  no espectro experimental, tem-se um pico de alta intensidade designado para C45 e envolve o stretching da ligação P6-C5, que não é destacado no espectro IR. Este resultado pode ser comparado com as medidas Raman de Becerril *et al.* [39] que estudou a adsorção de fibronectina sobre a HAP funcionalizada com alendronato. Neste estudo, uma banda de stretching P-C foi encontrada em 659  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto stretchings P-O foram encontrados em 968 e nos resultados obtidos nesse trabalho há um modo normal em 969  $\text{cm}^{-1}$  envolvendo stretchings em grupos fosfatos. Em contraste, os picos menores em 829 e 867  $\text{cm}^{-1}$  no espectro experimental Raman estão associados às vibrações C52 e C54 de CLA, respectivamente. O primeiro envolve a torção

Figura 20: Deslocamentos atômicos na molécula de alendronato associados aos modos Raman 675,18, 1092,80, 1346,80, and 1371,17  $\text{cm}^{-1}$ .



Fonte: criada pelo autor.

HOPO e wagging da água, enquanto o segundo consiste em scissorings OHO e HOP. Em 1150, 1177 e 1184  $\text{cm}^{-1}$ , vibrações de stretchings assimétricos O-P-O e scissorings de grupos H-O-P dominam os modos normais C66 e C67. Finalmente, pequenos picos em 577 e 747  $\text{cm}^{-1}$  podem ser assinalados a C43 e C48, com o modo com menor número de onda correspondendo à torção HOCC e wagging da água.

---

## 4 Os três cristais do Alendronato

---

Após estudarmos as propriedades do alendronato molecular, apresentadas no capítulo 3, voltamos a atenção ao estudo das propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas dos cristais: alendronato de sódio trihidratado (AST), alendronato de sódio anidro (ASA) e alendronato de cálcio anidro (ACA). O objetivo deste capítulo é verificar a influência da hidratação e dos íon  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  nas propriedades desses cristais.

### 4.1 As estruturas cristalinas convergidas

O íon alendronato presente nos três cristais, representados nas figuras 21, 22 e 23, encontra-se no estado zwitterionico, com o grupo amina terminal protonado em um lado da cadeia e os grupos fosfatos carregados negativamente interagindo com os íon  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , nos respectivos cristais. Nas figuras 21, 22 e 23 também estão representadas as ligações de hidrogênio responsáveis por estabilizar os cristais, juntamente com interações de Van Der Walls e interações elétricas dipolo. Essas interações são importantes e se manifestam nas propriedades estruturais, eletrônicas e ópticas dos cristais. Os parâmetros otimizados das

Tabela 4: Parâmetros de rede (em Å), volume da célula unitária (em  $\text{Å}^3$ ), ângulo  $\beta$  (em graus) e desvios em relação aos valores experimentais das células unitárias otimizadas dos cristais AST, ASA e ACA calculados em GGA+Ts.

Parâm.	AST <sub>T</sub>	AST <sub>E</sub>	$\Delta$ AST	ASA <sub>T</sub>	ASA <sub>E</sub>	$\Delta$ ASA	ACA <sub>T</sub>	ACA <sub>E</sub>	$\Delta$ ACA
a (Å)	7,235	7,275	-0,04	7,956	7,630	0,326	16,149	15,924	0,225
b (Å)	9,113	9,002	0,111	8,969	9,146	-0,177	12,564	12,404	0,160
c (Å)	19,713	19,503	0,210	14,362	14,457	-0,095	11,549	11,438	0,111
V (Å <sup>3</sup> )	1273,62	1255,40	18,22	964,60	931,40	33,20	1945,18	1883,59	61,59
$\beta$ (°)	101,5	100,6	0,9	109,8	112,6	-2,8	123,9	123,5	0,4

Fonte: criada pelo autor.

células unitárias dos cristais AST, ASA e ACA estão representados na tabela 4. Os valores experimentais dos parâmetros das células unitárias foram obtidos na literatura [22–24].

Os cálculos com o funcional GGA+Ts forneceram valores otimizados quase sempre maiores que os valores experimentais, como pode ser observado pelas variações entre os valores teóricos e medidas experimentais representados na tabela 4. Isso ocorre porque o funcional utilizado representa bem a força das interações atômicas. O cristal AST possui um único parâmetro otimizado menor que o experimental, porém com valor muito próximo ( $\Delta a$  de  $-0,04 \text{ \AA}$ ) e o ASA possui três valores menores que o experimental,  $b$  ( $\Delta b = -0,177 \text{ \AA}$ ;  $\Delta c = -0,095 \text{ \AA}$  e  $\Delta \beta = -2,8^\circ$ ). De maneira geral, dentre os três cristais, o AST apresentou as menores variações para os parâmetros de rede  $a$  e  $b$  ( $-0,04$  e  $9,113 \text{ \AA}$ , respectivamente) tendo a maior variação no parâmetro  $c$  ( $0,210 \text{ \AA}$ ). Comparando o ASA e ACA, o segundo apresentou as menores variações em  $a$  e  $b$  ( $0,225$  e  $0,160 \text{ \AA}$ ) e uma maior variação em  $c$  ( $0,115 \text{ \AA}$ ). O cristal com menor variação no volume foi o AST ( $18,2 \text{ \AA}^3$ ), seguido de ASA ( $33,2 \text{ \AA}^3$ ) e ACA ( $61,59 \text{ \AA}^3$ ), enquanto em relação ao ângulo, a menor variação foi o ACA ( $0,4^\circ$ ), em seguida o AST ( $0,9^\circ$ ) e o ACA com a maior variação em módulo ( $2,8^\circ$ ).

## 4.2 As propriedades eletrônicas

### 4.2.1 Análise Populacional de Hirshfeld

Na tabela 5 estão representadas as cargas elétricas calculadas, dos cristais AST, ASA e ACA por átomos e por grupos, pelo método da análise populacional de Hirshfeld. Para a análise populacional apresentadas aqui, o foco baseou-se nas cargas encontradas utilizando o código CASTEP.

Nos três cristais, os átomos mais negativos são os átomos de oxigênio com cargas variando de  $-0,37$  a  $-0,19e$  ( $e$  é carga fundamental usada como unidade de carga), isso deve-se ao fato de o átomo de oxigênio ser o mais eletronegativo da molécula e também está ligado diretamente a átomos de baixa eletronegatividade (fósforo, carbono e hidrogênio). Os átomos de fósforo são os mais positivos com cargas  $0,43$  e  $0,44e$ , uma vez que, estão ligados diretamente a átomos de oxigênio. O nitrogênio, levemente negativo, tem carga variando de  $-0,05$  a  $-0,03e$ . Os átomos de carbono são também levemente negativos com cargas entre  $-0,01$  e  $0,00e$ . Os átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio e aos átomos de oxigênio possuem carga positiva com valores bem próximos variando de  $0,10$  a  $0,14e$ , enquanto os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono possuem uma carga

Figura 21: (a) molécula de AST presente no cristal. (b) Estrutura da célula unitária do cristal AST. (c) colunas de água e íons Sódio presentes o cristal AST.

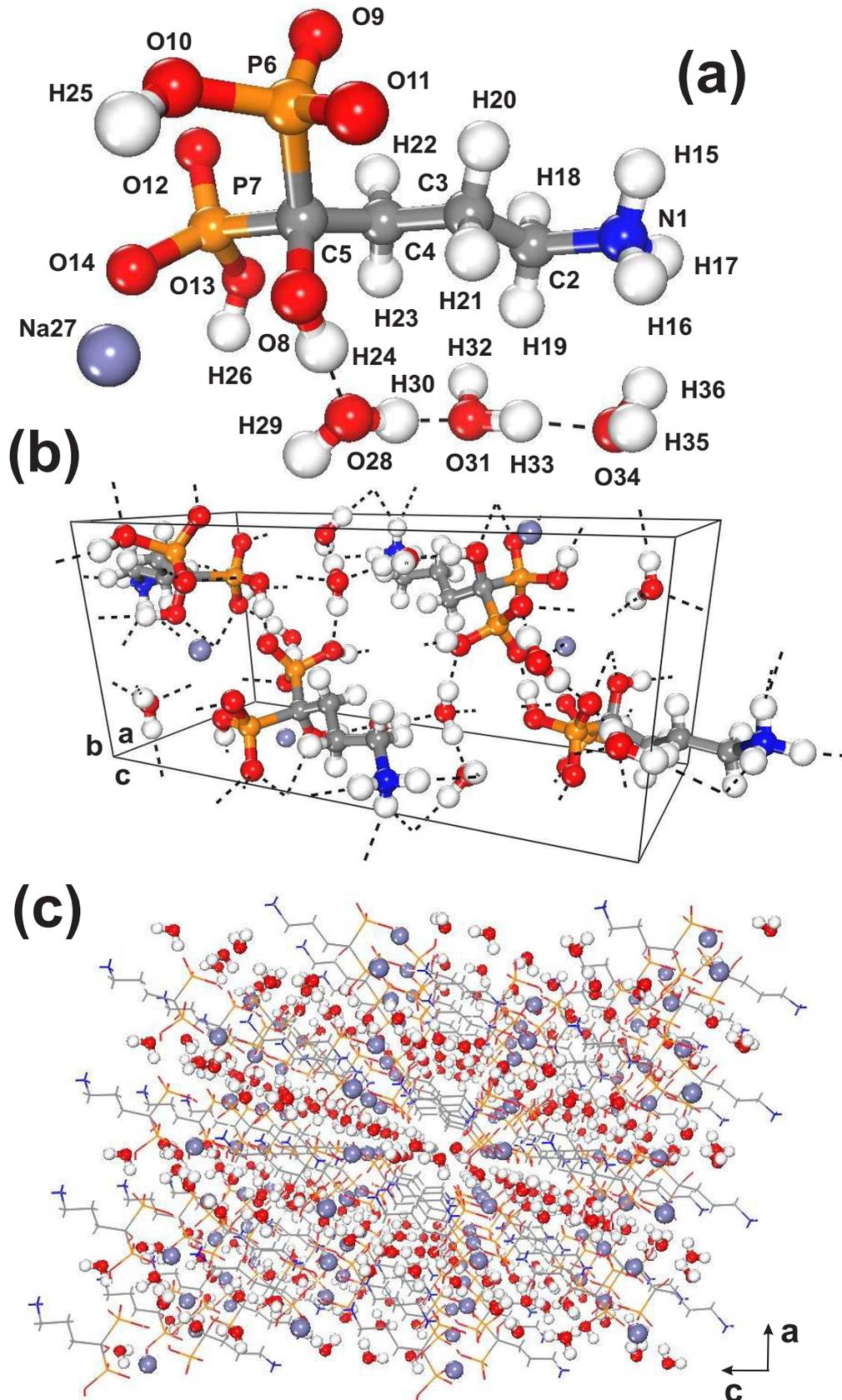


Figura 22: (a) molécula de ASA presente no cristal. (b) Estrutura da célula unitária do cristal ASA. (c) colunas de água e íons Sódio presentes o cristal ASA.

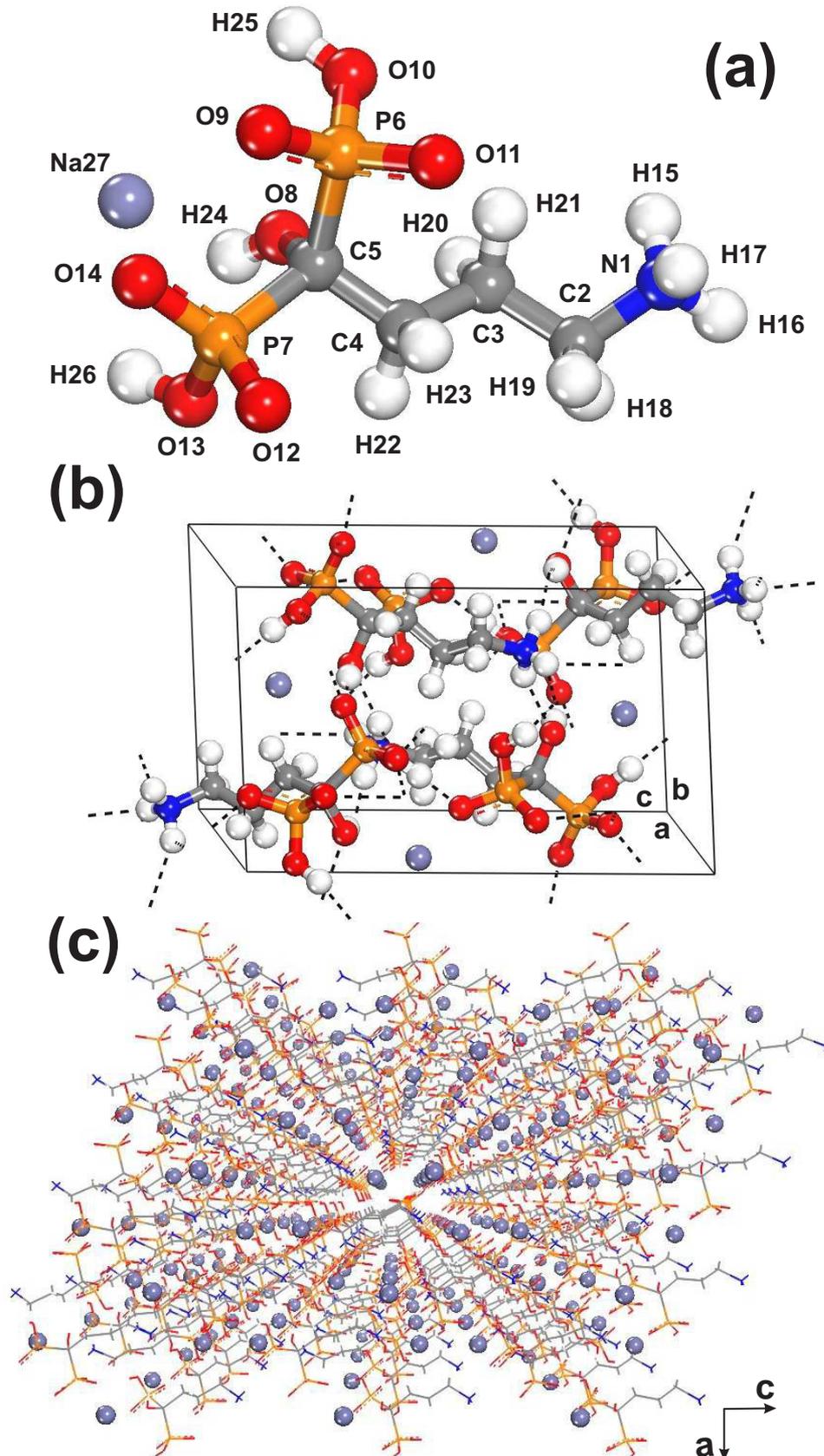


Figura 23: (a) molécula de ACA presente no cristal. (b) Estrutura da célula unitária do cristal ACA. (c) colunas de água e íons Sódio presentes no cristal ACA.

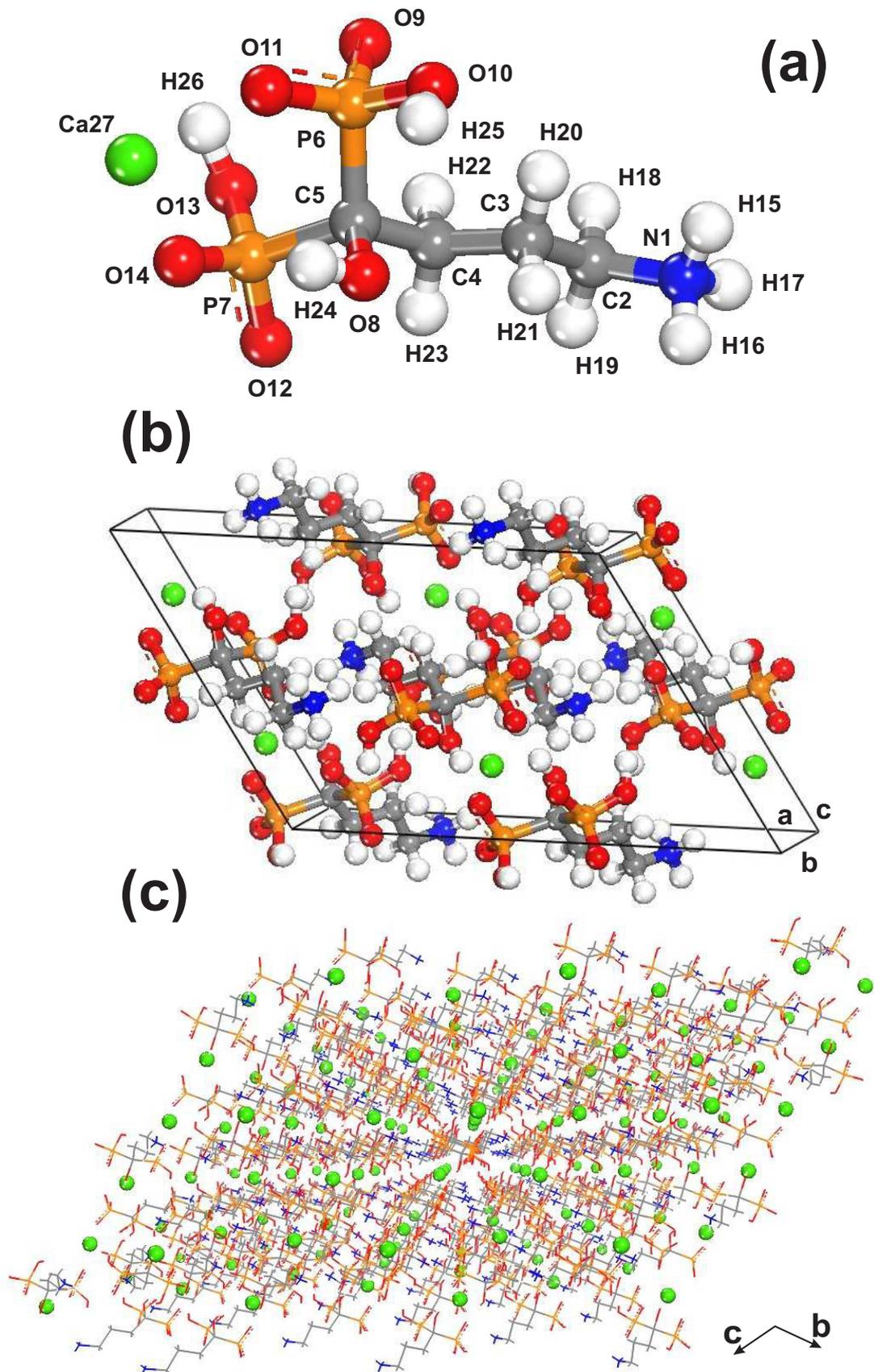


Tabela 5: Cargas atômicas de Hirshfeld por átomos e por grupos nos cristais AST, ASA e ACA, calculados no funcional GGA+Ts

Átomo	AST	ASA	ACA	Átomo	AST	ASA	ACA
$N_1$	-0,04	-0,05	-0,03	$H_{21}$	0,03	0,03	0,03
$C_2$	0,00	0,01	0,00	$H_{22}$	0,04	0,03	0,04
$C_3$	-0,07	-0,07	-0,07	$H_{23}$	0,03	0,04	0,03
$C_4$	-0,08	-0,08	-0,08	$H_{24}$	0,10	0,11	0,11
$C_5$	-0,02	-0,01	-0,01	$H_{25}$	0,10	0,12	0,11
$P_6$	0,43	0,43	0,44	$H_{26}$	0,12	0,11	0,11
$P_7$	0,44	0,44	0,43	$Na_{27}$	0,30	0,35	-
$O_8$	-0,20	-0,20	-0,19	$Ca_{27}$	-	-	0,37
$O_9$	-0,30	-0,37	-0,32	$O_{28}$	-0,24	-	-
$O_{10}$	-0,23	-0,22	-0,22	$H_{29}$	0,10	-	-
$O_{11}$	-0,27	-0,32	-0,29	$H_{30}$	0,12	-	-
$O_{12}$	-0,30	-0,29	-0,28	$O_{31}$	-0,22	-	-
$O_{13}$	-0,21	-0,21	-0,22	$H_{32}$	0,13	-	-
$O_{14}$	-0,30	-0,29	-0,31	$H_{33}$	0,11	-	-
$H_{15}$	0,12	0,13	0,13	$O_{34}$	-0,24	-	-
$H_{16}$	0,12	0,11	0,12	$H_{35}$	0,10	-	-
$H_{17}$	0,12	0,11	0,14	$H_{36}$	0,11	-	-
$H_{18}$	0,04	0,05	0,05	$PO_3H(1)$	-0,27	-0,36	-0,28
$H_{19}$	0,05	0,05	0,04	$PO_3H(2)$	-0,25	-0,26	-0,27
$H_{20}$	0,03	0,03	0,04	$NH_3$	0,40	0,30	0,36

Fonte: criada pelo autor.

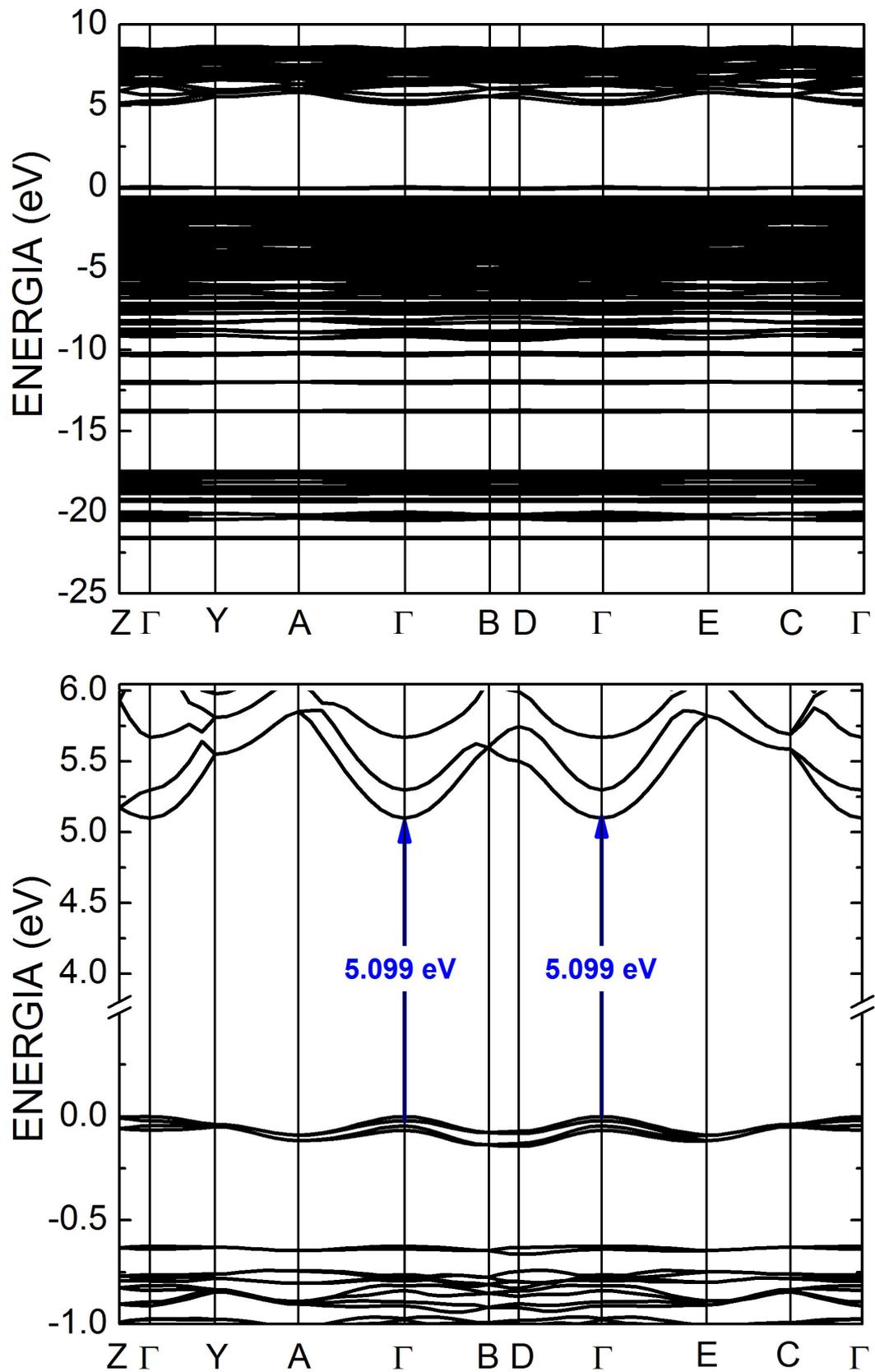
menos positiva, variando de 0,03 a 0,05. O íon sódio, presente no cristal AST e ASA possuem carga 0,30 e 0,35e respectivamente, enquanto o íon cálcio 0,37e.

Analisando as cargas nos grupos fosfatos ( $PO_3H$ ) e amina protonada ( $NH_3$ ) nos cristais AST, ASA e ACA verifica-se que os fosfatos possuem carga negativa (-0,36 a -0,25e) e a amina protonada possui carga positiva (0,36 a 0,40e). Isso mostra o estado zwitterionic do alendronato nos três cristais, ou seja, pela análise populacional de Hirshfeld verifica-se que há separação de carga na molécula alendronato.

## 4.2.2 Estrutura de banda e densidade de estados

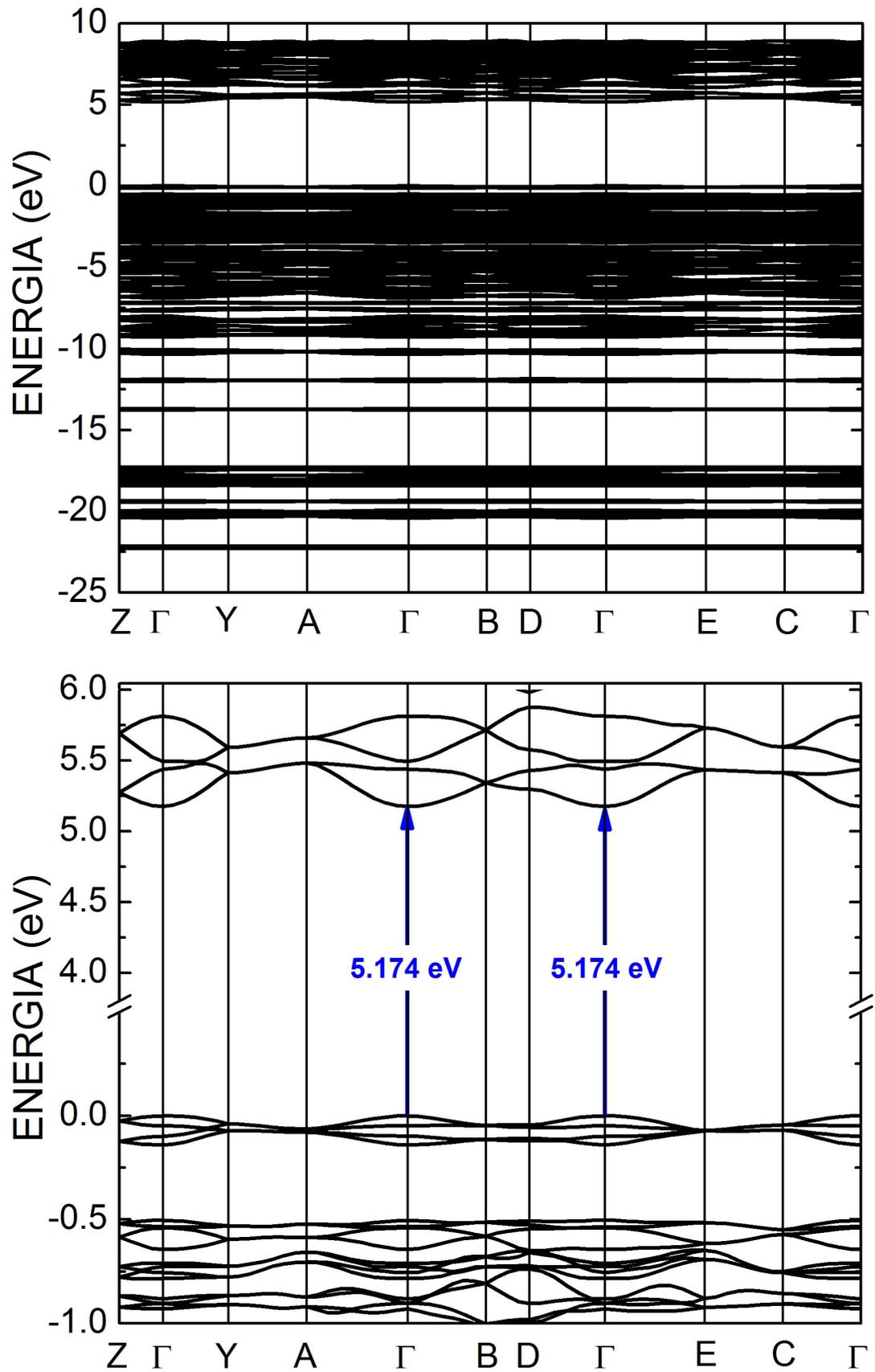
A estrutura de banda eletrônica de Kohn-Sham fornece uma auto-energia eletrônica  $E$  como uma função do conjunto de números quânticos que formam os componentes de um vetor onda  $\mathbf{K}$  na primeira Zona de Brillouin (ZB). Para os cristais monoclinicos AST, ASA e ACA, os caminhos na ZB usados para os cálculos DFT são formados por linhas retas conectando um conjunto de pontos de alta simetria. Para a estrutura monoclinica dos cristais AST e ASA os seguintes pontos de alta simetria foram escolhidos: Z (0,0,1/2)  $\Gamma$  (0,0,0), Y (0,1/2,0), A (-1/2,1/2,0), B (-1/2,0,0), C (0,1/2,1/2), D (-1/2,0,1/2), E (-

Figura 24: Estrutura de Banda calculada em GGA+Ts do cristal AST.



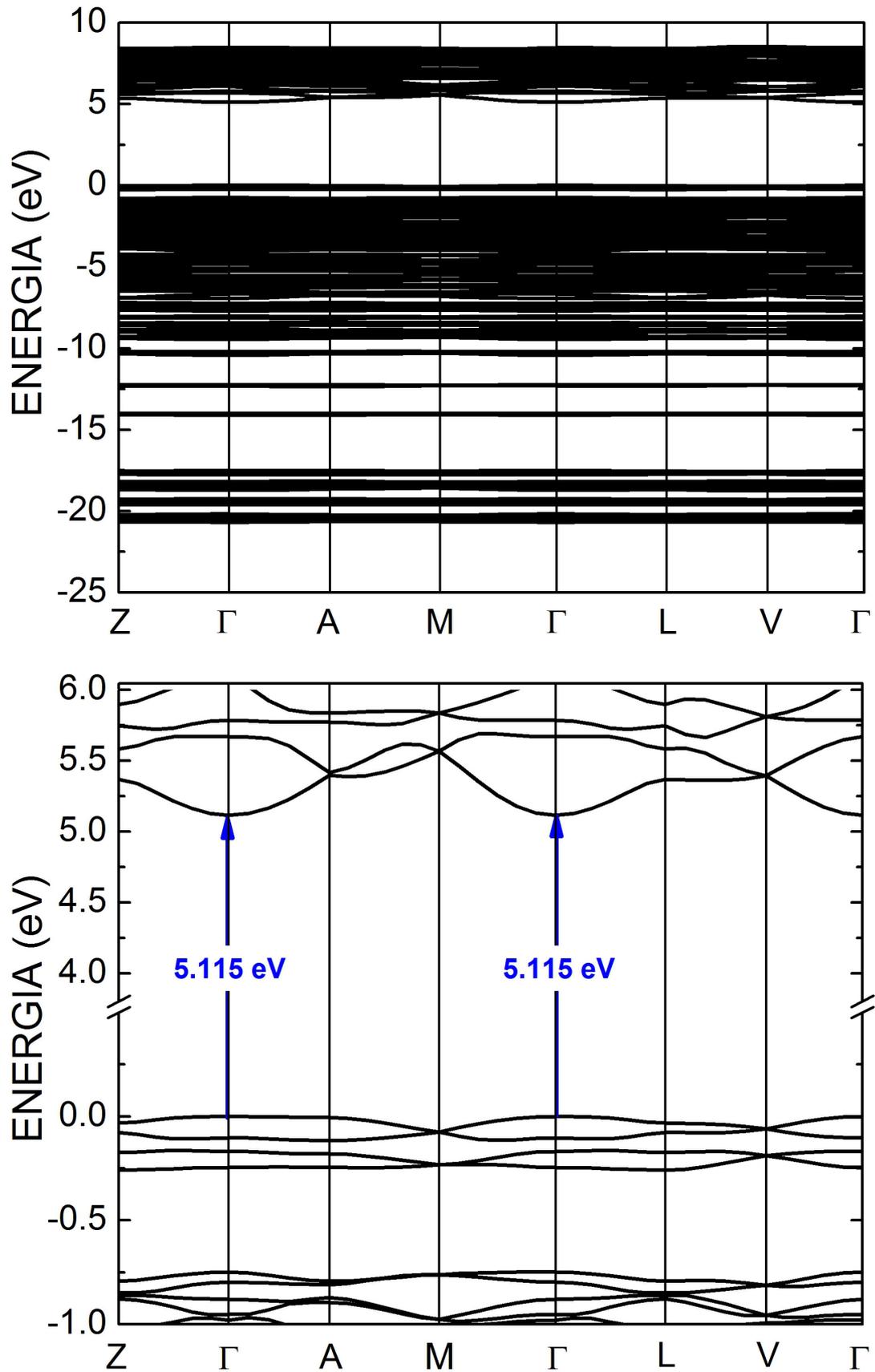
Fonte: criada pelo autor.

Figura 25: Estrutura de Banda calculada em GGA+Ts do cristal ASA.



Fonte: criada pelo autor.

Figura 26: Estrutura de Banda calculada em GGA+Ts do cristal ACA.



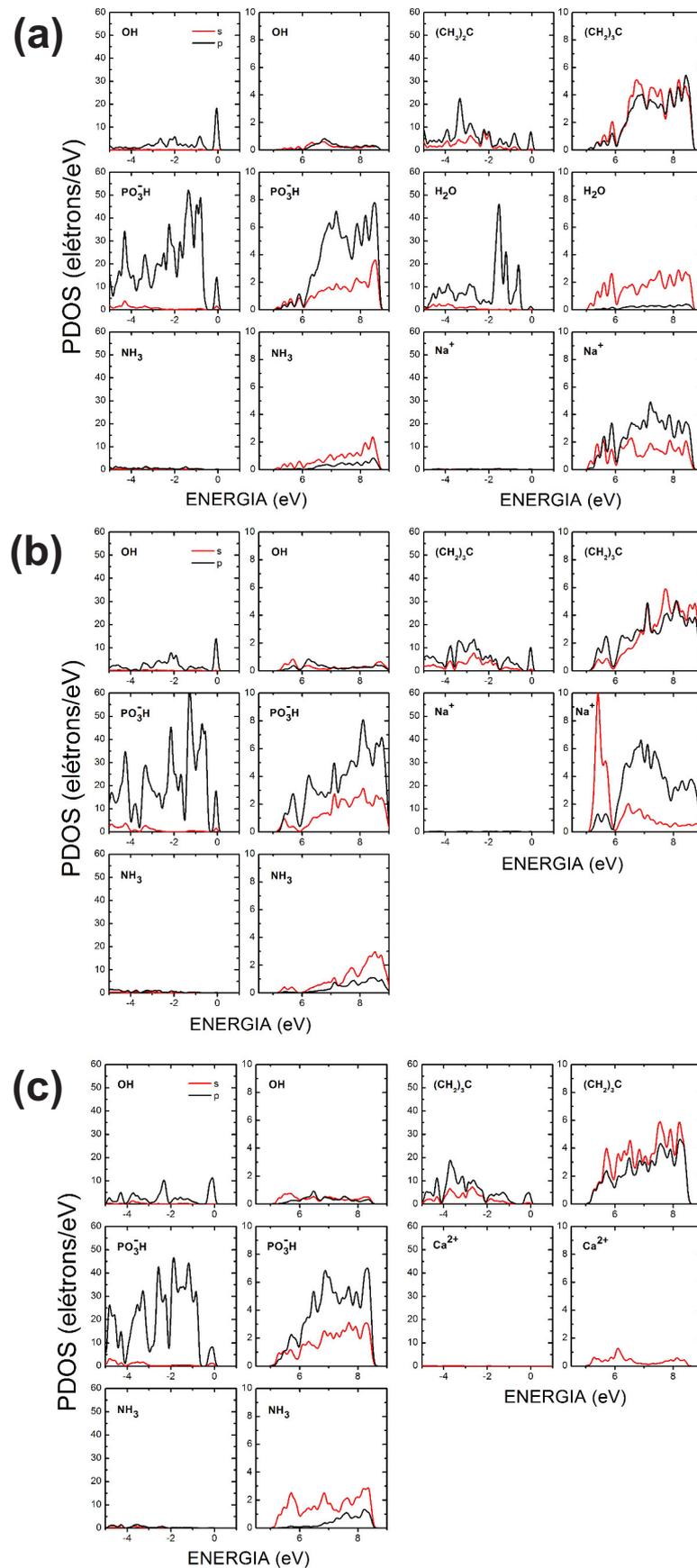
Fonte: criada pelo autor.

$1/2, 1/2, 1/2$ ). E para o ACA os seguintes pontos de alta simetria foram escolhidos: Z  $(0, -1/2, 1/2)$ ,  $\gamma$   $(0, 0, 0)$ , A  $(-1/2, 0, 0)$ , M  $(-1/2, -1/2, 1/2)$ , L  $(-1/2, 0, 1/2)$ , V  $(0, 0, 1/2)$ .

Nas Figuras 24, 25 e 26 tem-se a estrutura de banda otimizada em GGA+Ts dos cristais AST, ASA e ACA respectivamente. Os valores de energia foram calibrados para garantir que a energia mais alta para um elétron de valência é exatamente 0 eV. Nas Figuras 24, 25 e 26 também estão representados os valores dos GAPs de energia para cada cristal. Todos os GAPs são diretos no ponto  $\Gamma$ , onde há o ponto mínimo da banda de condução e o ponto máximo da banda de valência. As estruturas de bandas obtidas possuem formas muito semelhantes, sendo a banda de condução mais curva em AST, além dos valores de GAP direto muito próximos, cujos valores para o AST, ASA e ACA são, respectivamente 5,099, 5,174 e 5,115 eV. Comparando os cristais AST e ASA pode-se verificar a influência da água no GAP de energia. O cristal hidratado possui um GAP menor (5,099 eV) enquanto o cristal anidro de mesmo íon tem um GAP maior (5,174 eV). Comparando os GAPs dos cristais anidros com íons diferentes,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , pode-se verificar a influência dos íons. O ASA possui um GAP menor de energia (5,174 eV) comparado ao GAP do ACA (5,115 eV).

A banda de valência de ambos os cristais recebem contribuições muito semelhantes a partir dos grupos constituintes do cristal como pode ser visto na figura 27, que representa a densidade de estados por grupos. A densidade de estados representa a contribuição de orbitais s e p nas bandas de energias, indicando o grupo que mais contribui para a existência daquela banda. Entre os cristais AST e ASA a maior diferença se dar entre na contribuição da banda de condução. No primeiro, a água contribui de maneira equivalente ao íon sódio com orbitais s, e no segundo a contribuição do íon sódio torna-se muito superior à contribuição no primeiro. Comparando o ASA e ACA, a banda de valência do ASA tem uma contribuição maior se originando dos orbitais p dos grupos fosfatos e da cadeia carbônica, enquanto a banda de condução tem uma pequena participação do íon cálcio, sendo sua constituição originada de maneira equivalente dos grupos fosfatos, amina protonada e a cadeia carbônica, ao contrário do cristal ASA, no qual o íon sódio é o principal constituinte.

Figura 27: Densidade de estados em GGA+Ts dos cristais AST, ASA e ACA.

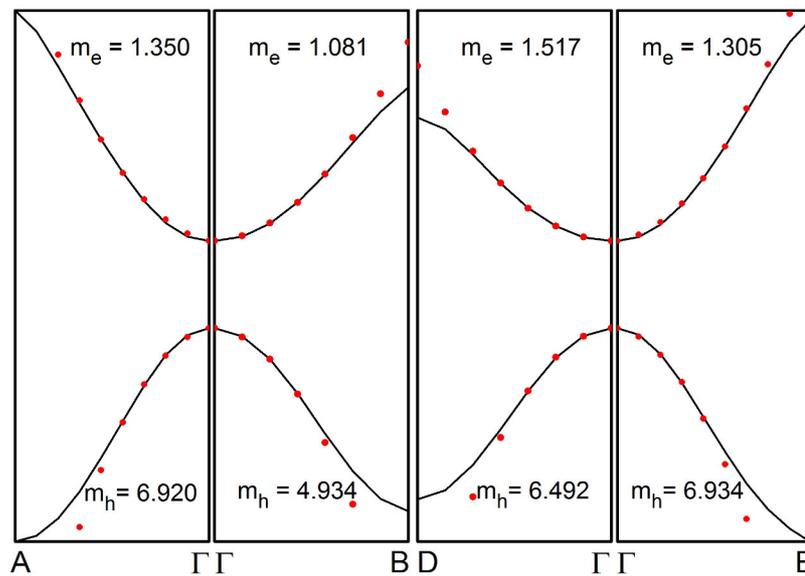


### 4.2.3 Massas efetivas

Uma forma de analisar a mobilidade de carga é através do cálculo de massa efetiva. Isto envolve um procedimento no qual calcula-se a curvatura da banda em pontos de interesse na ZB pela elaboração de curva correspondente a uma equação quadrática sobreposta a curvatura da banda. Foram analisados caminhos nos cristais apenas em torno do ponto de alta simetria  $\Gamma$ , pois o GAP direto de energia se dá nesse ponto. As figuras 28, 29 e 30 representam os valores das massas efetivas calculadas para os caminhos:  $A \rightarrow \Gamma$ ,  $\Gamma \rightarrow B$ ,  $D \rightarrow \Gamma$  e  $\Gamma \rightarrow E$  para os cristais AST e ASA e os caminhos  $Z \rightarrow \Gamma$ ,  $\Gamma \rightarrow A$ ,  $M \rightarrow \Gamma$  e  $\Gamma \rightarrow L$  para o cristal ACA.

Para o cristal AST, a massa efetiva de buraco varia de 4,934 ( $\Gamma \rightarrow B$ ) a 6,934 ( $\Gamma \rightarrow E$ ), em ASA varia de 8,387 ( $\Gamma \rightarrow B$ ) a 11,080 ( $A \rightarrow \Gamma$ ) e para o cristal ACA varia de 4,220 ( $Z \rightarrow \Gamma$ ) a 98,720 ( $\Gamma \rightarrow A$ ), enquanto a massa efetiva do elétron para o AST, ASA e ACA varia, respectivamente, de 1,081 ( $\Gamma \rightarrow B$ ) a 1,517 ( $D \rightarrow \Gamma$ ), de 2,403 ( $\Gamma \rightarrow E$ ) a 5,241 ( $\Gamma \rightarrow B$ ), e de 0,557 ( $Z \rightarrow \Gamma$ ) a 4,674 ( $\Gamma \rightarrow A$ ).

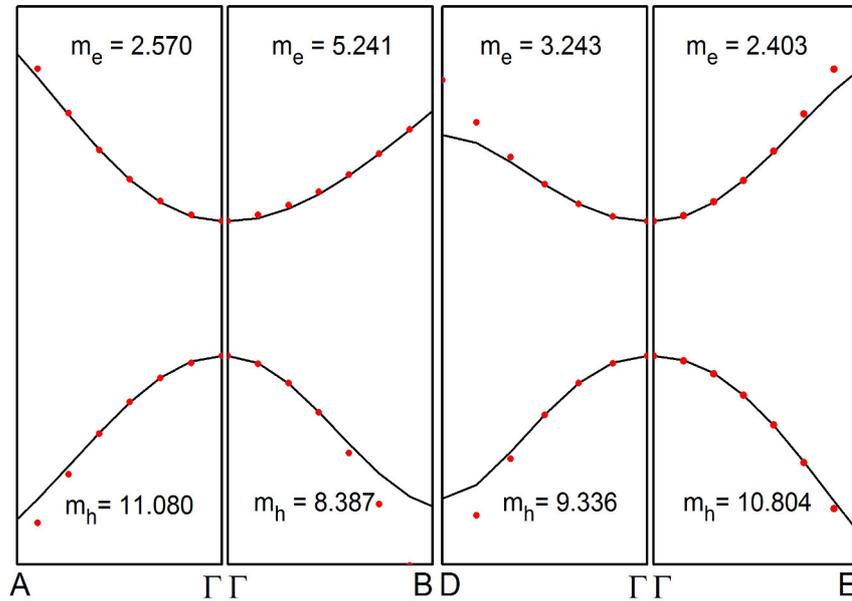
Figura 28: Massas efetivas calculadas em torno do ponto de alta simetria  $\Gamma$  para o cristal AST.



Fonte: criada pelo autor.

O cristal AST possui massa efetiva de elétron muito baixa indicando uma boa condução eletrônica, principalmente, no caminho  $\Gamma \rightarrow B$ , menor massa efetiva. No cristal ASA a condução é favorecida no caminho  $\Gamma \rightarrow E$ , enquanto no cristal ACA, o caminho  $Z \rightarrow \Gamma$

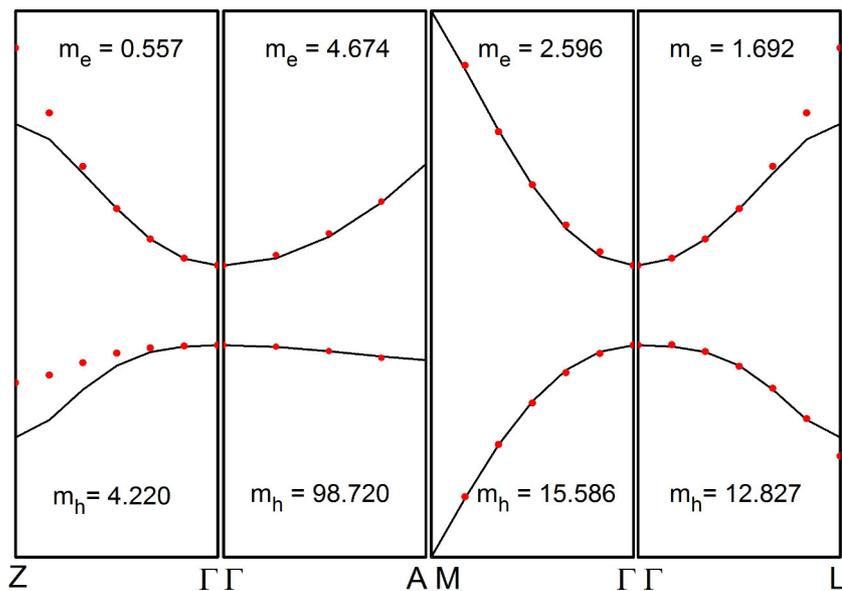
Figura 29: Massas efetivas calculadas em torno do ponto de alta simetria  $\Gamma$  para o cristal ASA.



Fonte: criada pelo autor.

é o mais favorecido para a condução.

Figura 30: Massas efetivas calculadas em torno do ponto de alta simetria  $\Gamma$  para o cristal ACA.



Fonte: criada pelo autor.

## 4.3 As propriedades Ópticas

As propriedades ópticas dos cristais AST, ASA e ACA são analisadas, nesse trabalho, por meio da absorção óptica e das funções dielétricas (parte real e imaginária) em cada cristal. A função dielétrica do material mostra o comportamento isolante e condutor desse material quando submetido a um campo elétrico polarizado, e a absorção óptica relaciona-se com o GAP de energia das estruturas de bandas calculadas.

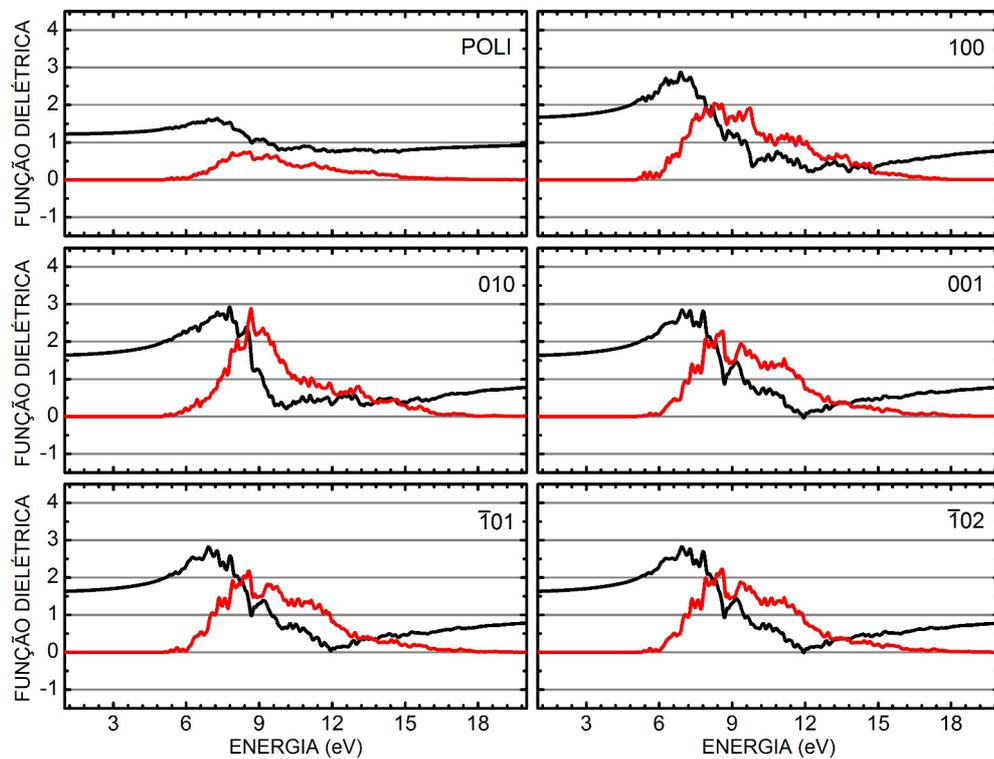
### 4.3.1 Função dielétrica

A função dielétrica dos cristais AST, ASA e ACA são representados nas figuras 31, 32 e 33, respectivamente, considerando diferentes planos de polarização para a radiação incidente. A direção de polarização  $\mathbf{u}$  é definida em relação aos vetores principais que definem a célula unitária. Assim,  $\mathbf{u} = 100$  significa que o campo elétrico incidente sobre a amostra do cristal vibra ao longo do eixo  $a$  e  $\mathbf{u} = 010$  e  $\mathbf{u} = 001$  representam os eixos  $b$  e  $c$ , respectivamente. Uma amostra policristalina (poli) pode ser simulada fazendo uma média isotrópica da propriedade óptica ao longo de todas as direções.

A função dielétrica dos cristais AST e ASA apresenta uma notável anisotropia, enquanto o ACA apresenta um alto grau de isotropia quando se observa o comportamento sob diferentes polarizações da radiação incidente. A amplitude da variação, tanto da parte real como da parte imaginária da função dielétrica, em ambos os cristais são muito próximos. Os valores máximos da parte real da função dielétrica para a polarização 100, nos cristais AST, ASA e ACA ocorre, respectivamente, nas regiões que variam de 7,10 a 10,01 eV, 5,28 a 8,02 eV, e 5,30 a 7,96 eV. Para a direção 010 as regiões variam de 5,86 a 8,56 eV, 6,00 a 8,59 eV e 5,30 a 7,96 eV para os cristais AST, ASA e ACA, respectivamente. E na direção 001 tem-se 5,90 - 8,01 (AST), 5,28 - 8,48 (ASA) e 5,85 - 7,90 (ACA). Os valores máximos da parte imaginária no plano 100, nos cristais AST, ASA e ACA ocorre, respectivamente, nas regiões que variam de 7,10 a 10,01 eV, 7,10 a 11,91 eV e 6,81 a 11,64 eV. Em 010 essas regiões são 7,81-10,04 eV, 6,61 - 12,57 eV e 6,81 - 11,64 eV e para a região 001, 7,84 - 11,16 eV, 6,86 - 13,07 eV e 7,07 - 11,91 eV nos cristais AST, ASA e ACA, respectivamente.

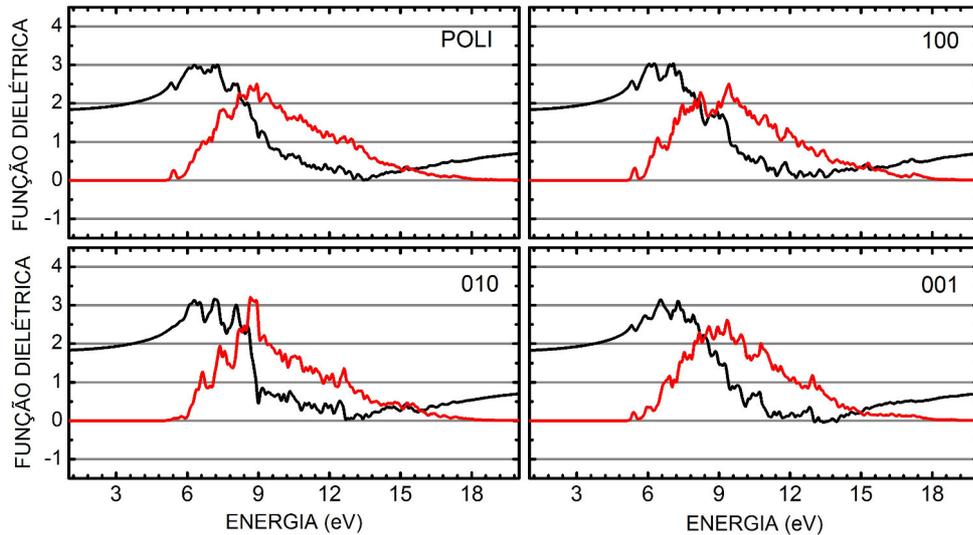
No cristal AST há dois planos adicionais referentes ao plano da coluna de água (101) e o planos das ligações de hidrogênio (102), ambos apresentam comportamento isotrópico com os valores máximos da amplitude da parte real variando de 6,15 a 7,93 eV e a parte

Figura 31: Partes real(preto) e imaginária(vermelho) da função dielétrica do cristal AST. Diferentes planos de polarização para a radiação incidente são indicados no canto superior direito de cada gráfico. O caso de radiação incidente sobre uma amostra policristalina também é indicado (POLI).



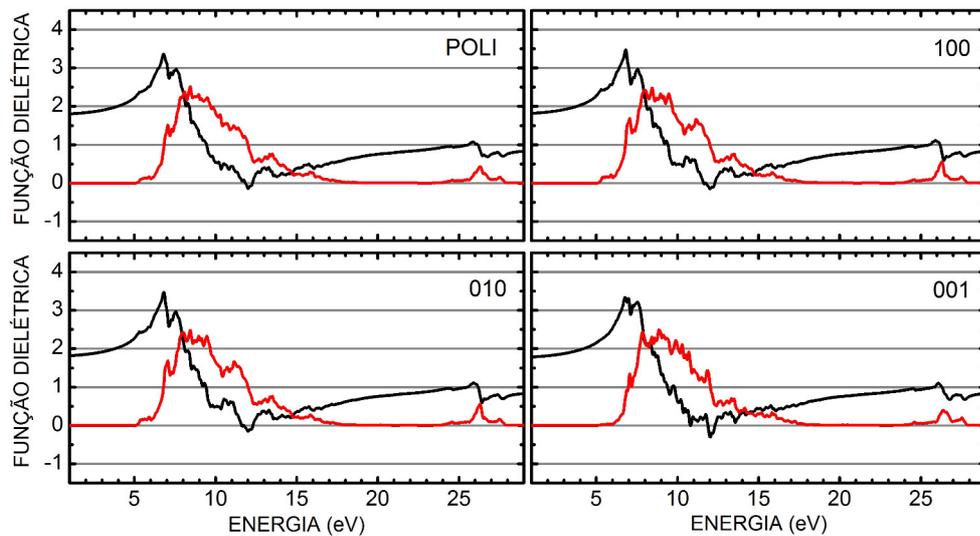
Fonte: criada pelo autor.

Figura 32: Partes real(preto) e imaginária(vermelho) da função dielétrica do cristal ASA. Diferentes planos de polarização para a radiação incidente são indicados no canto superior direito de cada gráfico. O caso de radiação incidente sobre uma amostra policristalina também é indicado (POLI).



Fonte: criada pelo autor.

Figura 33: Partes real(preto) e imaginária(vermelho) da função dielétrica do cristal ACA. Diferentes planos de polarização para a radiação incidente são indicados no canto superior direito de cada gráfico. O caso de radiação incidente sobre uma amostra policristalina também é indicado (POLI).



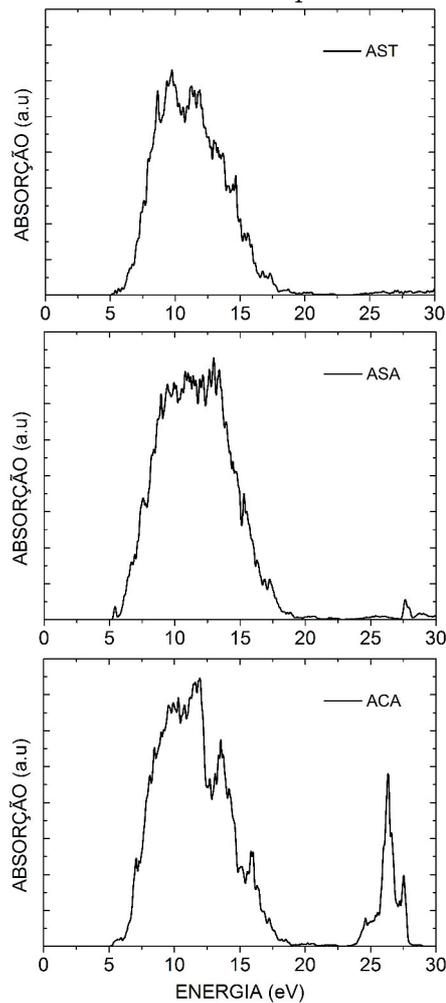
Fonte: criada pelo autor.

imaginária variando de 7,84 a 11,16 eV. Nos três cristais observa-se a diminuição da função dielétrica com o aumento da energia do campo elétrico.

### 4.3.2 Absorção Óptica

A absorção óptica é última propriedade analisada nesta seção. Na figura 34 estão representadas as absorções ópticas calculadas em GGA+Ts dos cristais AST, ASA e ACA. Observando a figura 34 verifica-se uma diferença marcante na absorção entre 25 e 30 eV. O cristal AST não possui pico de absorção nessa região, o cristal ASA por sua vez, apresenta um pico de baixa intensidade enquanto o cristal ACA apresenta um pico muito intenso nessa região. Logo, verifica-se uma importante influência do íon  $\text{Ca}^{+2}$ , principalmente, nessa região.

Figura 34: Absorções teóricas em GGA+Ts para os cristais AST, ASA e ACA.



Fonte: criada pelo autor.

---

## 5 conclusões e Perspectivas

---

Neste trabalho investigamos primeiramente as propriedades estruturais e vibracionais da molécula de alendronato em fase gasosa e considerando o modelo contínuo de solvatação (PCM), além de um terceiro modelo, denominado CLA, que simula o ambiente químico no cristal de alendronato de sódio trihidratado. Foram obtidas quatro conformações em vácuo, com energias muito próximas, e duas em pcm, com energias bem distantes, além de CLA. A conformação mais estável em vácuo e pcm, juntamente com CLA tiveram seus espectros teóricos IR e RAMAN calculados e discutidos. Uma comparação dos espectros IR e Raman dos sistemas VAC e PCM revelaram que no região acima de  $1000\text{ cm}^{-1}$  os modos normais de PCM são deslocados para números de onda menores, enquanto entre  $600$  e  $800\text{ cm}^{-1}$  a geometria VAC não exibe um conjunto de picos relacionados à torção vibracional presente nos dados em PCM. Quando moléculas de água explícitas e sódio foram levados em consideração, o espectro IR e Raman tornam-se mais estruturados e pode ser comparado com as medidas experimentais. Usando a curva de absorção IR do CLA, as assinaturas de grupos fosfatos puderam ser identificadas nas principais bandas experimentais: em  $1015$  (stretching PC),  $1049$  (scissoring HOP e stretching OPO), e  $1067\text{ cm}^{-1}$  (stretching OPO), como também  $1131$ ,  $1177$  e  $1235\text{ cm}^{-1}$  (stretching OPO). Entretanto um conjunto de bandas importantes em torno de  $920\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído à vibrações envolvendo ligações CC. Importantes bandas de absorção também ocorrem próximo a  $460$  e  $560\text{ cm}^{-1}$  com fortes contribuições de movimentos scissoring OPO e vibrações das moléculas de água. Em comparação com os dados no espectro IR, o espectro Raman experimental e CLA são menos estruturados, com o modo mais intenso em  $1049\text{ cm}^{-1}$  (scissoring HOP e stretching OPO) e um modo intenso em  $661\text{ cm}^{-1}$  (stretching PC). Outra importante banda que parece ser ausente ou muito fraca no espectro IR ocorre em  $449$  (scissoring NCC, scissoring OPO),  $969$  (stretching OPO),  $1311$  (rocking e twisting  $\text{CH}_2$ ), e  $1339\text{ cm}^{-1}$  (torção CCCC, twisting  $\text{CH}_2$ ). Esses resultados podem fornecer referências úteis para interpretar o espectro vibracional de alendronato quando ligado à

hidroxiapatita e outros sistemas, fornecendo sua caracterização física.

Foram realizados cálculos via DFT para a obtenção das geometrias otimizadas e propriedades optoeletrônicas dos cristais AST, ASA e ACA. O funcional GGA+Ts foi empregado na otimização das células unitárias dos cristais mostrando uma boa aproximação com os valores experimentais obtidos por cristalografia de raio-X. A análise populacional de Hirshfeld mostrou a presença de cargas negativas nos grupos fosfatos e a presença de carga positiva na amina protonada, caracterizando o estado zwitterionic. As estruturas de banda de Kohn-Sham mostraram apenas GAP direto nos cristais AST, ASA e ACA cujos valores são 5,099, 5,174 e 5,115 eV, respectivamente. Em seguida para investigar as propriedades de transporte de carga foi calculada a massa efetiva de elétrons e buracos, onde verificou-se que o cristal AST possui massa efetiva de elétron muito baixa indicando uma boa condução eletrônica, principalmente, no caminho  $\Gamma \rightarrow B$ , menor massa efetiva, no cristal ASA a condução é favorecida no caminho  $\Gamma \rightarrow E$ , no cristal ACA, o caminho  $Z \rightarrow \Gamma$  é o mais favorecido para a condução. A função dielétrica foi calculada revelando um comportamento anisotrópico para os cristais AST e ASA, e um comportamento isotrópico para o ACA quando se observa o comportamento sob diferentes polarizações da radiação incidente. E por último as absorções ópticas dos três cristais foram calculadas e verificou-se uma forte influência do íon  $Ca^{+2}$  na região entre 25 e 30 eV, na qual surge um pico de absorção de alta intensidade no cristal ACA.

Como perspectiva para a continuação desse trabalho planeja-se: analisar o assinalamento de grupos fosfatos de outros BPs para verificar a influência das cadeias laterais R1 e R2 nos modos normais de vibração, uma vez que, o alendronato não é o único BP utilizado no tratamento de osteoporose; investigar o mecanismo de ação do alendronato na inibição da enzima chave no caminho do mevalonato, a FPPS, pois o entendimento de quais grupos de aminoácidos que se ligam mais fortemente ao alendronato, pode fornecer importantes referências para o desenvolvimento de outros BPs; obter medidas experimentais de absorção para os cristais AST, ASA e ACA para confirmar a influência da água e dos íons  $Na^+$  e  $Ca^{+2}$  nos espectros de absorção óptica, de forma que os resultados teóricos obtidos nesse trabalho sejam validados; Estudar por dinâmica molecular a interação do alendronato com nanotubos de carbono, pois experimentalmente já verificou-se que o poder de inibição é aumentado em função dessa interação, assim, torna-se necessário entender de que forma nanotubos de carbonos influenciam no aumento da potência de inibição desses fármacos para, em seguida, avaliar seu uso na entrega controlada de drogas.

## APÊNDICE

---

## APÊNDICE A – Tecido ósseo: constituição, estrutura e funções

---

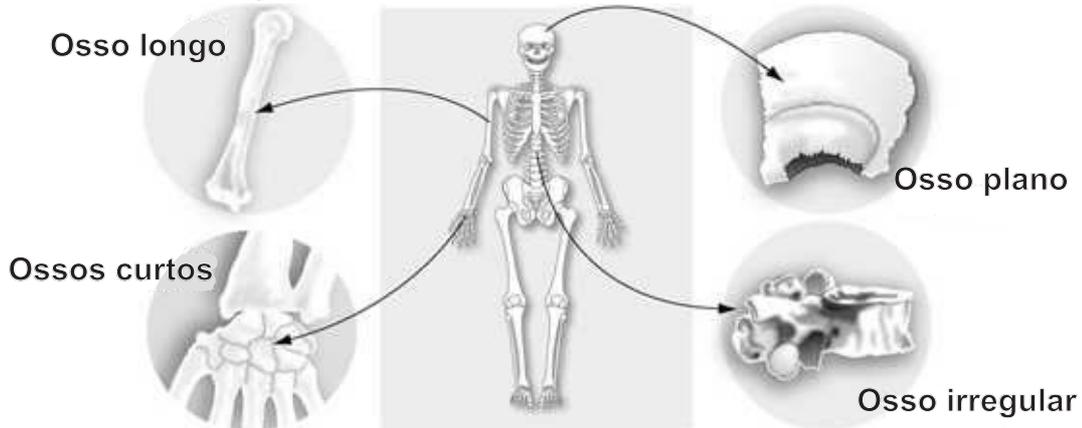
Os ossos constituem os elementos estruturais primários do corpo, protegendo órgão vitais e fornecendo uma estrutura rígida para locomoção. O estudo microscópico do tecido ósseo distingue a substância óssea compacta e a substância óssea esponjosa. Embora os elementos constituintes sejam os mesmos nos dois tipos de substância óssea, [5] eles dispõem-se diferentemente conforme o tipo considerado e o seu aspecto macroscópico também difere. Na substância óssea esponjosa, as lamínulas ósseas, mais irregulares em forma e tamanho, se arranjam de forma a deixar entre si, espaços ou lacunas que se comunicam umas com as outras e que, à semelhança do canal medular, contém medula.

Os ossos são classificados quanto a sua forma basicamente em quatro tipos, como representado na figura 35 e descritos a seguir:

- ossos longos: quando seu comprimento sobressai sua altura e largura. Por exemplo: fêmur, tíbia, fíbula, rádio, ulna e falanges.
- ossos curtos: são osso cujas dimensões se equivalem e possuem como função primária fornecer sustento e estabilidade em pequenos movimentos. Exemplo: ossos do carpo (mão) e ossos do tarso (pé)
- ossos planos: são ossos de superfície plana tais como: a escápulas, frontal e parietais.
- ossos irregulares: são ossos que não possui uma forma geométrica definida, como por exemplo as vértebras.

Os ossos são alavancas e, portanto, devem ser rígidos, ou seja, eles devem resistir à deformação. Os impactos do dia a dia (tais como a força de reação gerada na caminhada ou uma força de impacto devido uma queda), porém, fornecem energia ao osso. Uma vez que, a energia não pode ser destruída e sim armazenada ou dissipada, o osso também deve ser flexível de modo a absorver a energia mudando de forma, encurtando-se e dilatando-se sob tensão sem quebrar, além de ter que ser leve para permitir a mobilidade [2].

Figura 35: Tipos de ossos quanto a sua forma.



Fonte: criada pelo autor.

As propriedades elásticas do osso permitem-no absorver energia por deformação reversível [40], entretanto, se a carga imposta exceder a habilidade do osso em deforma-se elasticamente, ocorrerá uma deformação irreversível, denominada de plástica. Esta se caracteriza por uma mudança permanente na forma do osso com acúmulo de microfraturas que permitem a liberação de energia. Esses microdanos é uma defesa contra uma fratura completa, porém, comprometem a força do osso quando acumuladas [2].

Para estruturas como os ossos da coluna vertebral, que devem ter maior flexibilidade do que ossos longos, [41] a natureza fornece a vantagem de espaços vazios para alcançar um diferente tipo de resistência, a maior habilidade de deformação sem ruptura. A habilidade para suportar cargas grandes é sacrificada em favor de uma maior habilidade para deformação, ou seja, cargas máximas suportadas são menores do que em ossos tubulares, mas a habilidade de absorver energia pela mudança no comprimento sem quebrar é maior.

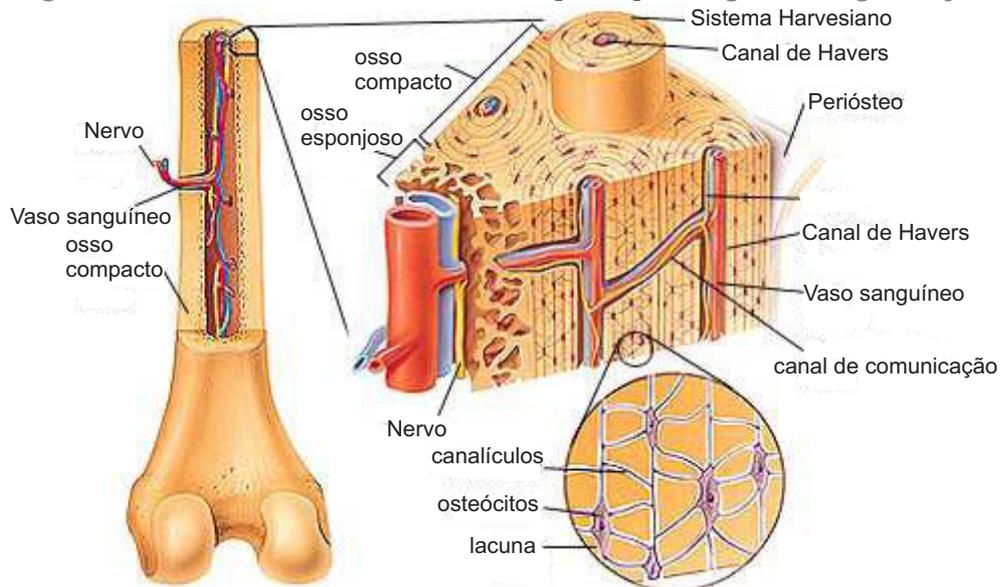
No entendimento das funções ósseas e do comportamento rígido e ao mesmo tempo flexível do osso, é importante conhecermos sua composição e estrutura. São os materiais constituintes do osso, como colágeno, a matriz óssea, osteoclastos, osteoblastos e osteócitos e a forma como eles se organizam, os responsáveis pelas funções desempenhadas pelos ossos [42].

## A.1 Estrutura e composição do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. É um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular calcificado, a matriz óssea, tornando o tecido ósseo mais rígido e mais flexível que a cartilagem. As

células presentes no tecido ósseo são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz; os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos.

Figura 36: Estrutura do osso com suas principais regiões e organização.



Fonte: <http://dc151.4shared.com/doc/ZaymMgbO/preview.html>.

Como não existe difusão de substâncias através da matriz óssea calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende de canalículos que existem na matriz. O tecido ósseo é altamente vascularizado, ele é extensamente penetrado por capilares sanguíneos, que se tornam incorporados durante seu desenvolvimento como está representado na figura 36, que mostra os canais vasculares que nutrem as células ósseas. Isso possibilita a passagem de nutrientes e permitem a comunicação dos osteócitos com seus vizinhos, com a superfície externa e interna do osso e com os canais vasculares da matriz. Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o periosteo e o endosteo, respectivamente.

### A.1.1 Matriz óssea

A Matriz óssea é constituída por uma parte inorgânica, que representa cerca de 50% do peso da matriz óssea e uma parte orgânica. Os íons, presentes na parte inorgânica, são

principalmente o fosfato e cálcio, mas também há bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. O cálcio e o fósforo formam cristais que estudos de difração de raio X mostraram ter a estrutura da HAP, com a seguinte composição:  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Esses cristais se arranjam ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa. Os íons da superfície do cristal de HAP são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal, a capa de hidratação, cuja função é facilitar a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial.

A parte orgânica é formada por fibras colágenas constituídas por colágeno do tipo I e por pequenas quantidades de substância fundamental amorfa que contém agregados de proteoglicanas e glicoproteínas. A associação de HAP com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência característica do tecido ósseo.

### A.1.2 Células presentes nos ossos

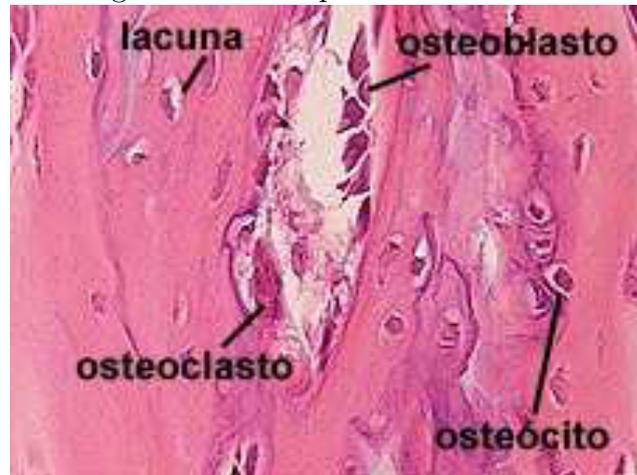
A figura 37 mostra os principais tipos celulares presentes nos ossos. As células que sintetizam e secretam os constituintes orgânicos da matriz óssea são chamadas de osteoblastos. Cada uma delas apresenta projeções citoplasmáticas que tocam os osteoblastos vizinhos. Ao secretar a matriz extracelular ao seu redor, os osteoblastos vão ficando confinados às pequenas câmaras que eles mesmos produziram, das quais partem canais que contém as projeções citoplasmáticas. Quando a célula óssea amadurece, seus prolongamentos citoplasmáticos se retraem, de maneira que ela passa a ocupar apenas a lacuna central, sendo então denominada osteócitos.

Os osteócitos é o tipo de célula mais abundante no osso. Há aproximadamente dez vezes mais osteócitos do que osteoblastos no osso humano adulto, e o número de osteoclastos são apenas uma fração da quantidade de osteoblastos. Os osteócitos possuem uma localização muito particular no osso, ao invés de estar sobre a superfície, encontra-se regularmente espaçados por toda a matriz mineralizada. Porém, eles devem manter contato com outras células e com a superfície óssea para ter acesso a oxigênio e nutrientes. Para esse fim, os osteócitos maduros possuem forma de estrela e ocupam lacunas dos quais partem projeções citoplasmáticas em todas as direções. Essas projeções avançam via pequenos canais, canalículos, e colocam em contato osteócitos vizinhos. A morfologia de estrela e a necessidade de estabilizar essa rede celular são características intrínsecas dos osteócitos [43].

A apoptose dos osteócitos, provavelmente, é um dos primeiros eventos de sinalização necessários à remodelação óssea. In vivo, a apoptose ocorre dentro de três dias de imobilização e é seguido dentro de duas semanas por osteoclastogênese. Ou seja, de alguma

forma há uma sinalização resultante da morte dos osteócitos que desencadeia o processo de remodelagem, porém esse sinal permanece desconhecido [2].

Figura 37: Principais células ósseas.



Fonte:<http://rededetecidos.blogspot.com.br/2013/04/tecido-osseo>.

Além dos osteoblastos e dos osteócitos, o tecido ósseo possui outras células importantes, os osteoclastos, originados da fusão de células mononucleares denominadas de pré-osteoclastos. Os osteoclastos são, portanto, células gigantes e multinucleadas (podem ter de 6 a 50 núcleos) que se movem nas superfícies ósseas e destroem áreas lesadas ou envelhecidas do osso, abrindo caminho para sua regeneração pelos osteoblastos. As células pré-osteoclásticas apresentaram menor atividade de reabsorção do que os osteoclastos. Logo, os osteoclastos são células multinucleadas diferenciadas especializadas na reabsorção óssea [3]. Alguns osteoclastos se acomodam em recessos, conhecidos como lacunas de Howship ou lacunas de reabsorção, que eles erodiram na matriz como mostrado na figura 37.

## A.2 Processo de modelagem e remodelagem do tecido ósseo

A modelagem (construção) óssea é o processo pelo qual o osso é formado por osteoblastos sem reabsorção óssea anterior. Este processo é vigoroso durante a fase de crescimento do indivíduo e produz mudanças na forma e tamanho do osso. Na remodelagem (reconstrução) óssea, por sua vez, o osso é primeiro reabsorvido por osteoclastos e então formado na mesma localização por osteoblastos e ocorre por toda a vida. Essas células formam

a unidade básica metabólica que reconstrói o osso em localizações distintas sobre os três componentes de seu envelope interno (endóstio) e externo (perióstio). O osso desenvolve pequenos danos durante o dia a dia, mas o mecanismo de reconstrução é capaz de detectá-los, removendo a parte danificada por "ossos novos".

A modelagem e remodelagem óssea fornecem força para o suporte de cargas e leveza para a mobilidade por meio de duas formas: (i) por estrategicamente depositar massa óssea em localizações onde é necessário modificar o tamanho e a forma do osso, e (ii) por remover massa óssea de onde não é necessário o acúmulo da mesma. A enorme capacidade desta maquinaria celular em modificar a estrutura durante o crescimento é observada nas diferenças morfológicas entre o braço de um jogador de tênis e um indivíduo que não joga tênis. A modelagem e remodelagem modificam o tamanho, forma e distribuição de massa óssea do úmero do braço do jogador sem mudar sua massa. Entretanto, esta habilidade é limitada devido à mudanças na remodelagem relacionada com o avanço da idade.

O papel da modelagem e remodelagem óssea no crescimento consiste em otimizar a resistência e minimizar a massa, de modo a produzir um osso forte, porém leve o suficiente para possibilitar a movimentação. Isso pode ser alcançado graças à mudanças na forma do osso que gera uma modificação na distribuição espacial de sua massa. Acredita-se que variações nos ossos de diferentes indivíduos esteja relacionado, além de fatores externos como a prática de esportes, à fatores genéticos, que influenciam, principalmente, até a puberdade, onde a taxa de crescimento é maior.

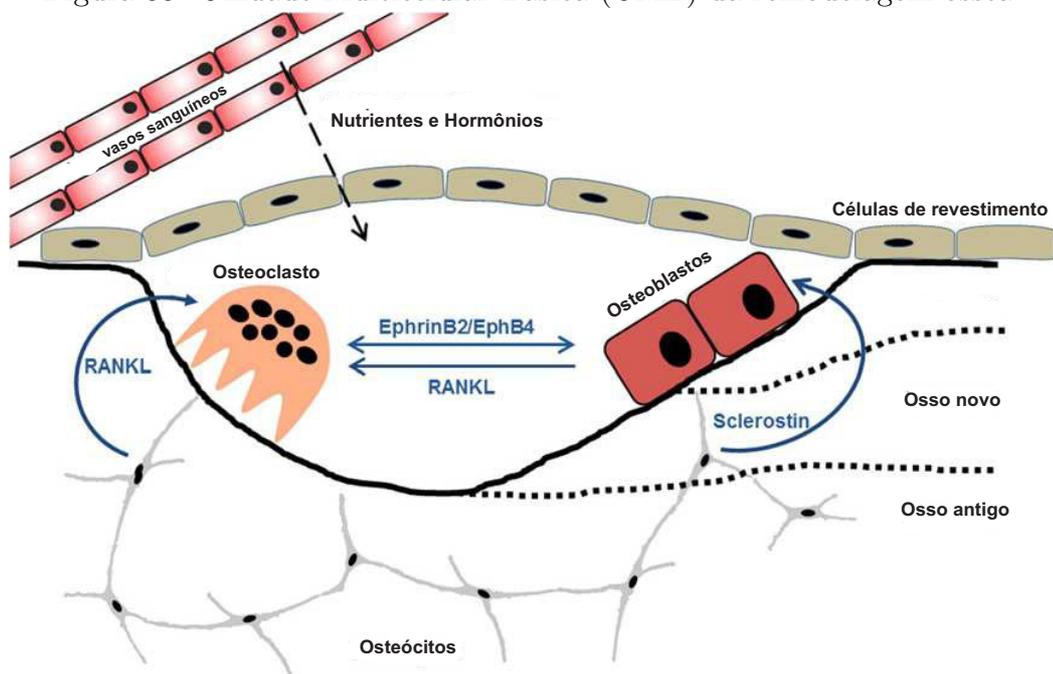
Na idade adulta, o papel da modelagem e remodelagem óssea consiste na manutenção da força do osso pela remoção de massa óssea defeituosa. A reabsorção óssea não é má para o osso ao menos que ele torne-se excessivo e não direcional. Este processo depende da produção normal, trabalho e tempo de vida de osteoclastos e osteoblastos, as duas principais células participantes da reconstrução óssea.

A remodelagem óssea ocorre a partir da ação sincronizada de um grupo funcional de células nomeado de Unidade Multicelular Básica (UMB). O UMB, representado na figura 38, consiste nos osteoclastos, reabsorvendo o osso, osteoblastos, formando osso, os osteócitos dentro da matriz óssea, as células ósseas de revestimentos, cobrindo a superfície óssea, e os vasos sanguíneos fornecendo nutrientes e oxigênio às células. O ciclo de remodelagem inicia-se com a fase de iniciação que inclui o recrutamento de osteoclastos precursores, sua diferenciação em osteoclastos maduros bem como a ativação e manutenção da reabsorção óssea. Um período inverso então permite que a formação de osso osteoclástico seja inibida e os osteoclastos sofrem apoptose enquanto os osteoblastos são recrutados e começam a diferencia-se. A fase reversa é a transição entre a atividade dos osteoclastos e a atividade

dos osteoblastos. Este estágio final, a fase de terminação, é mais longa, pois a formação do osso é mais lenta do que a reabsorção. Todo o processo dura cerca de duzentos dias, sendo cento e cinquenta, apenas para a formação óssea.

A osteoclastogênese requer fatores que regulam a diferenciação, fusão e ativação de osteoclastos precursores na formação dos osteoclastos maduros. Dentre tais fatores, os principais são: o fator de estimulação-colônia de macrófagos (M-CSF) e o RANKL. O primeiro é responsável pelo amadurecimento de macrófagos em osteoclastos e o segundo, pela ativação dos osteoclastos na reabsorção óssea.

Figura 38: Unidade Multicelular Básica (UMB) da remodelagem óssea.



Fonte: Adaptada de [41].

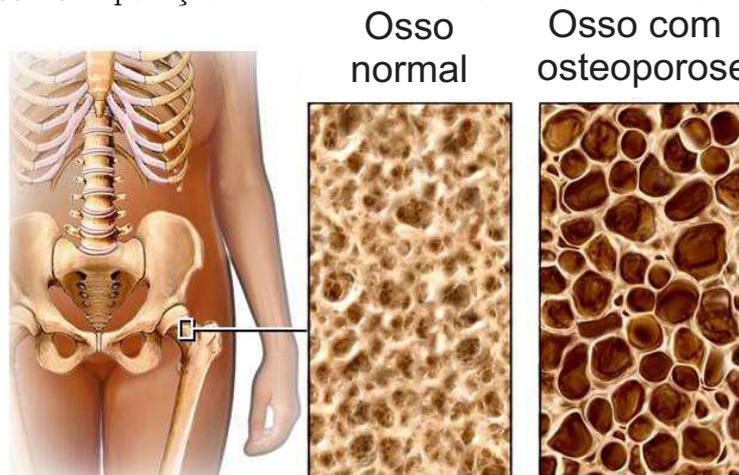
### A.3 Disfunções ósseas

Desordens ósseas podem ocorrer devido a uma grande variedade de razões. Enquanto alguns podem nascer com doenças ósseas, como resultado de genes defeituosos ou erros inatos do metabolismo, algumas pessoas podem desenvolver doenças ósseas degenerativas. Dentre as doenças do tecido ósseo, as mais comuns são: Osteoporose, Doença de Paget e Raquitismo.

### A.3.1 Osteoporose

A osteoporose é caracterizada pelo enfraquecimento do osso, devido a perda de densidade mineral óssea, aumentando o risco de fraturas em um indivíduo portador desta disfunção. A osteoporose ocorre principalmente em homens e mulheres idosas, pois a medida que o indivíduo envelhece a mineralização dos ossos não ocorre da maneira correta, uma vez que, a taxa de reabsorção torna-se maior que a taxa de formação óssea, o que origina espaços ociosos no interior dos ossos, tornando-os frágeis e quebradiços [44,45]. Não muito comum, a osteoporose pode ocorrer em homens e mulheres de qualquer idade e raça que apresentam os fatores de riscos tais como: dieta pobre em cálcio e vitamina D, cigarros, alcoolismo, sedentarismo, dentre outros. A forma mais comum da doença é a osteoporose pós menopausa, que ocorre em mulheres após a menopausa devido a redução do hormônio estrógeno.

Figura 39: Comparação entre o osso normal e o osso com osteoporose



Fonte: <http://www.sambemat.com.br/news/osteoporose/>.

No Brasil dez milhões de pessoas, aproximadamente uma em cada dezessete, sofrem da doença. E um em cada três pacientes com fraturas no quadril são diagnosticadas como portadora de osteoporose, além disso, desses pacientes portadores, somente uma em cada cinco pessoas recebe qualquer tipo de tratamento. As mulheres tem 50% de chance de sofrer uma fratura relacionada à osteoporose após os cinquenta anos de idade, e o risco de uma segunda fratura aumenta substancialmente após a primeira ocorrência.

A osteoporose é considerada uma doença silenciosa porque geralmente ela é assintomática até ocorrer uma fratura e forem feitos testes de diagnóstico. A medida mais

comumente usada para diagnosticar osteoporose e prever riscos de fraturas é a densidade mineral óssea (BMD). Diferentes técnicas tem sido desenvolvidas para permitir o acesso do BMD em múltiplas partes do esqueleto. A Organização Mundial da Saúde selecionou medidas de BMD como critérios para o diagnóstico de osteoporose. Alguns testes em ossos fornecem como resultados um score-T e um score-Z, que são apresentados como um desvio padrão a partir de um banco de dados populacional. O score-T compara o BMD de pacientes com o BMD de pessoas jovens saudáveis de mesmo sexo, enquanto o score-Z inclui idade e etnia [45].

A osteoporose é uma doença que pode ser evitada e há numerosas terapias de prevenção e tratamento que vão desde mudanças no estilo de vida, passando pelo consumo de vitaminas e sais minerais até o uso de medicamentos. Modificações no estilo de vida são intervenções mais fáceis e podem ser seguramente recomendada à maioria dos pacientes. Essas modificações consistem em reduzir os fatores de risco e pode ser iniciado com o aumento da ingestão de vitamina D e cálcio, a realização de exercícios físicos, parar de fumar e reduzir o consumo de álcool.

Em que concerne ao tratamento, o uso de medicamentos é indicado juntamente com as recomendações já citadas na prevenção, pois os fatores de risco ainda existem e podem agravar o estado da doença se não evitados. Dentre alguns medicamentos utilizados tem-se [7]:

- Bifosfonatos: os medicamentos nessa classe atuam inibindo a atividade dos osteoclastos e reduzindo a taxa de reabsorção óssea. São os medicamentos mais comumente utilizados na prevenção e tratamento da osteoporose, e são considerados a primeira linha de terapia para o tratamento de mulheres pós menopausa. Há vários tipos de bifosfonatos disponíveis, tais como: O alendronato e risedronato, que podem ser ministrados diariamente, semanalmente ou mensalmente, sozinhos ou juntos com vitamina D; O ibandronato, ministrado diariamente ou mensalmente, ou ainda em injeções trimestrais; e o zoledronato ministrado apenas uma vez ao ano. Mais detalhes sobre as propriedades estruturais e químicas dos bifosfonatos além do mecanismo de ação sobre os osteoclastos podem ser vistos no apêndice B.
- Estrógeno (Terapia hormonal): Por um longo tempo, a terapia com reposição de estrógeno foi o tratamento padrão para mulheres pós menopausa. Há efeitos positivos na saúde do osso, porém, há muitos efeitos colaterais como por exemplo infarto do miocárdio e trombose. Atualmente, existem opções de tratamento com menos riscos e por isso, os riscos e benefícios devem ser considerados antes do início do

tratamento. A Organização Mundial da Saúde sugere que a terapia a base de estrógeno seja reservada para pacientes incapazes de submeter-se a outras terapias sem estrógeno.

- Calcitonin: É um hormônio polipeptídeo sintético criado a partir da calcitonina de salmão, que é mais potente do que a calcitonina humana. A calcitonin deve ser reservada para pacientes que não podem submeter-se ao tratamento com estrógeno e mulheres com pelo menos cinco anos de menopausa. Ela pode ser ministrada na forma de spray nasal e injeções intramuscular ou subcutânea. Desde que há a possibilidade de reação alérgica, testes de dosagem devem ser necessário.

### A.3.2 Doença de Paget

A doença de Paget é uma desordem de natureza local devido ao crescimento anormal de osteoclastos mediadores da reabsorção óssea. Ela raramente se apresenta antes dos 35 anos e é prevalente em 2% a 5% da população acima de 50 anos, tornando a desordem esquelética mais comum depois da osteoporose [46]. Os principais sintomas, quando presentes, são dores ósseas e deformidades. Esses ossos deformados ou anormal pode colidir com os nervos e causar dor. Coluna vertebral, crânio, ossos da coxa, clavícula, úmero e os ossos da região pélvica são comumente afetados por esta condição [47, 48].

### A.3.3 Raquitismo

O raquitismo é uma doença óssea metabólica clássica causada pela deficiência de fósforo ou vitamina D, mas também pode ter natureza genética, que afeta principalmente crianças [49]. Ela se caracteriza por comprometer as funções de suporte mecânico e reserva mineral do esqueleto. Amolecimento dos ossos é o sintoma característico desta doença e, portanto, os indivíduos afetados tornam-se suscetíveis a fraturas. Ossos podem entortar ou quebrar facilmente. Dor nos músculos e ossos também podem ser experimentados. [50].

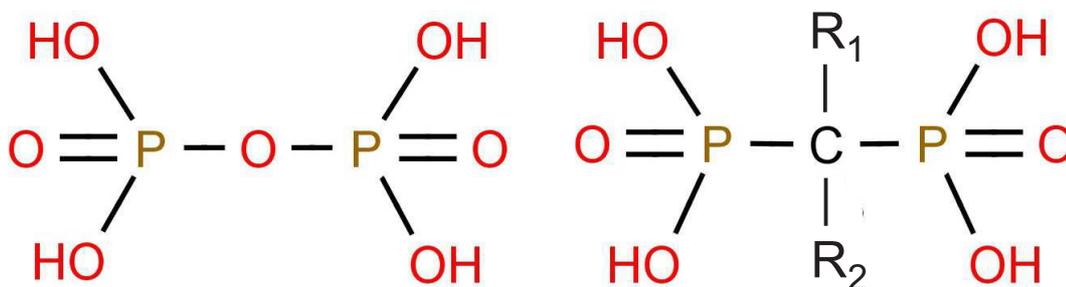
---

## APÊNDICE B – Bifosfonatos

---

Em 1960, Fleisch e colaboradores encontraram que a urina e o plasma contêm substâncias que podem inibir a precipitação do fosfato de cálcio e que parte desta atividade é devido a pirofosfatos (PPi) inorgânicos [12,51]. Estes possuem uma alta afinidade com cristais de cálcio, prejudicam sua formação e precipitação *in vitro*, e inibem a calcificação *in vivo*, mas quando dado oralmente é rapidamente metabolizado pelo organismo. Uma pesquisa para análogos dos pirofosfatos inorgânicos que mostrariam as mesmas atividades físico-químicas, mas resistiriam à hidrólise levou a identificação dos BPs. Nos BPs, cuja fórmula geral está representada na Fig.40, o átomo de oxigênio que liga os dois átomos de fósforos em pirofosfatos é substituído pelo carbono, o que confere resistência à degradação biológica.

Figura 40: Estruturas químicas do pirofosfato (à esquerda) e bifosfonato (à direita).



Fonte: Criada pelo autor.

Como resultado eles não são convertidos em metabólitos no organismo e são excretados inalterados [13]. Entretanto, além de inibir o crescimento e dissolução de cristais de cálcio, eles também diminuem a reabsorção óssea. Devido a estas propriedades, os bifosfonatos são a maior classe de drogas usadas no tratamento de doenças caracterizadas pelo aumento na reabsorção óssea, tais como, osteoporose [9,13]. Um dos BPs mais utilizados atualmente é o alendronato [17]. Vários outros BPs (clodronato, minodronato, pamidronato, olpadronato, neridronato e tiludronato) estão sendo estudados ou usados em alguns países em vários estágios na história de desenvolvimento dessas drogas.

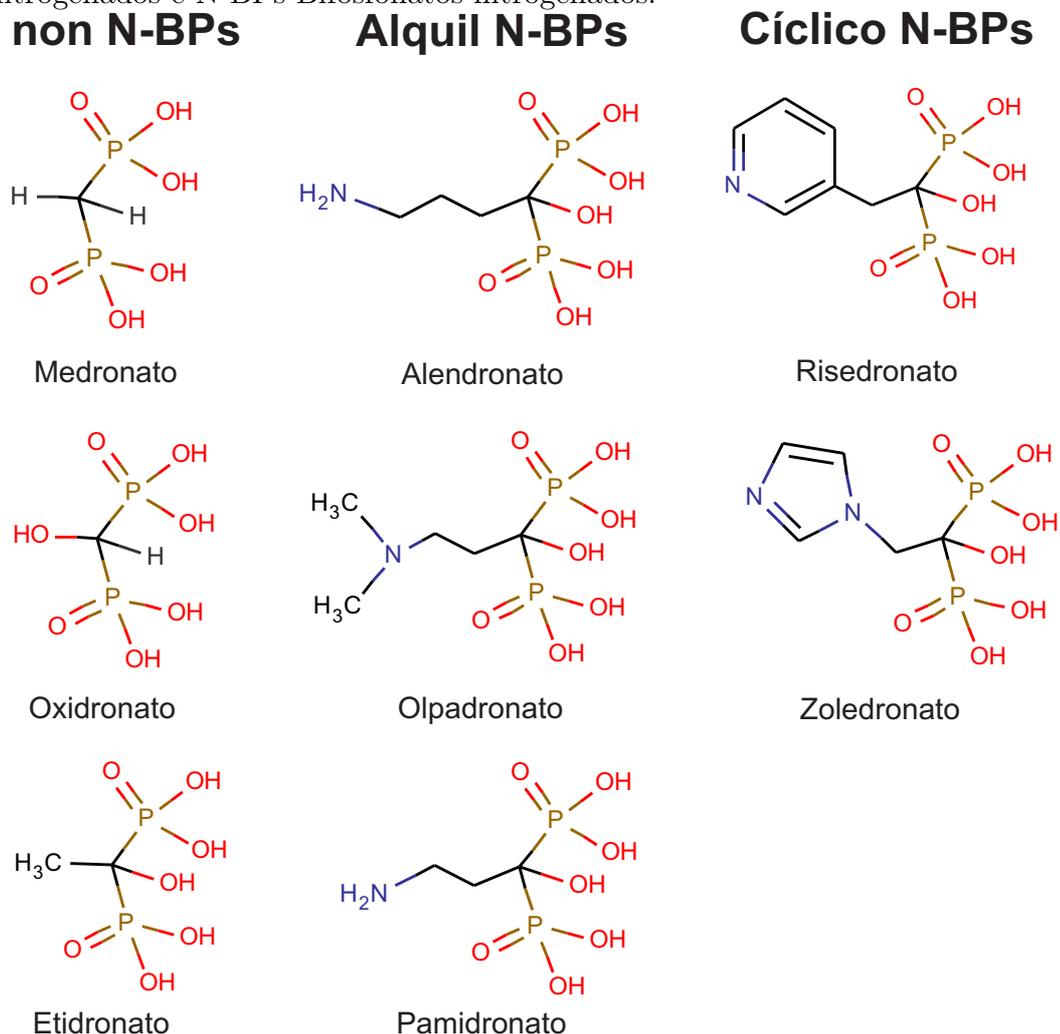
## B.1 Propriedades químicas dos bifosfonatos

Os BPs são análogos estáveis dos pirofosfatos inorgânicos. Essa estabilidade é conferida pelo átomo de carbono que substitui o átomo de oxigênio nos pirofosfatos que liga os dois grupamentos fosfatos. Isto garante aos BPs resistência à degradação biológica [12]. Os dois grupos fosfatos tem uma função dual. Eles são necessários tanto para realizar a ligação com o osso como na atividade de antireabsorção mediada por células. Modificações em um ou ambos os grupamentos fosfatos podem reduzir a afinidade do BP ao osso bem como reduzir sua potência bioquímica. As cadeias laterais  $R_1$  e  $R_2$  (Fig.40) são responsáveis pela variação na atividade observada entre os BPs. Os substituintes  $R_1$ , tais como a hidroxila ou grupamento amina, aumentam a quimissorção ao mineral, pois ocorre coordenação do cálcio presente na HAP, enquanto variando os substituintes  $R_2$ , ocorre diferenças na potência de antireabsorção de várias ordens de magnitude. Muitos BPs com a cadeia lateral  $R_2$  contendo nitrogênio numa cadeia acíclica ou cíclica apresentam uma capacidade de antireabsorção maior do que BPs não nitrogenados. Esse aumento observado com diferentes grupos  $R_2$  está relacionado à habilidade de afetar a atividade bioquímica como por exemplo a inibição da enzima Farnesyl Pyrophosphate Synthase (FPPS) [13]. Em vários experimentos feitos com BPs, geralmente o grupo  $R_1$  foi mantido constante enquanto o substituinte  $R_2$  foi alterado, mas o oposto foi raramente examinado [12]. Isto foi feito para três BPs usados clinicamente (etidronato, pamidronato e olpadronato) substituindo o grupo OH pelo grupo  $NH_2$ . Os análogos gerados mostraram uma afinidade ao tecido ósseo muito semelhante aos BPs contendo o OH, porém, apresentaram bastantes diferenças em sua capacidade de reduzir a reabsorção óssea. Essas observações mostraram que a molécula de BP como um todo é importante para sua ação na reabsorção óssea.

## B.2 Classificação dos bifosfonatos

Os BPs são classificados quanto à sua estrutura e ao seu mecanismo de ação. Os BPs não nitrogenados (non-BPs) atuam incorporando-se ao Trifosfato de adenosina (ATP), enquanto os BPs nitrogenados (N-BPs de cadeia aberta e cadeia fechada atuam inibindo a FPPS [17]. A figura 41 mostra alguns BPs de acordo com sua classificação.

Figura 41: Classificação dos BPs quanto ao seu modo de ação: non-BPs (Bifosfonatos não nitrogenados e N-BPs Bifosfonatos nitrogenados).



Fonte: Criada pelo autor.

## B.3 Adsorção dos bifosfonatos sobre a hidroxiapatita

### B.3.1 Geometria espacial dos bifosfonatos

Alguns estudos sobre a afinidade [24, 30] dos BPs com a hidroxiapatita mostraram que pequenas diferenças na estrutura dos BPs levam à grandes mudanças na afinidade com o osso. Essas diferenças se relacionam à geometria da molécula, principalmente nos N-BPs, cuja orientação do átomo de nitrogênio pode exercer um importante papel na afinidade de ligação com a superfície óssea. Por meio de estudos de modelagem computacional da interação de moléculas de BPs com a hidroxiapatita, verificou-se que os N-BPs após coordenarem o  $Ca^{2+}$  podem adquirir uma conformação tal que favorece a formação de

ligações de hidrogênio do tipo N-H-O sobre a HAP. Essas ligações podem ser formadas em dois sítios sobre a HAP e requerem um ângulo N-H-O maior ou igual a  $125^\circ$  e uma distância N-O de aproximadamente  $3 \text{ \AA}$ . O alendronato, por exemplo, é capaz de formar uma ligação N-H-O ( $132^\circ$ ,  $2,7 \text{ \AA}$ ) enquanto o risedronato apresenta somente uma atração eletrostática fraca entre hidroxila e HAP ( $102^\circ$ ,  $3 \text{ \AA}$ ) e o zoledronato, por sua vez, realiza duas ligações de hidrogênio com a HAP. Isso explica o porquê do alendronato ter uma afinidade com a HAP maior que o risedronato, porém, menor que o zoledronato [17].

### B.3.2 Potencial Zeta

Os BPs exibem diferentes cargas elétricas sobre o átomo de nitrogênio no grupo  $R_2$  em pH 7,4. Essas cargas podem ser importantes para explicar suas propriedades farmacológicas, incluindo seus efeitos sobre a HAP. Quando os BPs ligam-se a HAP, o nitrogênio confere uma carga à superfície mineral resultando numa mudança no potencial zeta. Uma explicação para essas diferenças é que BPs carregados positivamente (alendronato, ibandronato e zoledronato) criam uma superfície óssea carregada mais positivamente e por isso podem atrair mais BPs a ligar-se à superfície óssea via porção dos BPs carregados negativamente. BPs menos positivos (risedronato, por exemplo) leva a uma superfície óssea mais negativa, que pode limitar o acúmulo de BPs e, portanto, diminuir a capacidade de ligação sobre a HAP. Dessa forma, o potencial é uma propriedade independente que não se correlaciona diretamente com a afinidade, mas com a capacidade de ligação [13]. Este fenômeno também explica por que o alendronato e risedronato podem ser usados em doses clinicamente semelhantes. Mesmo que o alendronato tenha uma menor potência bioquímica sobre a inibição da FPPS do que o risedronato, a alta afinidade e capacidade de ligação do alendronato sobre a HAP pode compensar sua menor potência sobre a FPPS em osteoclastos.

## B.4 Mecanismo de ação

A captação preferencial de BPs no esqueleto, por adsorção à superfície mineral no osso, os colocam próximos à osteoclastos e provavelmente alguns osteócitos, mas evita a exposição prolongada a outros tipos de células [52]. Durante a reabsorção óssea, realizada por osteoclastos, o pH ácido na lacuna de reabsorção permite a liberação do BP da superfície mineral do osso, seguido por absorção do BP para o interior dos osteoclastos por endocitose. Essas células são as únicas capazes de acidificar a superfície óssea permitindo

uma absorção de uma quantidade substancial dessas drogas *in vivo* [53,54].

#### B.4.1 Mecanismo de ação de bifosfonatos não nitrogenados

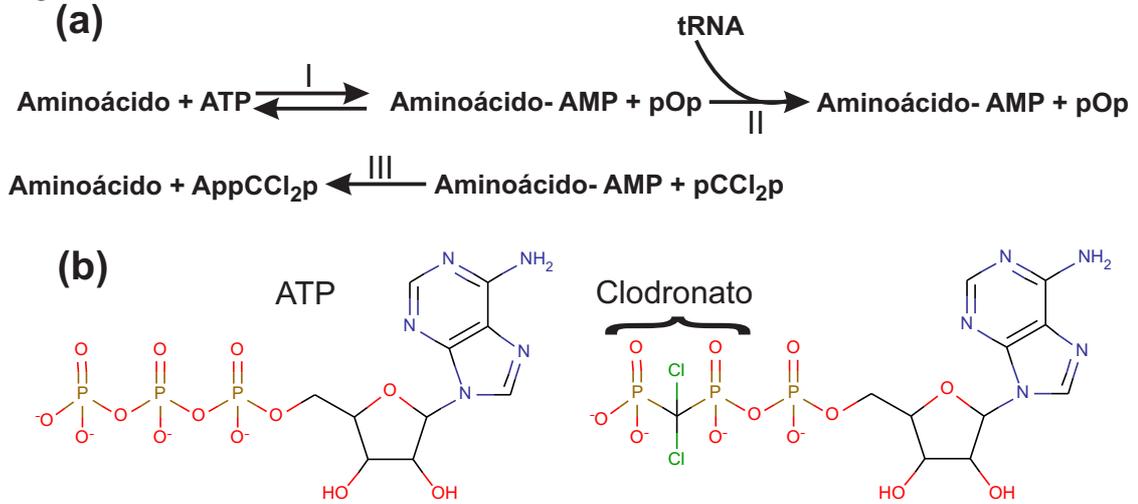
Um avanço no entendimento, a nível molecular, de como os BPs não nitrogenados afetam os osteoclastos iniciou-se em 1989 através de observações utilizando o medronato em culturas de *Dictyostelium amoebae* [55]. Tais observações sugeriram que o medronato seria metabolicamente incorporado ao metileno contendo análogos de ATP e Tetrafosfato de Diadenosina ( $Ap_4A$ ). O metabólito análogo do ATP, ou seja,  $AppCH_2p$ , contém a fração (P-C-P) do medronato substituindo a fração (P-O-P) presente no  $PPi$   $\beta$  e  $\gamma$  do ATP. Como resultado o  $AppCH_2p$  é resistente à quebra hidrolítica e liberação de fosfato. Em seguida, foi observado que BPs análogos simples, como etidronato e clodronato também eram metabolizados pela *Dictyostelium amoebae*. A incorporação de BPs simples em nucleotídeos análogos é ocasionada por membros da família de classe tipo II aminoacyl-tRNA synthetases. Os BPs simples são semelhantes o suficiente ao  $PPi$  para serem acomodados no sítio ativo da enzima no lugar do  $PPi$ . Isto permitiu uma reação inversa envolvendo a condensação de um BP com o Monofosfato de adenosina (AMP) para formar um metabólito análogo do ATP ( $AppCp$ ) como representado pelas equações químicas na Figura 42. Os metabólitos do tipo  $AppCp$  acumulam-se em altas concentrações no citosol dos osteoclastos. Devido a natureza não hidrolítica dos análogos do ATP, seu acúmulo intracelular inibe várias enzimas metabólicas intracelulares, tendo portanto um efeito prejudicial sobre as funções celulares, induzindo a apoptose [15].

#### B.4.2 Mecanismo de ação de bifosfonatos nitrogenados

Os N-BPs são muito mais potentes que os BPs não nitrogenados, mas não são metabolizados à análogos do ATP [57], possuindo um caminho de ação diferente, o caminho do mevalonato, mas que leva a inibição da reabsorção óssea [58]. O caminho metabólico do mevalonato representado na figura 43 é uma importante via metabólica que fornece células com moléculas bioativas essenciais. Esta via converte mevalonato em esteroides isoprenóides, como o colesterol, e em várias moléculas hidrofóbicas isoprenóides não esteroides [56]. Ela inicia-se com a síntese de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a partir do Acetil-CoA e Acetoacetil-CoA.

A enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR) catalisa a conversão de HMG-CoA à ácido mevalônico. A mevalonato kinase (MK), a segunda enzima essen-

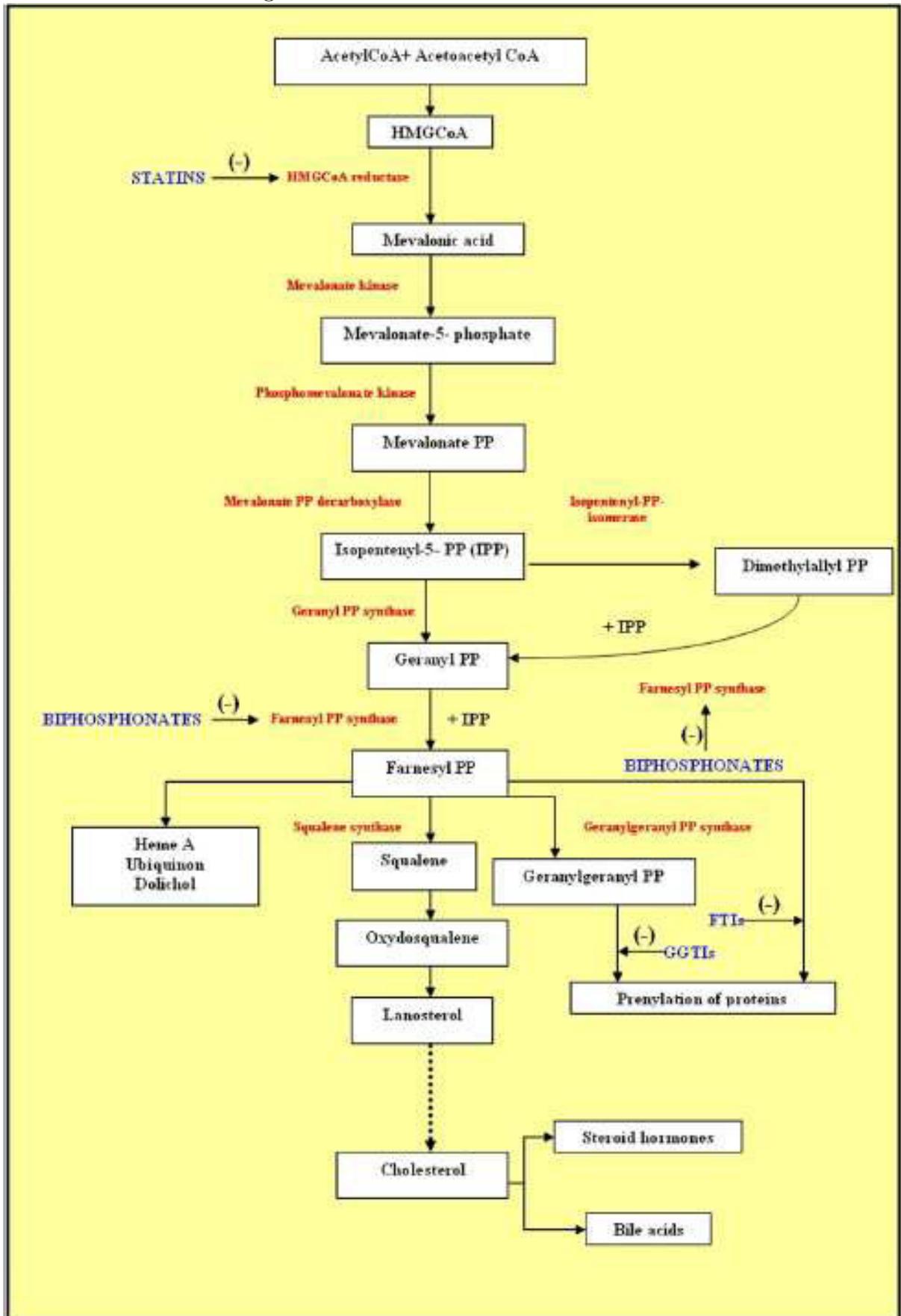
Figura 42: (a) Mecanismo de ação dos non-BPs. (b) Estrutura do ATP e metabólitos análogos do ATP



Fonte: Adaptada de [56].

cial nessa biossíntese, após a HMGR, catalisa a fosforilação do ácido mevalônico em mevalonato-5-fosfato. Na próxima etapa, a enzima Fosfomevalonato Kinase (PMK) converte mevalonato-5-fosfato e ATP em mevalonato-5-difosfato e Difosfato de adenosina (ADP). A etapa seguinte consiste numa descarboxilação realizada pela enzima mevalonato-5-pirofosfato descarboxilase, formando isopentilil-5-PP (IPP). Este pode sofrer um processo de isomerização formando o Dimetilalil-PP sob a ação da enzima isopentilil-PP isomerase e em seguida formar Geranyl-PP ou chegar a este diretamente sob a ação da enzima Geranyl-PP sintase. Agora são produzidos farnesil difosfato (FPP) e geranylgeranyl difosfato (GGPP), lipídios isoprenóides utilizados na produção de uma variedade de metabólitos, tais como o dolicol e ubiquinona, mas também necessários na prenilação de proteínas. As enzimas responsáveis pela produção de FPP e GGPP são a FPPS e a geranylgeranyl PP sintase (GGPPS) respectivamente. A farnesiltransferase e a geranylgeranyltransferase são duas enzimas que executam o processo de prenilação na célula. A prenilação de GTPases, proteínas importantes na biossíntese de proteínas, controle de diferenciação celular e transporte de vesículas dentro da célula, com FPP e GGPP é necessária para realização de suas funções corretamente. As GTPases prenilatadas, tais como as famílias Ras, Rho, Rac e Rab, regulam uma variedade de processos celulares importantes para os osteoclastos como o arranjo do citoesqueleto e o tráfico de vesículas intracelulares, além da apoptose. Os N-BPs atuam inibindo a FPPS e conseqüentemente não ocorre a produção de FPP e GPP, substratos para a prenilação, e dessa forma as

Figura 43: Caminho metabólico do mevalonato



Fonte: Adaptada de [59].

GTPases não são prenilatadas. A FPPS é, portanto, o principal alvo farmacológico dos N-BPs. Porém a inibição de reabsorção óssea pelos N-BPs não é sempre associado com sinais de toxicidade celular ou um decréscimo no número de osteoclastos, exceto em altas concentrações de N-BPs. O tratamento com N-BPs pode levar a formação de osteoclastos “gigantes” identificados histologicamente como células hipernucleadas que são geralmente detectadas na superfície óssea ou associadas com a lacuna de reabsorção [15, 59–61].

---

## APÊNDICE C – Fundamentos Teóricos

---

### C.1 Mecânica Quântica

Na mecânica quântica, a equação fundamental que descreve os estado de um sistema dinâmico é a equação de Schrodinger, dada por:

$$i\hbar \frac{\partial \Psi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \hat{H} \Psi(\mathbf{r}, t), \quad (\text{C.1})$$

onde  $\Psi(\mathbf{r}, t)$  é a função de onda total, dependente das coordenadas de espaço e tempo para todas as partículas presentes no sistema. E  $H$  é o hamiltoniano, que contém todas as contribuições de energia envolvidas. Para problemas com potenciais independentes do tempo, podemos separar as variáveis espaciais e temporal na seguinte solução:

$$\Psi(\mathbf{r}, t) = \psi(\mathbf{r}) \exp\left(-i \frac{Et}{\hbar}\right), \quad (\text{C.2})$$

que nos leva a equação de Schrodinger independente do tempo

$$\hat{H}\psi(\mathbf{r}) = E\psi(\mathbf{r}). \quad (\text{C.3})$$

### C.2 O Hamiltoniano Eletrônico

O hamiltoniano eletrônico para um sistema de  $N$  elétrons e  $M$  núcleos, que são localizados pelos vetores posição  $r_i$  e  $R_I$ , respectivamente. Em unidades atômicas, é dado por:

$$\begin{aligned} \hat{H} = & -\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 + \sum_i^N \sum_{j=j+1}^N \frac{1}{|r_i - r_j|} - \frac{1}{2} \sum_I^M \frac{\nabla_I^2}{M_I} \\ & + \sum_I^M \sum_{J=J+1}^M \frac{Z_I Z_J}{|R_I - R_J|} - \sum_i^N \sum_I^M \frac{Z_I}{|r_i - R_I|} \end{aligned} \quad (\text{C.4})$$

Na Eq. (C.4),  $M_I$  é a razão da massa do núcleo pela massa do elétron e  $Z_I$  é o número atômico do núcleo  $I$ . Os operadores laplacianos  $\nabla_i^2$  e  $\nabla_I^2$  envolvem a diferenciação com

respeito as coordenadas do elétron  $i$  e do núcleo  $I$ . O sistema de coordenadas moleculares é mostrado na figura 44.

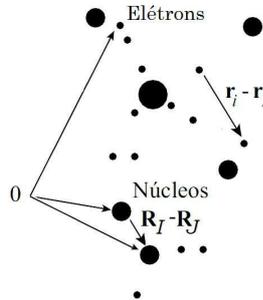


Figura 44: Sistema de coordenada molecular:  $i, j$  = eletrons;  $I, J$  = núcleos.

Podemos escrever o hamiltoniano como a soma de diversos termos:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{V}_{e-e} + \hat{T}_N + \hat{V}_{N-N} + \hat{V}_{e-N}, \quad (\text{C.5})$$

onde:

$$\begin{aligned} \hat{T}_e &= -\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 \rightarrow \text{Energia cinética dos elétrons,} \\ \hat{V}_{e-e} &= \sum_i^N \sum_{j=j+1}^N \frac{1}{|r_i - r_j|} \rightarrow \text{Repulsão coulombiana entre os elétrons,} \\ \hat{T}_N &= -\frac{1}{2} \sum_I^M \frac{\nabla_I^2}{M_I} \rightarrow \text{Energia cinética dos núcleos,} \\ \hat{V}_{N-N} &= \sum_I^M \sum_{J=J+1}^M \frac{Z_I Z_J}{|R_I - R_J|} \rightarrow \text{Repulsão coulombiana entre os núcleos,} \\ \hat{V}_{e-N} &= -\sum_i^N \sum_I^M \frac{Z_I}{|r_i - R_I|} \rightarrow \text{Atração coulombiana entre os elétrons e os núcleos.} \end{aligned}$$

Desejamos encontrar a solução completa para o sistema acoplado de núcleos e elétrons. Utilizando o hamiltoniano da Eq. (C.4) na Eq. (C.3), teremos:

$$\hat{H}\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (\text{C.6})$$

onde evidenciamos as coordenadas espaciais dos elétrons ( $\mathbf{r}$ ) e dos núcleos ( $\mathbf{R}$ ). Porém, é impossível resolvermos analiticamente este problema de muitos corpos. Então descreveremos a seguir os métodos aproximativos que tornam possível a solução dessa equação.

### C.3 Aproximação de Born-Oppenheimer

O primeiro passo, para se tratar de problemas envolvendo moléculas e cristais, é separar o movimento eletrônico do nuclear. A justificativa física é devido a grande diferença entre as massas dos elétrons e dos núcleos. Portanto, é factível imaginar uma movimentação eletrônica muito mais rápida que a nuclear. Dentro dessa aproximação, a contribuição da energia cinética dos núcleos dada na Eq. (C.5),  $T_N$ , é muito menor que os outros termos, assim:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + V_{e-e} + \hat{T}_N + V_{N-N} + V_{e-N} \rightarrow \hat{H}_T = \hat{T}_e + V_{e-e} + \hat{T}_N + V_{N-N}, \quad (\text{C.7})$$

ou seja, o hamiltoniano total  $H_T$  pode ser reescrito como

$$\hat{H}_T = \hat{H}_e + V_{N-N}, \quad (\text{C.8})$$

onde

$$\hat{H}_e = \hat{T}_e + V_{N-e} + V_{e-e}, \quad (\text{C.9})$$

é denominado hamiltoniano eletrônico.

Uma das propriedades do  $H_e$  é que

$$[\hat{H}_e, \mathbf{R}] = 0, \quad (\text{C.10})$$

isto é, os autovalores do hamiltoniano eletrônico podem ser determinados para particulares posições nucleares, isto é,

$$\hat{H}_e \chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R}) = \varepsilon_m(\mathbf{R}) \chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R}), \quad (\text{C.11})$$

sendo que,  $\chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R})$  é a função de estado eletrônico e  $\varepsilon_m(\mathbf{R})$  a respectiva energia eletrônica.

Considerando os núcleos fixos, a repulsão nuclear presente na Eq. (C.8) é constante e a energia total  $E_m$ , autovalor de  $H_T$ , será dada por:

$$E_m(R) = \varepsilon_m + \sum_I^M \sum_{J=J+1}^M \frac{Z_I Z_J}{|R_I - R_J|}. \quad (\text{C.12})$$

A energia total  $E_m$  é uma função que constitui o potencial para o movimento nuclear. A figura 45, abaixo, ilustra o comportamento típico de  $E_m(\mathbf{R})$  para uma molécula diatômica, onde  $\mathbf{R}_0$  é a distância de equilíbrio e  $E_m(\mathbf{R}_0)$  é a energia de ligação.

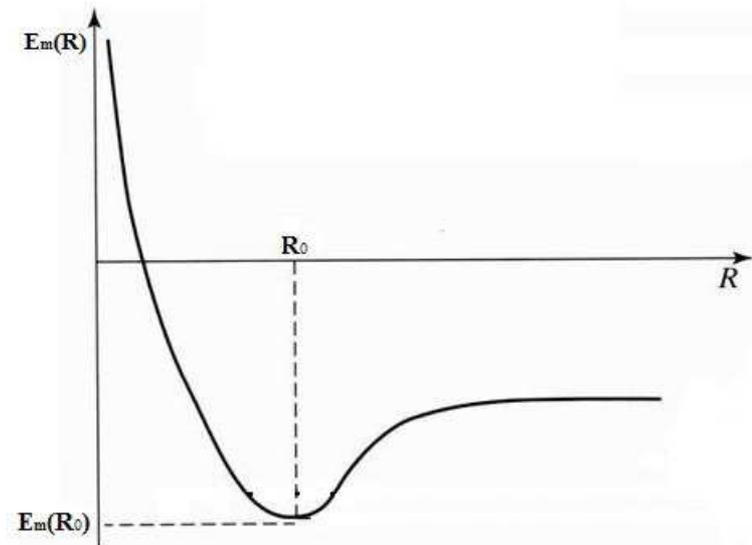


Figura 45: Curva de potencial para um estado eletrônico  $m$  de um sistema diatômico.

Para moléculas poliatômicas a curva de potencial se torna uma hipersuperfície multidimensional. Então, na aproximação de Born-Oppenheimer, o núcleo se move em uma superfície de energia potencial obtida pela resolução do problema eletrônico.

De acordo com a Eq. (C.11), o estado eletrônico e a respectiva energia dependem parametricamente de  $\mathbf{R}$ . Assim é possível expandir, usando o conjunto completo de autofunções de  $H_e$ , a função de estado completa sob a forma:

$$\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \sum_m \phi_m(\mathbf{R}) \chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R}), \quad (\text{C.13})$$

com  $\phi_m$  sendo os coeficientes da expressão dependentes explicitamente de  $\mathbf{R}$ .

Para encontrar as equações que esses coeficientes devem satisfazer, inserimos a Eq. (C.13) na Eq. (C.3) e conhecendo a Eq. (C.11), obtêm-se:

$$\sum_m [\hat{T}_N + (E_m(\mathbf{R}) - E)] (\phi_m(\mathbf{R}) \chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R})) = 0. \quad (\text{C.14})$$

Após realizar as devidas modificações no primeiro termo da equação acima<sup>1</sup>, multiplica-se tudo por  $\chi_m^*(\mathbf{r}|\mathbf{R})$  e integra-se em todas as coordenadas eletrônicas. Teremos que

<sup>1</sup> $\nabla^2(AB) = (\nabla^2 A)B + 2\nabla A \nabla B + (\nabla^2 B)A$

$$-\frac{1}{2} \sum_I \frac{\nabla_I^2}{M_I} \phi_n(\mathbf{R}) + [E_n(\mathbf{R}) - E] \phi_n(\mathbf{R}) = \sum_m C_{nm}(\mathbf{R}, \nabla_I) \phi_m(\mathbf{R}), \quad (\text{C.15})$$

onde  $C_{nm}(\mathbf{R}, \nabla_I) = \sum_I \frac{1}{M_I} [A_{nm}^{(I)} \nabla_I + B_{nm}^{(I)}]$ , com:

$$A_{nm}^{(I)} = \int \chi_n^* (\nabla_I \chi_m) d^3r, \quad (\text{C.16})$$

$$B_{nm}^{(I)} = \frac{1}{2} \int \chi_n^* (\nabla_I^2 \chi_m) d^3r. \quad (\text{C.17})$$

Os  $C_{nm}$  são termos que acoplam diferentes estados eletrônicos e sua análise permite determinar as condições de validade da aproximação Born-Oppenheimer.

Reagrupando os termos da Eq. (C.15), obtemos

$$\left[ -\frac{1}{2} \sum_I \frac{\nabla_I^2}{M_I} + E_n(\mathbf{R}) \right] \phi_n(\mathbf{R}) = E \phi_n(\mathbf{R}) + \sum_m C_{nm}(\mathbf{R}, \nabla_I) \phi_m(\mathbf{R}), \quad (\text{C.18})$$

Usando a aproximação adiabática vamos considerar que todos os elementos fora da diagonal principal de  $C_{nm}$  (termos não adiabáticos) são nulos. O que nos permite reescrever a Eq. (C.13) como

$$\psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \phi_n(\mathbf{R}) \chi_n(\mathbf{r}|\mathbf{R}), \quad (\text{C.19})$$

que reflete a separação da função de onda em uma parte eletrônica e outra nuclear.

A teoria de Born-Oppenheimer considera que todos os elementos de  $C_{nm}$  são nulos, restando assim da Eq. (C.18):

$$\left[ -\frac{1}{2} \sum_I \frac{\nabla_I^2}{M_I} + E_n(\mathbf{R}) \right] \phi_n(\mathbf{R}) = E \phi_n(\mathbf{R}). \quad (\text{C.20})$$

ou

$$\hat{H}_N \phi_n(\mathbf{R}) = E \phi_n(\mathbf{R}). \quad (\text{C.21})$$

onde:

$$\hat{H}_N = \left[ -\frac{1}{2} \sum_I \frac{\nabla_I^2}{M_I} + E_n(\mathbf{R}) \right] \rightarrow \text{Representa o hamiltoniano nuclear.}$$

Assim, o movimento nuclear ocorre em um potencial efetivo que é a energia eletrônica  $E_n(\mathbf{R})$  dada pela (Eq. (C.12)).

Resumindo, a aproximação de Born-Oppenheimer tem como consequência a separação da equação de Schrodinger em uma equação eletrônica e uma equação nuclear dadas por

$$[\hat{T}_e + \hat{V}_{e-e} + \hat{T}_N + \hat{V}_{N-N}]\chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R}) = E_m(\mathbf{R})\chi_m(\mathbf{r}|\mathbf{R}) \quad (\text{C.22})$$

e

$$[\hat{T}_N + E_m(\mathbf{R})]\phi_n(\mathbf{R}) = E\phi_n(\mathbf{R}), \quad (\text{C.23})$$

respectivamente. Portanto, essa aproximação é valida sempre que o acoplamento entre diferentes estados eletrônicos for fraco ( $C_{nm} \approx 0$ ). Ou seja, quando a (Eq. (C.19)) não é verificada, a aproximação de Born-Oppenheimer se torna inválida.

A partir de agora, nos concentraremos em resolver apenas o problema eletrônico. Deixaremos de lado o índice "e" para indicar o hamiltoniano eletrônico e o denotaremos apenas de  $\hat{H}$ , assim como a função de onda eletrônica total que será descrita por  $\Psi$ .

## C.4 Orbitais e Determinante de Slater

### C.4.1 Orbitais espaciais e orbitais de spin

A teoria do orbital molecular pressupõe a existência de uma função de estado para cada elétron e a combinação linear destas, forma a função de estado total dos N elétrons. Seja  $\psi_i(\mathbf{r}) = \psi_i(x, y, z)$  a função orbital espacial, onde x,y,z representam as coordenadas eletrônicas. De maneira geral, assume-se que esses orbitais são ortonormais e formam um conjunto completo. Para que isso seja verdade, deveria haver um número infinito dessas funções, entretanto, na prática existe apenas um conjunto finito de orbitais  $\{\psi_i | i = 1, 2, 3 \dots k\}$ , que satisfazem essa condição de ortonormalidade. De fato, temos uma limitação na exatidão dos resultados a uma determinada região do espaço completo.

Para uma completa descrição do elétron, é necessário especificar o spin. O conjunto completo que descreve o spin consiste de duas funções ortonormais  $\alpha$  e  $\beta$ , isto é, spin para cima ( $\uparrow$ ) e spin para baixo ( $\downarrow$ ), respectivamente. A função de onda que descreve a distribuição espacial e o spin de um elétron é chamada de spin-orbital molecular, definido por:

$$\chi(\mathbf{x}) = \begin{cases} \psi(\mathbf{r})\alpha(\omega) \\ \psi(\mathbf{r})\beta(\omega), \end{cases} \quad (\text{C.24})$$

onde  $\mathbf{x} = [x, y, z, \omega]$ , indica tanto as coordenadas de espaço quanto as de spin.

Dado um conjunto de  $k$  orbitais espaciais, nos teremos um conjunto de  $2k$  spin-orbitais, da forma:

$$\left. \begin{aligned} \chi_{2i-1}(\mathbf{x}) &= \psi_i(\mathbf{r})\alpha(\omega) \\ \chi_{2i}(\mathbf{x}) &= \psi_i(\mathbf{r})\beta(\omega), \end{aligned} \right\} i = 1, 2, \dots, k \quad (\text{C.25})$$

Se os orbitais espaciais são ortonormais, os spin-orbitais moleculares também são:

$$\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (\text{C.26})$$

## C.4.2 Produto Hartree

Nos vimos que uma função orbital spin descreve um único elétron de maneira apropriada, vamos agora considerar a função de onda para o caso de  $N$  elétrons. Iniciaremos nosso estudo considerando o caso hipotético de  $N$  elétrons que não interagem entre si, com hamiltoniano dado da seguinte forma:

$$\hat{H} = \sum_{i=1}^N h(\hat{i}), \quad (\text{C.27})$$

onde  $h(\hat{i})$  é o operador que descreve a energia cinética e potencial para o elétron  $i$ .

As funções spin-orbital molecular satisfazem a equação de autovalor para o hamiltoniano  $h(\hat{i})$ :

$$\hat{h}(i)\chi_j(\mathbf{x}_i) = \varepsilon_j(x_i)\chi_j(\mathbf{x}_i) \quad (\text{C.28})$$

Nosso objetivo é encontrar as autofunções correspondentes para o hamiltoniano total  $H$ . Como este operador é soma dos hamiltonianos de um elétron, a função de onda total deve ser o produto das funções de onda de cada elétron. Assim teremos:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = \chi_i(\mathbf{x}_1)\chi_j(\mathbf{x}_2) \cdots \chi_k(\mathbf{x}_n), \quad (\text{C.29})$$

tal função de onda multieletrônica é denominada produto de Hartree. O autovalor  $E$ , é simplesmente a soma das energias de cada orbital-spin  $E = \varepsilon_1 + \varepsilon_2 + \cdots + \varepsilon_k$ .

O produto de Hartree é não correlacionado pois

$$|\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N)|^2 d\mathbf{x}_1 \cdots d\mathbf{x}_N, \quad (\text{C.30})$$

é a probabilidade de encontrarmos o elétron 1 no volume  $d\mathbf{x}_1$  centrado em  $\mathbf{x}_1$ , que é a mesma de encontrarmos o elétron 2 no volume  $d\mathbf{x}_2$  centrado em  $\mathbf{x}_2$  e assim por diante. Substituindo o produto de Hartree, Eq. (C.29), na expressão acima, teremos o produto

das probabilidades

$$|\chi_i(\mathbf{x}_1)|^2 dx_1 |\chi_j(\mathbf{x}_2)|^2 dx_2 \cdots |\chi_k(\mathbf{x}_N)|^2 dx_N. \quad (\text{C.31})$$

Dessa forma, a probabilidade de encontrarmos o elétron 1 em um dado ponto do espaço independe da posição do elétron 2, quando usamos o produto de Hartree como função de onda. Entretanto isso não é verdade, uma vez que estas partículas são instantaneamente repelidas por interação colombiana. Assim fica claro que o movimento dos elétrons é explicitamente correlacionado.

O produto de Hartree, escrito na Eq. (C.29), assume que os elétrons são independentes. Além de descrever um estado específico para cada elétron, considerando desta forma que as partículas são distinguíveis. Contudo, isso é algo impossível de ser observado pela mecânica quântica.

### C.4.3 Determinante de Slater

A função de onda descrita pelo produto de Hartree não é fisicamente aceitável, pois não satisfaz as condições de anti simetria com respeito a permuta de quaisquer dois elétrons. Portanto, sempre que lidarmos com um sistema de elétrons independentes, consideramos isto apenas de maneira clássica, mas na prática eles devem estar sujeitos a um campo médio resultante das interações uns com os outros. Ao considerarmos funções de onda anti-simétricas estamos a incluir essa correlação quântica.

A função de onda de um sistema de  $N$  elétrons será a sobreposição de todas as possíveis permutações de pares de elétrons, com a condição de que em cada troca de dois elétrons a função de onda muda de sinal, isto é:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_N) = -\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_N), \quad (\text{C.32})$$

Uma função de onda anti-simétrica pode ser construída por meio do determinante de Slater, que é da forma

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\mathbf{x}_1) & \chi_1(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_1(\mathbf{x}_N) \\ \chi_2(\mathbf{x}_1) & \chi_2(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_2(\mathbf{x}_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_N(\mathbf{x}_1) & \chi_N(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_N(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (\text{C.33})$$

O fator  $(N!)^{-1/2}$  é o fator de normalização.

## C.5 Teoria do Funcional Densidade

A teoria do funcional densidade foi desenvolvida na década de 60 e procura resolver o problema multieletrônico. Utilizando não a ideia de função de onda, mas o conceito de densidade eletrônica. Uma vez que a função de onda para um sistema de  $N$  elétrons depende de  $4N$  coordenadas ( $x, y, z$  e de spin para cada elétron), a densidade eletrônica depende apenas de três. Desta forma reduz-se o número de variáveis de integração e consequentemente o custo computacional. Isso acarreta em várias vantagens para o método, quando comparado aos tradicionais cálculos *ab initio*.

### C.5.1 Densidade Eletrônica

As cargas negativas se acomodam em um espaço tridimensional ao redor de átomos e moléculas. A distribuição eletrônica no espaço real é uma grandeza física observável conhecida como densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$ . Em termos da mecânica quântica, para um sistema multieletrônico contendo  $N$  elétrons, teremos:

$$\rho(\mathbf{r}) = \langle \psi | \sum_{i=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) | \psi \rangle = N \int \cdots \int |\psi(\mathbf{r}, \mathbf{r}_2, \cdots, \mathbf{r}_n)|^2 d\mathbf{r}_2 \cdots d\mathbf{r}_N, \quad (\text{C.34})$$

que determina a probabilidade de encontrarmos qualquer um dos  $N$  elétrons dentro do elemento de volume  $dr$ .

### C.5.2 Teoremas de Hohenberg-Kohn

As bases da teoria do funcional densidade estão nos dois teoremas propostos por Hohenberg-Kohn em 1964.

**1º Teorema:** O potencial externo  $v(\mathbf{r})$  sentido pelos elétrons é um funcional único de densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$ .

**Prova:** Para um sistema de  $N$ -elétrons o operador hamiltoniano é

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{U} + \hat{V}, \quad (\text{C.35})$$

onde:

- $\hat{T}$  → Representa a energia cinética de todos os elétrons,  
 $\hat{U}$  → Representa a energia de interação elétron-elétron ,  
 $\hat{V}$  → Representa o potencial externo.

Admitindo-se uma função de onda  $\psi_0$  para o estado fundamental, a energia correspondente será dada por  $E_0 = \langle \psi_0 | \hat{H} | \psi_0 \rangle$ . O potencial externo,  $\hat{V}$ , é o que caracteriza o hamiltoniano e em sistemas moleculares normalmente é representado pela soma das interações dos núcleos de carga  $Z_I$ , ou seja,

$$\hat{V} = - \sum_i^N \sum_I^M \frac{Z_I}{|r_i - R_I|} = \sum_{i=1}^N v(\mathbf{r}_i). \quad (\text{C.36})$$

Utilizando a Eq. (C.34) podemos explicita-lo como um funcional de densidade eletrônica, da forma:

$$\langle \psi_0 | \hat{V} | \psi_0 \rangle = \int \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d^3r. \quad (\text{C.37})$$

A prova deste teorema é realizada reduzindo nossas equações a um absurdo. Vamos admitir outro estado fundamental  $\psi'_0$  associado a um potencial externo  $\hat{V}'$ , com  $\hat{V}' \neq \hat{V}$ . Partiremos da hipótese que diferentes potenciais  $v(\mathbf{r})$  e  $v'(\mathbf{r})$  levam até a mesma densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$ , ou seja,

$$\langle \psi'_0 | \hat{V}' | \psi'_0 \rangle = \int \rho(\mathbf{r}) v'(\mathbf{r}) d^3r. \quad (\text{C.38})$$

Utilizando o teorema variacional para a energia do estado fundamental  $E_0$ :

$$E_0 = \langle \psi_0 | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} | \psi_0 \rangle < \langle \psi'_0 | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} | \psi'_0 \rangle, \quad (\text{C.39})$$

ou

$$E_0 < \langle \psi'_0 | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V} + \hat{V}' - \hat{V}' | \psi'_0 \rangle \quad (\text{C.40})$$

$$E_0 < \langle \psi'_0 | \hat{T} + \hat{U} + \hat{V}' | \psi'_0 \rangle + \langle \psi'_0 | \hat{V} - \hat{V}' | \psi'_0 \rangle \quad (\text{C.41})$$

$$E_0 < E'_0 + \int [v(\mathbf{r}) - v'(\mathbf{r})] \rho(\mathbf{r}) d^3r. \quad (\text{C.42})$$

Se repetirmos todo o procedimento acima para  $E'_0$ , encontraremos expressões semelhantes, de tal forma que:

$$E'_0 < E_0 + \int [v'(\mathbf{r}) - v(\mathbf{r})] \rho(\mathbf{r}) d^3r, \quad (\text{C.43})$$

somando a equação acima com a Eq. (C.42), obtemos

$$E + E' < E' + E, \quad (\text{C.44})$$

ou seja, um absurdo. O 1º teorema nos garante que diferentes potenciais não podem gerar a mesma densidade  $\rho(\mathbf{r})$  e que existe relação de unicidade entre a função de onda do estado fundamental e a densidade eletrônica correspondente. De maneira prática é possível caracterizar um observável físico designado pelo operador  $\hat{O}$  por meio da densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$

$$O = \langle \psi | \hat{O} | \psi \rangle = O[\rho(\mathbf{r})]. \quad (\text{C.45})$$

**2º Teorema:** A energia do estado fundamental  $E_0[\rho]$  pode ser obtida variacionalmente: a densidade eletrônica que minimiza a energia total é a densidade exata do estado fundamental  $\rho(\mathbf{r})$ .

**Prova:** Vamos admitir a existência de uma densidade tentativa  $\rho'(\mathbf{r})$  para o problema de interesse com hamiltoniano  $\hat{H}$ . O que caracteriza este operador é o potencial externo, portanto, podemos separar a energia total em uma parte característica do sistema a ser tratado e uma parte que é comum a todos os sistemas, ou seja:

$$E[\rho'] = \langle \psi' | \hat{T} + \hat{U} | \psi' \rangle + \langle \psi' | \hat{V} | \psi' \rangle \quad (\text{C.46})$$

ou

$$E[\rho'] = F[\rho'] + \int \rho'(\mathbf{r})v(\mathbf{r}), \quad (\text{C.47})$$

onde  $F[\rho]$  é um funcional universal válido para todo sistema coulombiano.

O princípio variacional assegura que

$$\langle \psi' | \hat{T} + \hat{U} | \psi' \rangle + \langle \psi' | \hat{V} | \psi' \rangle > \langle \psi_0 | \hat{T} + \hat{U} | \psi_0 \rangle + \langle \psi_0 | \hat{V} | \psi_0 \rangle \quad (\text{C.48})$$

onde  $\psi_0$  é a função de onda do estado fundamental, gerada por uma densidade eletrônica correspondente  $\rho(\mathbf{r})$ . Enquanto  $\psi'$  é uma função de onda não estacionária que é determinada por  $\rho'$ . Então, a Eq. (C.48) fica

$$F[\rho'] + \int \rho'(\mathbf{r})v(\mathbf{r}) > F[\rho] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r}), \quad (\text{C.49})$$

ou

$$E[\rho'] > E_0[\rho]. \quad (\text{C.50})$$

Com a prova dos dois teoremas de Hohenberg-Khon assegura-se que todas as pro-

priedades de um sistema definido por um potencial externo  $v(\mathbf{r})$  são determinados pela densidade do estado fundamental. Ao fixarmos a relação unívoca entre o potencial externo e a função  $\rho$  asseguramos tratar de problemas não degenerados e a densidade eletrônica é dita  $v$ -representável. Seguindo essa condição, o funcional de energia total atinge seu mínimo se somente se a densidade tentativa  $\rho'$  é igual a densidade exata do estado fundamental. A questão que surge é se podemos estender a teoria para problemas com estados degenerados e se qualquer função  $\rho'$  poderá então ser usada. Levy (1982) e Lieb (1983) mostraram que existe funções  $\rho'$  fisicamente inadequadas por não representarem densidades de estados fundamentais para nenhum  $v(\mathbf{r})$ .

### C.5.3 A pesquisa restrita de Levy e Lieb

Dado um conjunto de funções antissimétricas  $\psi$  que produzam a mesma densidade eletrônica  $\rho^e(\mathbf{r})$ . Para qualquer função de onda a energia total é escrita como:

$$E[\psi] = \langle \psi | \hat{T} | \psi \rangle + \langle \psi | \hat{U} | \psi \rangle + \int v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}. \quad (\text{C.51})$$

O objetivo é obter um funcional definido para qualquer densidade  $\rho^e(\mathbf{r})$  derivável de uma função de onda  $\psi$  para  $N$  elétrons. Tal característica é conhecida como N-representatividade. Podemos assegurar isso se:

$$\rho'(\mathbf{r}) \geq 0; \quad \int \rho'(\mathbf{r})d\mathbf{r} = N; \quad \int |\nabla \rho'(\mathbf{r})^{1/2}|^2 d\mathbf{r} = \infty. \quad (\text{C.52})$$

Minimizando a energia dada pela Eq. (C.51), de tal forma que a densidade seja N-representável, teremos:

$$E[\psi] = \underbrace{\min_{\psi \rightarrow \rho^e(\mathbf{r})} [\langle \psi | \hat{T} + \hat{U} | \psi \rangle]}_{F[\rho^e(\mathbf{r})]} + \int v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}, \quad (\text{C.53})$$

onde  $F[\rho^e(\mathbf{r})]$  é o funcional densidade de Levy-Lieb.

A pesquisa é restrita porque é feita somente no conjunto de funções antissimétrica que produzem o mesmo  $\rho^e(\mathbf{r})$ , diferindo do processo de minimização que foi realizado no 2º Teorema de Hohenber-Khon. Portanto a formulação de Levy-Lieb é mais que uma reafirmação do funcional de Hhohenberg-Khon. Além disso, no formalismo de Levy-Lieb não fizemos nenhuma menção a  $v$ - representatividade da densidade eletrônica, eliminando a restrição de estados degenerados.

### C.5.4 A Formulação de Khon-Sham

Originalmente a teoria do funcional densidade propõe calcular a energia de elétrons interagentes por meio de um funcional da densidade eletrônica. Porém, os teoremas de Hohenberg-Khon não fornecem a forma exata de como é o funcional universal  $F[\rho]$ . Além de não sabermos como obter a densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$  sem primeiro determinarmos a função de onda.

Na seção passada vimos que é possível obter a energia do estado fundamental, para um sistema multieletrônico, minimizando o funcional energia

$$E[\rho] = F[\rho] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}, \quad (\text{C.54})$$

com  $F[\rho] = \langle \psi | \hat{T} + \hat{U} | \psi \rangle$ . Portanto, este funcional deve conter toda informação relativa as interações eletrostáticas e a energia cinética total dos elétrons do sistema. Entretanto, é possível separar as interações coulombianas clássica do restante de funcional,

$$F[\rho] = J[\rho] + T[\rho] + E_{ncl}[\rho], \quad (\text{C.55})$$

onde:

- $J[\rho]$  → Repulsão coulombiana clássica de todos os elétrons,
- $T[\rho]$  → Energia cinética individual,
- $E_{ncl}[\rho]$  → Energias de troca-correlação + Energia de auto-interação.

Destes termos, somente  $J[\rho]$  é conhecido e da forma:

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}', \quad (\text{C.56})$$

enquanto as formas explícitas das outras duas contribuições permanecem um mistério.

Para resolver os problema citados, Khon e Sham, em 1965, sugeriram um sistema auxiliar, onde os elétrons não interagissem. De forma geral, a função de onda para este sistema fictício difere da função de onda para um sistema real. Entretanto, admitiu-se que o problema de elétrons não interagentes fosse construído de tal maneira que a densidade eletrônica que o representa seja a mesma do sistema real. Portanto, consideremos o sistema de elétrons não-interagentes com hamiltoniano descrito pela Eq. (C.28)

$$\hat{H}^{KS} = \sum_{i=1}^N \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v^{KS}(\mathbf{r}_i) \right] = \sum_{i=1}^N \hat{h}_i^{KS}, \quad (\text{C.57})$$

onde  $v^{KS}$  refere-se a um potencial efetivo (potencial de Khon-Sham) sobre os elétrons do sistema fictício. Os resultados obtidos para tal problema (discutidos na seção C.4.3) mostram que a função de onda que descreve o comportamento de todos os elétrons desse sistema será exatamente um determinante o Slater dado pela Eq. (C.33), isto é,

$$\Psi^{KS} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1^{KS}(\mathbf{x}_1) & \chi_1^{KS}(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_1^{KS}(\mathbf{x}_N) \\ \chi_2^{KS}(\mathbf{x}_1) & \chi_2^{KS}(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_2^{KS}(\mathbf{x}_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_N^{KS}(\mathbf{x}_1) & \chi_N^{KS}(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_N^{KS}(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (\text{C.58})$$

onde  $\chi_i^{KS}$  são os orbitais de spin de Khon-Sham. E as partes espaciais,  $\psi_i^{KS}$ , de cada orbital spin, são autofunções associadas aos N autovalores do hamiltoniano eletrônico de um elétron

$$\hat{h}_i^{KS} \psi_i^{KS} = \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v^{KS}(\mathbf{r}_i) \right] \psi_i^{KS} = \varepsilon_i \psi_i^{KS}. \quad (\text{C.59})$$

Para este sistema não interagente, a energia cinética e a densidade podem ser calculadas de maneira explícita, ou seja:

$$T^{KS}[\rho] = \sum_i^N \langle \psi_i^{KS} | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \psi_i^{KS} \rangle, \quad (\text{C.60})$$

$$\rho^{KS} = \sum_i^N |\psi_i^{KS}|^2, \quad (\text{C.61})$$

a conexão deste sistema auxiliar com o real está na escolha do potencial efetivo,  $v^{KS}$ , tal que a densidade  $\rho^{KS}$  seja igual a densidade do estado fundamental do sistema de elétrons interagentes  $\rho_0$ .

Khom e Shan perceberam que não conseguiriam resolver o hamiltoniano para elétron interagentes de maneira exata. Entretanto, é possível reescrever o funcional universal de Hohenberg-Khon,  $F[\rho]$ , da seguinte forma:

$$F[\rho] = J[\rho] + T^{KS}[\rho] + E_{XC}[\rho], \quad (\text{C.62})$$

com

$$E_{XC}[\rho] = (T[\rho] - T^{KS}[\rho]) + E_{ncl} = T_R[\rho] + E_{ncl}. \quad (\text{C.63})$$

O termo acima é composto pela parte residual da energia cinética,  $T_R$ , a qual não está incluída em  $\hat{T}^{KS}$ , adicionada as contribuições eletrostáticas não clássicas. A expressão

para a energia total de acordo com a separação descrita na Eq. (C.62) é

$$E[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + T^{KS}[\rho] + E_{XC}[\rho] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}. \quad (\text{C.64})$$

Novamente, para minimizarmos o funcional de energia, a densidade  $\rho$  deve satisfazer o princípio estacionário  $\delta E[\rho] = 0$ , sujeita a condição de vínculo  $\int \rho(\mathbf{r}) - N = 0$ , ou seja,

$$\delta \left\{ \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + T^{KS}[\rho] + E_{XC}[\rho] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} - \mu \left[ \int \rho(\mathbf{r}) - N \right] \right\} = 0, \quad (\text{C.65})$$

com as devidas simplificações, obtemos:

$$\int \delta\rho(\mathbf{r}) \left\{ \frac{\delta T^{KS}[\rho]}{\delta\rho} + \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta\rho} + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v(\mathbf{r}) - \mu \right\} d\mathbf{r} = 0. \quad (\text{C.66})$$

Escrevendo a energia cinética como  $T^{KS} = -\frac{1}{2} \int \nabla^2 \rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}$  e definindo o potencial de troca-correlação como  $v_{XC}[\rho] = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta\rho}$ , substituindo em C.67, teremos:

$$\int \delta\rho(\mathbf{r}) \left\{ -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{XC}[\rho] + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v(\mathbf{r}) - \mu \right\} d\mathbf{r} = 0. \quad (\text{C.67})$$

ou

$$\int \delta\rho(\mathbf{r}) \left\{ -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef} - \mu \right\} d\mathbf{r} = 0. \quad (\text{C.68})$$

A solução da equação C.68 satisfazendo tanto a conservação dos  $N$  elétrons do sistema quanto C.61 pode ser obtida resolvendo a equação de Schrodinger de uma partícula

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ef} \right) \psi_i^{KS}(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \psi_i^{KS}(\mathbf{r}), \quad (\text{C.69})$$

comparando a equação acima com C.57, quando  $v_{ef} = v^{KS}$ , resolveremos o hamiltoniano de um elétron, cujo potencial efetivo representa a interação exata de todos os outros elétrons do sistema. Então teremos

$$\left( -\frac{1}{2} \nabla^2 + v^{KS} \right) \psi_i^{KS}(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \psi_i^{KS}(\mathbf{r}); \quad (\text{C.70})$$

$$\hat{h}^{KS} \psi_i^{KS}(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \psi_i^{KS}(\mathbf{r}), \quad (\text{C.71})$$

a expressão acima é conhecida como equação de Khon-Sham e sua solução deve ser obtida de maneira auto consistente.

---

## APÊNDICE D – Artigo com Resultados da Dissertação

---

Artigo sobre as propriedades vibracionais do alendronato de sódio trihidratado publicado na revista *Journal of RAMAN SPECTROSCOPY*. O espectro IR e RAMAN do cristal de alendronato de sódio trihidratado foi medido. Cálculos via DFT foram feitos para a molécula de alendronato em vácuo e considerando o modelo de solvatação contínua (PCM). Foi feita a comparação entre os espectros teóricos IR e RAMAN e experimentais medidos.

# Phosphate group vibrational signatures of the osteoporosis drug alendronate

João Rufino Bezerra Neto,<sup>a</sup> Pedro de Lima Neto,<sup>a</sup> Francisco Adilson Matos Sales,<sup>b</sup> Edelma Eleto da Silva,<sup>c</sup> Luiz Orlando Ladeira,<sup>d</sup> Valder Nogueira Freire<sup>b</sup> and Ewerton Wagner Santos Caetano<sup>e\*</sup>



The infrared (IR) and Raman spectra of the osteoporosis drug alendronate in the monosodium trihydrate alendronate crystal were measured. In order to interpret them, density functional theory (DFT) calculations for the solvated alendronate molecule were performed following the structural features revealed by X-ray data. A comparison between the DFT-calculated IR and Raman of the converged species and the measured spectra unveils relevant phosphate group signatures in the 400–1400 cm<sup>-1</sup> wavenumber range, especially IR absorption bands at 1015, 1049, 1067, 1131, 1177, and 1235 cm<sup>-1</sup>, which were related to CP and OP bond length stretching, and Raman lines at 449, 661, and 969 cm<sup>-1</sup>, involving phosphate scissors and bond length vibrations. A comparison with experimental data of alendronate incorporated into hydroxyapatite (HAP) indicates that, for wavenumbers below 1500 cm<sup>-1</sup>, the interaction of alendronate with HAP does not affect significantly the alendronate vibrational spectra, while for the 1600–3000 cm<sup>-1</sup> interval the interaction with HAP changes the normal mode wavenumbers by about –100 cm<sup>-1</sup>. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

**Keywords:** Infrared spectroscopy; Raman spectroscopy; alendronate; osteoporosis drug; density functional theory calculations

## Introduction

Osteoporosis is a public health concern since it causes more than 8.9 million fractures annually.<sup>[1]</sup> There is at least one lifetime osteoporosis occurrence for each three women and one lifetime osteoporosis occurrence for each five men.<sup>[2,3]</sup> Osteoporosis-related fractures and enhanced skeletal fragility are due to bone loss which causes micro-architectural changes in the trabecular and cortical skeleton.<sup>[4]</sup> Established therapies for treating this disorder consist primarily of drugs to prevent bone loss, such as the bisphosphonates (alendronate, risedronate, or zoledronate), selective oestrogen receptor modulators (raloxifene), and parathyroid hormone (teriparatide).<sup>[4]</sup> However, the currently available treatments for osteoporosis, assuming optimal compliance, only reduce the risk of non-vertebral fractures by 30–40% at best.<sup>[5–8]</sup> Besides, the gastrointestinal bisphosphonate absorption through oral administration is very low, being always less than 2.5%<sup>[9,10]</sup> and decreasing even further in the presence of food and drinks containing calcium, magnesium, or aluminum.<sup>[10]</sup>

The osteoporosis drugs bisphosphonates are synthetic analogs of the naturally occurring inorganic pyrophosphates, containing a P–C–P backbone and two phosphonic acid groups attached to the same central carbon atom. The pyrophosphate oxygen bridge is replaced by a carbon atom with two attached side chains giving rise to the bisphosphonate chemical formula (PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)-(R<sub>1</sub>)-C-(R<sub>2</sub>)-(PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), where the bridge carbon is responsible for the bone mineral affinity and the side chains R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> for their pharmacological action. The bisphosphonates are organophosphorous compounds that prevent calcification both *in vitro* and *in vivo* and inhibit the dissolution of hydroxyapatite (HAP) [Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] crystals, the principal mineral in bone.<sup>[11]</sup> The binding affinity of the

bisphosphonates for HAP is influenced mainly by the P–C–P group, which determines their bone attachment.<sup>[12]</sup> Consequently, one can probe this binding by looking for changes in the bisphosphonates vibrational spectra at the normal modes that involve the motion of the phosphate group interacting with HAP.<sup>[13–15]</sup>

In view of this, the main purpose of this work is to establish clearly the phosphate group vibrational signatures of the osteoporosis drug alendronate through IR and Raman spectra measurements of the monosodium trihydrate alendronate (MTA) crystal to interpret the vibrational spectra of alendronate bound to HAP and other similar systems, improving their physical characterization. Density functional theory (DFT)<sup>[16–18]</sup> calculations were performed for the alendronate molecule interacting with three explicit water

\* Correspondence to: Ewerton Wagner Santos Caetano, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Av. 13 de Maio 2081, Benfica 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil.  
E-mail: ewcaetano@gmail.com

a Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

b Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, 60440-900 Fortaleza, CE, Brazil

c Universidade Federal de Itajubá, 35900-373 Itajubá, MG, Brazil

d Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, 31340-550 Belo Horizonte, MG, Brazil

e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará 60040-531 Fortaleza, CE, Brazil

molecules and a sodium atom within the polarizable continuum model (PCM, see reference<sup>[19]</sup>), with the atomic coordinates of all molecular species taken into account being obtained from X-ray data for the MTA crystal (crystal-like alendronate, CLA, depicted in Fig. 1).

**F1** in Fig. 1).

## Experimental details

### Sample preparation and spectroscopy measurements

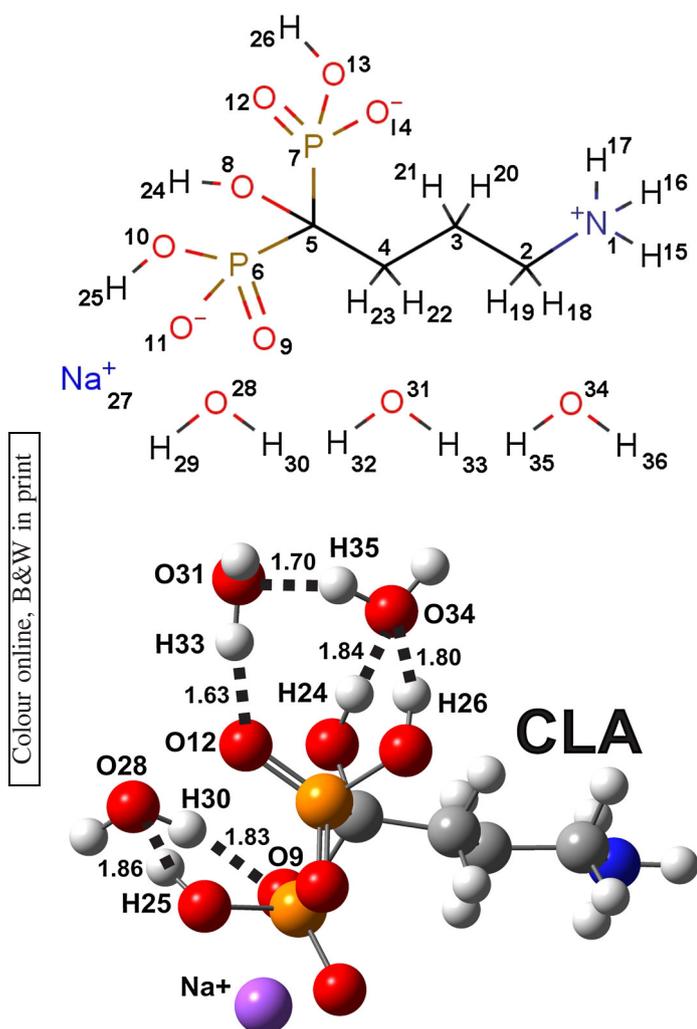
For the experimental measurements, MTA crystalline powder, title compound  $\text{NaC}_4\text{H}_{12}\text{NO}_7\text{P}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , with at least 98% purity was purchased from Sigma-Aldrich, its structure being determined through X-ray diffraction (data not presented here) to be monoclinic, with space group  $\text{P}2_1/n$   $Z=4$ . The FTIR spectra of the MTA were run on KBr pellets (120 mg, 1 wt %). The pellets were dried under vacuum in desiccators for 24 h to reduce the adsorbed water, which might induce spectral perturbations around 1630 and 3400  $\text{cm}^{-1}$ . The spectra were collected with 120 scans at a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ .

The absorption measurements were all performed with an FTLA 2000 series laboratory, ABB Bomem. Corrections were made at baseline in the spectral window from 600 to 1800  $\text{cm}^{-1}$  to allow for a better comparison with the DFT-based theoretical calculations. The FT Raman spectrum was recorded with a Bruker IFS55 EQUINOX spectrometer with Raman attachment that uses a 1064 nm Nd-YAG laser and a liquid-nitrogen cooled Ge detector line as the excitation source for recording the Raman spectrum in the 600–1800  $\text{cm}^{-1}$  region. The measurements were performed in samples inside the hemispheric bore of an aluminum sample holder. The Raman spectra were acquired through 1024 scans at a laser power of 500 mW and a Raman spectrometer resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### Computer calculations

A computer simulation using the Marvin Sketch software<sup>[20]</sup> shows that the isolated alendronate molecule at physiological pH has total charge  $-1$ . To calculate the vibrational spectra, the molecular geometry of the charged alendronate was optimized considering an isolated alendronate molecule interacting explicitly with a sodium atom and three water molecules solvated in water employing the PCM,<sup>[19]</sup> a system which mimics the alendronate environment within the sodium alendronate trihydrated (MTA) crystal<sup>[21]</sup> used in pharmaceutical formulations. Calculations were also performed for a single alendronate molecule in vacuum (VAC) and a single molecule in PCM water (PCM), with the respective vibrational spectra being presented and described in the Supporting Information (Figures S1, S2, and S3 and Table S1).

The DFT calculations were performed using the Gaussian 09 code.<sup>[22]</sup> The meta-hybrid M06-2X exchange-correlation functional<sup>[23]</sup> and the 6-311 + G(d,p) basis set were chosen to implement the computations. Local total energy minima were checked for imaginary frequencies in vibrational analysis calculations. The structural optimization was considered to be accomplished when the following convergence thresholds were satisfied: maximum force smaller than  $1.5 \times 10^{-5}$  Ha/Å, self-consistent field energy variation smaller than  $10^{-7}$  Ha, and maximum atomic displacement smaller than  $6 \times 10^{-5}$  Å. Vibrational frequencies were evaluated analytically from the second derivatives of the total energy with respect to the nuclear coordinates of the optimized structure.<sup>[24–26]</sup> Raman activities are obtained from the differentiation of dipole derivatives with respect to the electric field. Normal mode assignments and descriptions of the fundamental vibrations modes were made by applying the potential energy distribution methodology implemented in the Vibrational Energy Distribution Analysis code.<sup>[27,28]</sup>

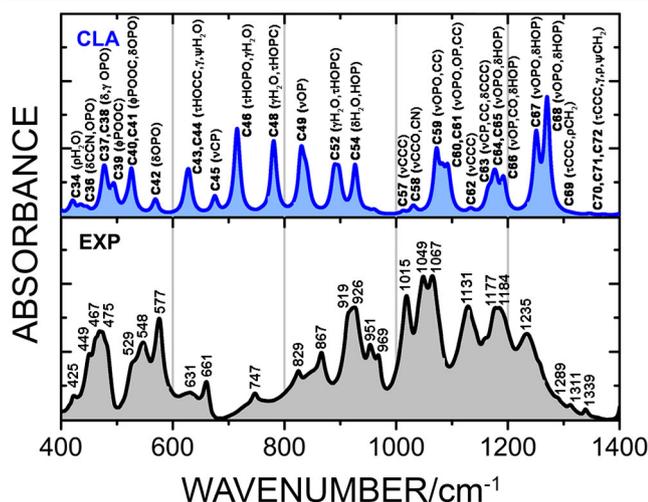


**Figure 1.** Top—Alendronate planar structure with atom labels. Three water molecules and the sodium ion interacting with alendronate in the MTA crystal<sup>[18]</sup> are also shown schematically. Bottom—CLA geometry: DFT-calculated lowest energy conformer of alendronate interacting with three water molecules and a sodium atom (purple sphere). Hydrogen bond lengths in Å are displayed as well.

## Results

### Infrared spectra

The calculation of vibrational frequencies is a difficult task, even if one uses last generation exchange-correlation functionals.<sup>[29]</sup> While B3LYP is the most cost-effective choice to obtain the vibrational frequencies, other hybrid functionals offer similar performance in very good agreement with experimental data.<sup>[30]</sup> The M06-2X exchange-correlation functional, in particular, has a mean unsigned error of 57  $\text{cm}^{-1}$  for the normal mode wavenumbers of the F38/06 database,<sup>[23]</sup> with a scaling factor of 0.982 improving this figure to 47  $\text{cm}^{-1}$ . Therefore, one should expect some discrepancy between our theoretical estimates and the experimental data for the MTA



**Figure 2.** DFT-calculated IR spectrum for a single alendronate molecule interacting with three water molecules and a sodium atom (CLA), and the measured IR spectrum of the monosodium trihydrate alendronate crystal (EXP). The symbols  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$ , and  $\psi$  stand for scissoring, stretching, torsion, rocking, out-of-plane, wagging, and twisting modes, respectively.

crystal. In our model, we have taken into account a molecular configuration with a single alendronate molecule, three water molecules, and a single sodium atom with initial positioning similar to the crystalline geometry and placed in an aqueous solvation environment modelled as a continuum. Figure 2 depicts the CLA and EXP IR spectral curves while Table 1 assigns the corresponding normal modes. Some CLA vibrations are also detailed schematically in Figure S4 of the Supporting Information. Explicit water normal modes contribute to the C34 ( $420\text{ cm}^{-1}$ , rocking motion), C43 ( $623\text{ cm}^{-1}$ , wagging), C44 ( $629\text{ cm}^{-1}$ , twisting), and C48 ( $781\text{ cm}^{-1}$ , wagging).

The strongest infrared (IR) absorption bands in the experimental data appear at  $1015$ ,  $1049$ , and  $1067\text{ cm}^{-1}$ , which can be

approximately assigned, respectively, to the C57 ( $1012\text{ cm}^{-1}$ ,  $-3\text{ cm}^{-1}$  error), C61 ( $1093\text{ cm}^{-1}$ ,  $+44\text{ cm}^{-1}$  error), and C62 ( $1134\text{ cm}^{-1}$ ,  $+67\text{ cm}^{-1}$  error) CLA IR peaks (see Table 1), with CCC, OPO, and CCO bond stretches involved. The  $919\text{ cm}^{-1}$  EXP peak is related to the C52 normal mode ( $897\text{ cm}^{-1}$ ,  $-22\text{ cm}^{-1}$  error) and corresponds to a HOPO torsion and water wagging. The C54 normal mode at  $927\text{ cm}^{-1}$ , on the other hand, is related with the experimental  $951\text{ cm}^{-1}$  maximum ( $+24\text{ cm}^{-1}$  error) and consists mainly in a scissors motion of OHO and HOP. Finally, the EXP IR maxima at  $1131$ ,  $1177$ ,  $1184$ , and  $1235\text{ cm}^{-1}$  can be related to the C63, C65, and C67 CLA vibrations, involving CP, CC, and OPO stretches and HOP scissors movements and with mean error of  $15\text{ cm}^{-1}$ . Namely, the C67 vibrational motion is depicted in Fig. S4 for the CLA wavenumber  $1250.71\text{ cm}^{-1}$  (see also the supporting material video file 1250\_IR).

The experimental peak with lowest wavenumber, at  $425\text{ cm}^{-1}$ , is related to the  $420.33\text{ cm}^{-1}$  CLA normal mode ( $-5\text{ cm}^{-1}$  error) and involves the rocking of two water molecules (see Figure S4, top left, and the 420\_IR video file). The EXP peaks at  $449$ ,  $467$ , and  $475\text{ cm}^{-1}$ , on the other hand, are related to C36, C37, and C38 involving scissoring and out-of-plane motions at the alendronate phosphate groups with mean error smaller than  $1\text{ cm}^{-1}$  (see Fig. S4, wavenumber  $475.08\text{ cm}^{-1}$  for a picture of the C37 normal mode and video file 475\_IR). The EXP absorption bands between  $529$  and  $661\text{ cm}^{-1}$  are assigned to the interval between the C40 and C45 normal modes ( $516$  to  $675\text{ cm}^{-1}$  CLA wavenumber range). Modes C39, C40, C41, C42, and C45 involve motion at the phosphate groups, while C43 has contributions from a single water molecule (oxygen atom O34) and the torsion of H24–O8–C5–C4. The EXP peak at  $661\text{ cm}^{-1}$  is correlated with the C45 peak ( $675\text{ cm}^{-1}$ , error of  $+14\text{ cm}^{-1}$ , mode shown in Figure S5,  $675.18\text{ cm}^{-1}$  vibration, 675\_RAMAN video file), while the C46 normal mode at  $715\text{ cm}^{-1}$  is assigned to the EXP peak at  $747\text{ cm}^{-1}$  (error of  $-32\text{ cm}^{-1}$ ). Moving to higher wavenumbers, the maxima at  $829$  and  $867\text{ cm}^{-1}$  in the experimental IR spectrum are assigned to C48 (water wagging

**Table 1.** Assignments of the most important Infrared and Raman modes of the measured MTA alendronate crystal spectrum in the  $200\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  range. Wavenumbers  $\omega$  are in  $\text{cm}^{-1}$ . The symbols  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$ , and  $\psi$  stand for scissoring, stretching, torsion, rocking, out-of-plane, wagging, and twisting modes, respectively

$C_n$	$\omega_{\text{CLA}}$	$\omega_{\text{EXP}}$	Assignment	$C_n$	$\omega_{\text{CLA}}$	$\omega_{\text{EXP}}$	Assignment
C19	226.38	233	$\phi\text{C4P6O8C5}$	C55	948.84	957	$\nu\text{N1C2C3}$
C23	258.78	265	$\delta\text{C2C3C4}$	C56	960.56	969	$\nu\text{N1C2}$ , $\nu\text{C3C4C5}$
C32	359.40	370	$\delta\text{P6C5O8}$ , $\rho\text{H29O28H3O}$ , $\nu\text{P6C5}$	C57	1012.61	1015	$\nu\text{C2C3C4}$ , $\nu\text{C4C5}$
C33	397.01	404	$\delta\text{O9P6O10}$ , $\delta\text{O12P7O14}$	C59	1071.9	1031	$\nu\text{S09P6O11}$ , $\nu\text{C4C3}$
C34	420.33	425	$\rho\text{H32O31H33}$ , $\rho\text{H35O34H36}$	C61	1092.8	1049	$\nu\text{O12P7O14}$ , $\nu\text{P6O11}$
C36	445.51	449	$\delta\text{N1C2C3}$ , $\delta\text{O9P6O10}$ , $\delta\text{O12P7O13}$	C62	1133.52	1067	$\nu\text{C4C5O8}$
C37	475.08	467	$\delta\text{O9P6O11}$ , $\delta\text{O13P7O14}$	C63	1164.75	1131	$\nu\text{P6C5}$ , $\nu\text{C2C3}$ , $\delta\text{C3C4C5}$
C38	479.4	475	$\gamma\text{O9P6O10}$ , $\delta\text{O12P7O14}$	C64	1174.26	1150	$\delta\text{H26O13P7}$ , $\nu\text{O12P7O14}$
C39	494.45	491	$\phi\text{P6O9O10C5}$ , $\phi\text{P7O8O12C5}$	C65	1178.98	1177	$\nu\text{O9P6O10}$ , $\delta\text{H25O10P6}$
C40	516.36	529	$\phi\text{P6O11O10C5}$ , $\phi\text{P7O8O14C5}$	C66	1192.33	1184	$\nu\text{P6O9}$ , $\nu\text{P7O12}$ , $\nu\text{C5O8}$ , $\delta\text{H25O10P6}$ , $\delta\text{H26O13P7}$
C41	526.06	539	$\phi\text{P7O13O12O14}$ , $\delta\text{O10P6O11}$	C67	1250.71	1235	$\nu\text{O12P7O14}$ , $\delta\text{H26O13P7}$
C42	568.7	548	$\delta\text{O9P6O11}$ , $\delta\text{O13P7O14}$	C68	1270.25	1265	$\nu\text{O9P6O11}$ , $\delta\text{H25O10P6}$
C43	623.49	577	$\tau\text{H24O8C5C4}$ , $\gamma\text{H35O34H36}$	C69	1285.41		$\tau\text{C2C3C4C5}$ , $\rho\text{C2H}_2$ , $\rho\text{C3H}_2$ , $\rho\text{C4H}_2$
C44	629.13	631	$\tau\text{H25O10P6C5}$ , $\psi\text{H29O28H3O}$	C70	1312.63	1289	$\tau\text{C2C3C4C5}$ , $\gamma\text{C2H}_2$ , $\gamma\text{C3H}_2$ , $\gamma\text{C4H}_2$
C45	675.18	661	$\nu\text{P6C5}$	C71	1346.8	1311	$\rho\text{C2H}_2$ , $\psi\text{C3H}_2$ , $\psi\text{C4H}_2$
C46	714.97	747	$\tau\text{H26O13P7O12}$ , $\gamma\text{H32O31H33}$	C72	1371.17	1339	$\tau\text{C2C3C4C5}$ , $\psi\text{C2H}_2$ , $\psi\text{C3H}_2$ , $\psi\text{C4H}_2$
C48	780.78	829	$\gamma\text{H29O28H3O}$ , $\tau\text{H25O10P6C5}$	C73	1398.96	1363	$\nu\text{C3C4C5}$ , $\gamma\text{C2H}_2$ , $\gamma\text{C3H}_2$ , $\gamma\text{C4H}_2$
C49	830.00	867	$\nu\text{P6O10}$ , $\nu\text{P7O13}$	C76	1470.66	1455	$\delta\text{C3H}_2$ , $\delta\text{C4H}_2$ , $\psi\text{C3H}_2$ , $\psi\text{C4H}_2$
C52	897.00	919	$\tau\text{H26O13P7O12}$ , $\gamma\text{H35O34H36}$				
C54	926.63	951	$\delta\text{O12H33O31}$ , $\delta\text{H33O12P7}$				

and torsion, see Fig. S4,  $780.78\text{ cm}^{-1}$  wavenumber, video file 780\_IR) and C49 (PO bond stretches) with errors of  $-48$  and  $-37\text{ cm}^{-1}$  in respective order.

### Raman spectra

After plotting the experimental Raman spectrum for the sodium trihydrate alendronate crystal (Fig. 3), we identified 27 prominent peaks in the  $400\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$  wavenumber interval, while the CLA spectrum was resolved into 32 Raman lines with significant activities. As many of the normal mode assignments were described previously in previous paragraphs, we limit ourselves to mention the most intense EXP Raman activities and its CLA correlated modes: the EXP peak at  $1049\text{ cm}^{-1}$  corresponds to C61,  $1031\text{ cm}^{-1}$  EXP to C59,  $1015\text{ cm}^{-1}$  EXP to C57,  $661\text{ cm}^{-1}$  EXP to C45,  $919\text{ cm}^{-1}$  EXP to C52, and  $969\text{ cm}^{-1}$  EXP to C56. The two EXP peaks at  $1311$  and  $1339\text{ cm}^{-1}$  are ascribed to C71 and C72, respectively, the first involving scissors and twisting motions of  $\text{CH}_2$  groups of alendronate and the second  $\text{CH}_2$  twisting movements and C2C3C4C5 torsion (Figure S5: CLA modes at  $1346.80$  and  $1371.17\text{ cm}^{-1}$ , corresponding video files 1346\_RAMAN and 1371\_RAMAN).

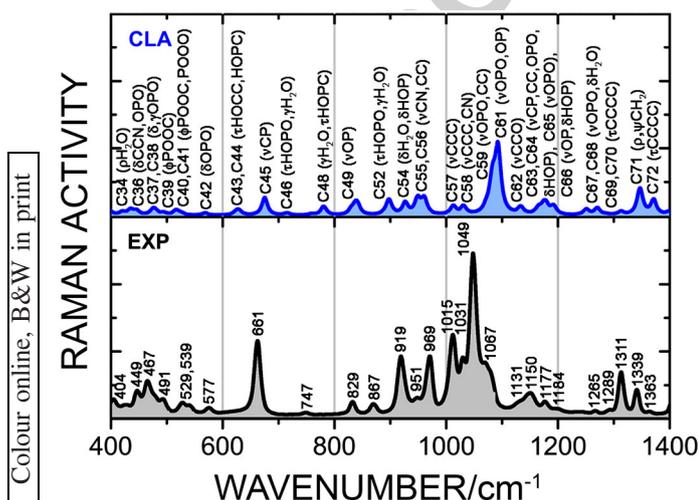
C36, C37, C39, and C40 are related to the scissors and out-of-plane motions of the phosphate groups and correspond to the experimental peaks at  $449$ ,  $467$ ,  $491$ , and  $529\text{ cm}^{-1}$ , in respective order, which belong or are near to the  $n_2\text{ PO}_4$  HAP Raman band ( $433\text{ cm}^{-1}$ ). At  $661\text{ cm}^{-1}$  in the EXP curve, we have a strong Raman line designated to C45 and involving the stretching of the P6–C5 bond, which is not very pronounced in the IR spectrum. This result can be compared to the Raman measurements of Becerril *et al.*,<sup>[31]</sup> which have studied the adsorption of fibronectin (a protein) on HAP functionalized with alendronate. In this study, a C–P stretching band was found at  $659\text{ cm}^{-1}$ , while P–O stretches were behind two Raman lines at  $968\text{ cm}^{-1}$  – and here we remark that in our results we have assigned this band to the C56 normal mode at  $961\text{ cm}^{-1}$  involving NC and CCC stretches, the nearest P–O stretch mode occurring only at  $1072\text{ cm}^{-1}$  (C59 normal mode). In contrast, the smaller peaks at  $829$  and  $867\text{ cm}^{-1}$  in the experimental Raman spectrum are associated to the C48 and C49 CLA vibrations, in respective order, the first involving a HOPC torsion and water

wagging, the latter consisting in PO bond stretches. At  $1150$ ,  $1177$ , and  $1184\text{ cm}^{-1}$ , O–P–O asymmetric stretches and scissors vibrations of HOP groups dominate (C64, C65, and C66 normal modes). Finally, small Raman maxima at  $577$  and  $747\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to C43 and C46, with the mode with smallest wavenumber corresponding to a HOCC torsion and water wagging.

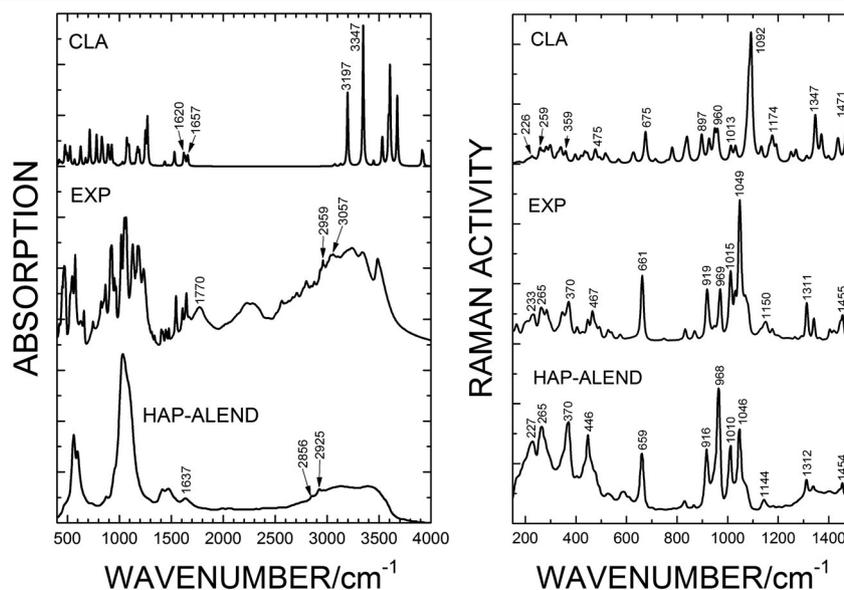
### Discussion

There is a consensus that IR and Raman spectroscopic analyses are powerful tools for establishing the key material properties contributing to bone strength and thus has helped to understand better the changes which lead to bone weakening, as explicitly stated by Paschalis *et al.*,<sup>[32]</sup> and Morris *et al.*,<sup>[33]</sup> The IR of bones has  $n_1, n_3\text{ PO}_4^{3-}$  bands related to apatite and HAP in the  $960\text{--}1143\text{ cm}^{-1}$  wavenumber range. Raman and Fourier transform IR microspectroscopy analyses were used to examine the intrinsic bone material properties in iliac crest biopsies from women with postmenopausal osteoporosis who were treated with either alendronate (ALN) or risedronate (RIS),<sup>[34]</sup> emphasizing the  $n_2\text{ PO}_4$  ( $410\text{--}460\text{ cm}^{-1}$ ) ( $n_2$  is the symmetry bending vibrational mode) and  $n_1\text{ PO}_4$  ( $930\text{--}980\text{ cm}^{-1}$ ) Raman bands. In particular, an IR spectroscopic assessment of the inflammation-mediated osteoporosis model applied to rabbit bone was reported,<sup>[35]</sup> as well as a nano-FTIR chemical mapping of minerals in biological materials.<sup>[36]</sup> A microRaman spectral study of the  $\text{PO}_4$  and  $\text{CO}_3$  vibrational modes in synthetic and biological apatites was published by Penel *et al.*,<sup>[37]</sup> On the other hand, a first principles study of the vibrational features of hydroxylapatite and type A carbonated apatite was performed by Ulian *et al.*,<sup>[38]</sup> and Raman spectroscopy was employed to investigate the interactions of bovine bone, HAP, and calcium hydrogen phosphate with the HEDP bisphosphonate,<sup>[39]</sup> being shown the feasibility of using Raman spectroscopy to distinguish between different complexes formed at the solid/solution interface. Juillard *et al.*<sup>[40]</sup> studied the molecular interactions between zoledronic acid and bone tissue by using Raman microspectroscopy, finding new and useful information on the impact of zoledronic acid on bone composition at the molecular level to understand how bisphosphonates improve bone strength. Iafisco *et al.*,<sup>[41]</sup> by the way, have carried out surface-enhanced Raman spectroscopy to assess the adsorption of myoglobin on HAP nanocrystals functionalized with alendronate, revealing that the covering of nano-HAP crystals by alendronate inhibits the adsorption of myoglobin. In another work, HAP–alendronate nanocomposites were characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR),<sup>[42]</sup> the FTIR analysis being employed to confirm the incorporation of alendronate within the composite. Pascaud *et al.*,<sup>[43]</sup> in a similar line of research, have investigated the interaction between tiludronate molecules and nanocrystalline apatite (AP), obtaining their FTIR and Raman spectra, while zoledronate incorporation in HAP nanocrystals was also detected using Raman spectroscopy by Boanini *et al.*<sup>[44]</sup>

Li *et al.*<sup>[45]</sup> have measured the IR spectrum of alendronate functionalized mesoporous HAP nanoparticles for drug delivery. Their IR absorption spectral curve (HAP–ALEND) is compared with our experimental measurements (EXP) and theoretical calculations (CLA) at the left side of Fig. 4. In particular, HAP–ALEND IR absorption peaks at  $1637$ ,  $2856$ , and  $2925\text{ cm}^{-1}$  can be related, in this order, with the EXP peaks at  $1770$ ,  $2959$ , and  $3057\text{ cm}^{-1}$ , the incorporation of alendronate to HAP shifting the alendronate IR absorption bands downwards by about  $100\text{ cm}^{-1}$  in the  $1600\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$



**Figure 3.** DFT-calculated Raman spectrum for a single alendronate molecule interacting with three water molecules and a sodium atom (CLA), and the measured Raman spectrum of the monosodium trihydrate alendronate crystal (EXP). The symbols  $\delta$ ,  $\nu$ ,  $\tau$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\gamma$ , and  $\psi$  stand for scissoring, stretching, torsion, rocking, out-of-plane, wagging, and twisting modes, respectively.



**Figure 4.** Infrared and Raman spectra of hydroxyapatite with alendronate according with the DFT calculations using a single alendronate molecule interacting with water and sodium in a geometry resembling the structure of crystalline monosodium trihydrate alendronate (CLA), experimental measurements of this work (EXP) and spectral curves obtained from references<sup>[43]</sup> and<sup>[31]</sup> respectively. Wavenumbers are sequentially matched in the Raman spectra.

wavenumber range. Besides, the CLA calculations indicate that the HAP-ALEND IR absorption maximum at  $1637\text{ cm}^{-1}$  must be assigned to one of the two normal modes at  $1620\text{ cm}^{-1}$  (C80) and  $1657\text{ cm}^{-1}$  (C83). The  $1620\text{ cm}^{-1}$  normal mode corresponds to the scissors movement of two water molecules, while the  $1657\text{ cm}^{-1}$  normal mode is assigned to  $\text{NH}_2$  scissoring (the last assignment is preferred by reference 45). The HAP-ALEND maximum at  $2856\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the CLA normal mode at  $3197\text{ cm}^{-1}$  (C91) being assigned to an OH bond stretching. Reference 45, in contrast, assigns the same absorption peak to a CH bond stretching. In fact, such assignment matches the calculated C90 mode at  $3183\text{ cm}^{-1}$ , but it just has a very small absorption intensity (1/140) in comparison with the C91 mode. Finally, the HAP-ALEND  $2925\text{ cm}^{-1}$  band resembles the C92 mode at  $3347\text{ cm}^{-1}$ , which corresponds to OH bond stretch motions, diverging once more from the CH stretch attribution proposed in the work of Li *et al.*<sup>[45]</sup> These differences are probably due to the incorporation of alendronate into the HAP matrix.

The recent Raman measurements of Becerril *et al.*<sup>[31]</sup> in the  $100\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  range for alendronate bound to apatite are shown at the right side of Fig. 4, HAP-ALEND curve. Bands at  $659$ ,  $968$ , and  $1048\text{ cm}^{-1}$  were assigned to stretchings  $n_{\text{C-P}}$ ,  $n_{\text{P-O(H)}}$ , and  $d_{\text{P-OH}}$ , respectively, and their values are very close to the EXP data (difference of  $3\text{ cm}^{-1}$  at most). Indeed, a one-to-one correspondence can be made between the HAP-ALEND Raman maxima and the EXP maxima, with the largest EXP wavenumber shift with respect to the HAP-ALEND data occurring for the HAP-ALEND normal mode at  $446\text{ cm}^{-1}$  (EXP value of  $467\text{ cm}^{-1}$ ,  $21\text{ cm}^{-1}$  larger). This peak can be assigned to the CLA wavenumber  $475\text{ cm}^{-1}$  (C38) and is related to wagging and scissors motions of the alendronate phosphate groups. Overall, HAP-ALEND Raman lines occur at wavenumbers slightly smaller (about  $-4\text{ cm}^{-1}$  average) in comparison with the respective EXP lines. The CLA Raman bands, by the way, are also shifted to smaller wavenumbers with respect to the EXP bands in the  $200\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$  range except for two bands ( $475$  and  $675\text{ cm}^{-1}$ ). Above  $1040\text{ cm}^{-1}$ , on the other hand, the CLA Raman bands are slightly shifted to higher wavenumbers in

comparison with the related EXP bands. As a matter of fact, a qualitative comparison of the Raman curves for the CLA, EXP, and HAP-ALEND data also shows that the calculated spectrum is in good agreement with the experimental data.

## Conclusion

In summary, we have presented the results of experimental measurements for the IR and Raman spectra for the MTA crystal, which is the usual formulation of alendronate for the treatment of osteoporosis. A single alendronate molecule with three water molecules and a sodium atom positioned initially in the same geometry of the crystal within a continuum water solvation model (CLA geometry) was used to perform theoretical calculations of both IR and Raman spectra. Using the CLA IR absorption curve, we were able to detect phosphate signatures in the main experimental (EXP) absorption bands: at  $1031\text{ cm}^{-1}$  (OPO stretching),  $1049\text{ cm}^{-1}$  (OPO stretching), and  $1131\text{ cm}^{-1}$  (CP stretching), as well as  $1177\text{ cm}^{-1}$  (OPO stretching), and  $1235\text{ cm}^{-1}$  (OPO stretching). However, an important set of bands near  $920\text{ cm}^{-1}$  can be ascribed to vibrations involving HOPO torsion and water wagging. Important absorption bands also occur near  $460\text{ cm}^{-1}$  and  $560\text{ cm}^{-1}$  with strong contributions from OPO scissors motion and water vibrations. In comparison with the IR data, the Raman EXP and CLA spectra are less structured, with strongest Raman activity at  $1049\text{ cm}^{-1}$  (OPO stretching), and a strong line at  $661\text{ cm}^{-1}$  (CP stretching). Other important Raman lines which seem absent or very weak in the IR spectra occur at  $449\text{ cm}^{-1}$  (NCC scissors, OPO scissors),  $969\text{ cm}^{-1}$  (NC and CCC stretching motions),  $1311\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  rocking and twisting), and  $1339\text{ cm}^{-1}$  (CCCC torsion,  $\text{CH}_2$  twisting)  $\text{cm}^{-1}$ . In comparison with experimental data available in the literature for alendronate incorporated into HAP, the measurements and calculations performed in this work suggest that, for wavenumbers below  $1500\text{ cm}^{-1}$ , the interaction of alendronate with HAP does not change significantly the alendronate vibrational spectra, while for the wavenumbers within the  $1600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  interval the interaction with HAP shifts the normal mode

wavenumbers downwards by about  $100\text{ cm}^{-1}$ . The CLA Raman spectrum in the  $100\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$  range, on the other hand, is in good qualitative agreement with the measured data.

### Acknowledgements

V.N.F., L.O.L., and P.L.-N. are senior researchers from the Brazilian National Research Council (CNPq) and would like to acknowledge the financial support received through the Brazilian Research Agencies CNPq-INCT [Nano(Bio)Simes project 573925/2008-9] and CAPES-PROCAD. E.W.S.C. received financial support from CNPq projects 307843/2013-0 and 550579/2012-5; F.A.M.S. received a Pos-Doc fellowship from CNPq-FUNCAP, project 159900/2010-7. The authors would like to acknowledge the CENAPAD-UFC computer processing time allocated for their Gaussian 09 calculations.

### References

- [1] J. A. Kanis, Assessment of osteoporosis at the primary health-care level, Technical Report. World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, Sheffield, **2007**.
- [2] L. J. Melton, E. A. Chrischilles, C. Cooper, A. W. Lane, B. L. Riggs, *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 1005–1010.
- [3] L. J. Melton, E. J. Atkinson, M. K. O'Connor, W. M. O'Fallon, B. L. Riggs, *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 1915–1923.
- [4] M. Kawai, U. I. Mödder, S. Khosla, C. J. Rosen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 141–156.
- [5] C. J. Rosen, *Cell Metab.* **2008**, *7*, 7–10.
- [6] C. J. Rosen, M. L. Bouxsein, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2006**, *2*, 35–43.
- [7] S. C. Manolagas, *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 115–137.
- [8] J. P. Jansen, G. J. D. Bergman, J. Huels, M. Olson, *Semin. Arthritis Rheum.* **2011**, *40*, 275–284.e2.
- [9] S. C. L. M. Cremers, G. C. Pillai, S. E. Papapoulos, *Clin. Pharmacokinet.* **2005**, *44*, 551–570.
- [10] S. C. L. M. Cremers, S. E. Papapoulos, *Bone* **2011**, *49*, 42–49.
- [11] M. D. Francis, R. Graham, G. Russell, H. Fleisch, *Science* **1969**, *165*, 1264–1266.
- [12] R. G. G. Russell, Z. Xia, J. E. Dunford, U. Oppermann, A. Kwaasi, P. A. Hulley, K. L. Kavanagh, J. T. Triffitt, M. W. Lundy, R. J. Phipps, B. L. Barnett, F. P. Coxon, M. J. Rogers, N. B. Watts, F. H. Ebetino, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1117*, 209–257.
- [13] P. N. de Aza, F. Guitián, C. Santos, S. de Aza, R. Cuscó, L. Artús, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 916–922.
- [14] B. Rossi, P. Verrocchio, G. Viliani, I. Mancini, G. Guella, E. Rigo, G. Scarduelli, G. Mariotto, *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40*, 453–458.
- [15] A. A. Howard, G. S. Tschumper, N. I. Hammer, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 6803–6810.
- [16] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864–B871.
- [17] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133–A1138.
- [18] R. G. Parr, Y. Weitao, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, **1989**.
- [19] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3094.
- [20] Marvin Sketch 6.1.4, <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>, **2013**.
- [21] D. Vega, R. Baggio, M. T. Garland, *Acta Cryst. C* **1996**, *52*, 2198–2201.
- [22] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Norm, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, 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, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian09 Revision D.01*, Gaussian Inc., Wallingford, **2009**.
- [23] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- [24] B. G. Johnson, M. J. Frisch, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *216*, 133–140.
- [25] B. G. Johnson, M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 7429–7442.
- [26] R. E. Stratmann, J. C. Burant, G. E. Scuseria, M. J. Frisch, *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 10175–10183.
- [27] M. H. Jamróz, Vibrational Energy Distribution Analysis VEDA 4.0, <http://smmg.pl/index.php/software/sowtware-veda.html>, **2014**.
- [28] M. H. Jamróz, *Spectrochim. Acta A* **2013**, *114*, 220–230.
- [29] M. Biczysko, P. Panek, G. Scalmani, J. Bloino, V. Barone, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2115–2125.
- [30] E. E. Zvereva, A. R. Shagidullin, S. A. Katsyuba, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 63–69.
- [31] N. V. Beceril, L. Tellez-Jurado, L. M. Rodriguez-Lorenzo, *J. Aust. Ceram. Soc.* **2013**, *49*, 112–118.
- [32] E. P. Paschalis, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469*, 2170–2178.
- [33] M. D. Morris, G. S. Mandair, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2011**, *469*, 2160–2169.
- [34] B. Hofstetter, S. Gamsjaeger, R. J. Phipps, R. R. Recker, F. H. Ebetino, K. Klaushofer, E. P. Paschalis, *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 995–1003.
- [35] N. Kourkoumelis, A. Lani, M. Tzaphlidou, *J. Biol. Phys.* **2012**, *38*, 623–635.
- [36] S. Amarie, P. Zaslansky, Y. Kajihara, E. Griesshaber, W. W. Schmahl, F. Keilmann, *Beilstein J. Nanotech.* **2012**, *3*, 312–323.
- [37] G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres, *Calcif. Tissue Int.* **1998**, *63*, 475–481.
- [38] G. Ulian, G. Valdrè, M. Corno, P. Ugliengo, *Am. Mineral.* **2013**, *98*, 752–759.
- [39] I. Cukrowski, L. Popović, W. Barnard, S. O. Paul, P. H. van Rooyen, D. C. Liles, *Bone* **2007**, *41*, 668–678.
- [40] A. Juillard, G. Falgayrac, B. Cortet, M.-H. Vieillard, N. Azaroual, J.-C. Hornez, G. Penel, *Bone* **2010**, *47*, 895–904.
- [41] M. Iafisco, B. Palazzo, G. Fallini, M. Di Foggia, S. Bonora, S. Nicolis, L. Casella, N. Roveri, *Langmuir* **2008**, *24*, 4924–4930.
- [42] D. Negrea, C. Ducu, S. Moga, V. Malinovsky, J. Neamtu, C. Ristoscu, I. N. Mihailescu, F. Cornelia, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **2010**, *12*, 1194–1199.
- [43] P. Pascaud, R. Bareille, C. Bourget, J. Amédée, C. Rey, S. Sarda, *Biomed. Mater.* **2012**, *7*, 054108.
- [44] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 15812–15818.
- [45] D. Li, Y. Zhu, Z. Liang, *Mater. Res. Bull.* **2013**, *48*, 2201–2204.

### Supporting information

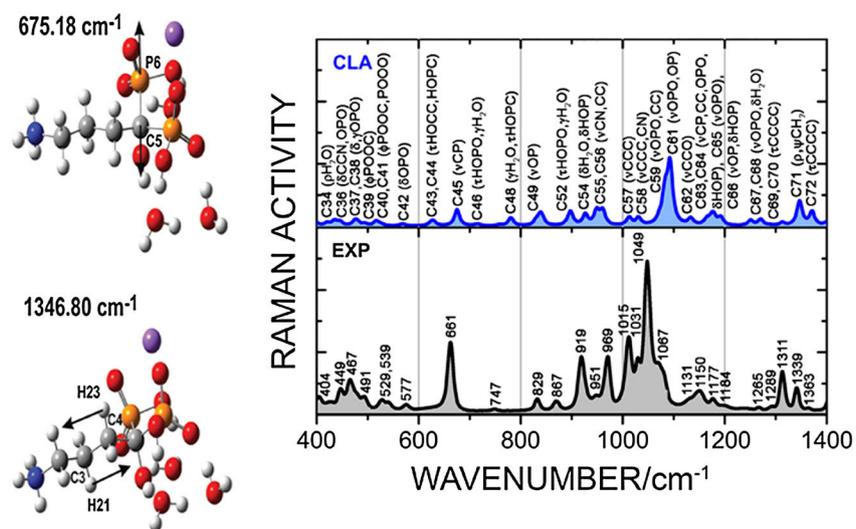
Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Q2

## Research article

### Phosphate group vibrational signatures of the osteoporosis drug alendronate

João Rufino Bezerra Neto, Pedro de Lima Neto, Francisco Adilson Matos Sales, Edelma Eieto da Silva, Luiz Orlando Ladeira, Valder Nogueira Freire and Ewerton Wagner Santos Caetano



The infrared (IR) and Raman spectra of the osteoporosis drug alendronate in the monosodium trihydrate alendronate crystal were measured. In order to interpret them, density functional theory calculations were performed for the alendronate molecule unveiling relevant phosphate group signatures in the 400–1400  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber range, especially IR absorption bands at 1015, 1049, 1067, 1131, 1177, and 1235  $\text{cm}^{-1}$  and Raman lines at 449, 661, and 969  $\text{cm}^{-1}$ .

---

## APÊNDICE E – Tabelas complementares

---

Tabela 6: Assinalamentos dos modos IR e RAMAN mais importantes para o sistema de alendronato em VAC. Número de onda  $\omega$  está  $\text{cm}^{-1}$ .

N	$\omega$	Assinalamento
V18	420.35	$\delta\text{O9P6O11}$ , $\delta\text{C4C5O8}$ , $\rho\text{C3C4C5}$ , $\phi\text{O9C5O11P6}$
V20	457.80	$\tau\text{H26O13P7C5}$ , $\delta\text{O12P7O14}$
V21	474.80	$\delta\text{C4C5O8}$ , $\delta\text{N1C2C3}$
V23	513.39	$\tau\text{H24O8C5P6}$ , $\phi\text{O12C5O13P7}$ , $\phi\text{P7C4P6C5}$
V25	549.29	$\tau\text{H24O8C5P6}$ , $\phi\text{O9C5O11P6}$ , $\phi\text{O14C5O12P7}$
V26	577.06	$\tau\text{H24O8C5P6}$
V27	622.39	$\delta\text{O12P7O14}$ , $\delta\text{O12P7O13}$
V28	791.42	$\psi\text{H22C4H23}$ , $\nu_a\text{P6C5P7}$
V30	841.35	$\nu\text{P7O13}$
V31	876.27	$\gamma\text{H20C3H21}$ , $\tau\text{H16N1C2H19}$ , $\nu\text{C2C3}$ , $\delta\text{H15O11P6}$
V32	911.98	$\nu_s\text{O10P6O11}$
V33	927.55	$\nu_s\text{O10P6O11}$ , $\nu\text{P6C5}$ , $\delta\text{H22C4C3}$ , $\delta\text{H18C2C3}$
V34	966.70	$\tau\text{H25O10P6C5}$ , $\nu_a\text{O10P6O11}$
V35	1006.36	$\nu\text{N1C2}$ , $\nu_a\text{O10P6O11}$ , $\nu\text{C3C4}$ , $\tau\text{H25O10P6C5}$
V36	1014.05	$\nu_a\text{O10P6O11}$ , $\tau\text{H25O10P6C5}$
V38	1045.98	$\nu\text{C5O8}$ , $\nu_s\text{O12P7O14}$
V39	1079.02	$\nu_s\text{O12P7O14}$ , $\delta\text{H26O13P7}$
V40	1090.38	$\delta\text{H26O13P7}$
V42	1122.32	$\nu\text{N1C2}$ , $\nu_a\text{C3C4C5}$ , $\tau\text{H15O11P6C5}$
V43	1148.28	$\tau\text{H15O11P6C5}$ , $\nu\text{N1C2}$ , $\nu\text{C3C4}$
V45	1201.25	$\delta\text{H22C4C3}$ , $\delta\text{H18C2C3}$ , $\rho\text{H15O11P6}$ , $\delta\text{H20C3C4}$
V46	1238.34	$\nu\text{P6O9}$
V47	1245.60	$\nu_a\text{O12P7O14}$ , $\nu\text{P6O9}$
V48	1278.20	$\delta\text{H22C4C3}$ , $\delta\text{H18C2C3}$ , $\tau\text{H16N1C2H18}$ , $\psi\text{H22C4H23}$
V49	1318.16	$\delta\text{H22C4C3}$ , $\delta\text{H18C2C3}$
V50	1338.51	$\gamma\text{H22C4H23}$ , $\delta\text{H15O11P6}$ , $\rho\text{H20C3C4}$
V51	1360.24	$\delta\text{H25O10P6}$

Fonte: criada pelo autor.

Tabela 7: Assinalamentos dos modos IR e RAMAN mais importantes para o sistema de alendronato em PCM. Número de onda  $\omega$  está  $\text{cm}^{-1}$ .

N	$\omega$	Assinalamento
P19	424.97	$\delta\text{O9P6O10}$ , $\delta\text{O10P6O11}$
P20	438.97	$\delta\text{O10P6O11}$ , $\delta\text{O12P7O13}$ , $\delta\text{O13P7O14}$ , $\phi\text{O12C5O13P7}$
P24	521.19	$\delta\text{O12P7O14}$ , $\delta\text{O13P7O14}$
P25	542.12	$\delta\text{O9P6O11}$
P26	636.08	$\nu_s\text{C4C5P7}$
P27	678.69	$\tau\text{H25O10P6C5}$
P28	756.86	$\tau\text{H26O13P7C5}$
P30	818.34	$\nu\text{P7O13}$
P32	848.13	$\nu_a\text{C5P6O10}$ , $\nu\text{C3C4}$
P34	947.06	$\tau\text{H22C4C3C2}$
P35	977.93	$\nu_s\text{N1C2C3}$ , $\tau\text{H16N1C2C3}$ , $\tau\text{H20C3C2N1}$
P36	990.94	$\nu_s\text{C3C4C5}$ , $\nu\text{P6O11}$ , $\nu\text{P7O14}$ , $\tau\text{H17N1C2C3}$
P37	1048.32	$\nu_s\text{O9P6O11}$ , $\nu\text{C3C4}$ , $\nu\text{P7O14}$
P38	1056.54	$\nu_s\text{O12P7O14}$
P39*	1083.80	$\nu_s\text{O9P6O11}$ , $\nu\text{P7O14}$
P41	1122.06	$\nu\text{C3C4}$ , $\nu\text{C5O8}$
P42**	1154.32	$\nu_a\text{O12P7O14}$ , $\tau\text{H15N1C2C3}$ , $\nu_a\text{O9P6O11}$
P45	1203.57	$\nu_a\text{O9P6O11}$ , $\nu\text{P7O12}$ , $\delta\text{H25O10P6}$ , $\delta\text{H26O13P7}$
P46	1207.50	$\delta\text{H25O10P6}$ , $\delta\text{H26O13P7}$ , $\nu_a\text{O12P7O14}$
P48	1275.43	$\delta\text{H25O10P6}$ , $\delta\text{H26O13P7}$ , $\nu_a\text{O12P7O14}$ , $\nu_a\text{O9P6O11}$
P49	1291.71	$\delta\text{H24O8C5}$ , $\psi\text{H20C3H21}$
P51	1353.63	$\delta\text{H18C2C3}$ , $\psi\text{H18C2H19}$ , $\delta\text{H24O8C5}$ , $\delta\text{H22C4C3}$
		(P39*) $\nu\text{C2C3}$ , $\nu\text{C3C4}$ , $\nu\text{C4C5}$ , $\nu\text{C5O8}$
		(P42*) $\nu\text{C2C3}$ , $\nu\text{C3C4}$ , $\nu\text{C4C5}$ , $\nu\text{C5O8}$

Fonte: criada pelo autor.

## Referências

- [1] SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta biomaterialia*, Acta Materialia Inc., v. 9, n. 8, p. 7591–621, ago. 2013. ISSN 1878-7568. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583646>>.
- [2] CURREY, J. D. Bones. Structure and mechanics. p. 1–380, 2002.
- [3] Väänänen, H. K. Osteoclast Function : Biology and Mechanisms RELIABLE CHARACTERIZATION FOR. p. 193–209, 2008.
- [4] TAKAHASHI, N. et al. Osteoclast Generation. p. 175–192, 1993.
- [5] SWATTON, P. J. Basic Principles. p. 1–17, ago. 2010.
- [6] BECKER, D. J.; KILGORE, M. L.; MORRISEY, M. a. The societal burden of osteoporosis. *Current rheumatology reports*, v. 12, n. 3, p. 186–91, jun. 2010. ISSN 1534-6307. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425518>>.
- [7] KAWAI, M. et al. Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration. *Nature reviews. Drug discovery*, Nature Publishing Group, v. 10, n. 2, p. 141–56, fev. 2011. ISSN 1474-1784. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3135105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- [8] JANSEN, J. P. et al. The efficacy of bisphosphonates in the prevention of vertebral, hip, and nonvertebral-nonhip fractures in osteoporosis: a network meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism*, Elsevier Inc., v. 40, n. 4, p. 275–84.e1–2, fev. 2011. ISSN 1532-866X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828791>>.
- [9] GIGER, E. V.; CASTAGNER, B.; LEROUX, J.-C. Biomedical applications of bisphosphonates. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, Elsevier B.V., v. 167, n. 2, p. 175–88, abr. 2013. ISSN 1873-4995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395668>>.
- [10] CHEN, C. et al. Modeling the interaction of seven bisphosphonates with the hydroxyapatite(100) face. *Journal of molecular modeling*, v. 18, n. 9, p. 4007–12, set. 2012. ISSN 0948-5023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22453641>>.
- [11] BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. Time Course of Zoledronate Interaction with Hydroxyapatite Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 116, n. 29, p. 15812–15818, jul. 2012. ISSN 1932-7447. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp304472s>>.

- [12] PAPAPOULOS, S. E. Bisphosphonates: how do they work? *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, Elsevier Ltd, v. 22, n. 5, p. 831–47, out. 2008. ISSN 1878-1594. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028359>>.
- [13] NANCOLLAS, G. H. et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*, v. 38, n. 5, p. 617–27, maio 2006. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046206>>.
- [14] RUSSELL, R. G. G. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*, Elsevier Inc., v. 49, n. 1, p. 2–19, jul. 2011. ISSN 1873-2763. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555003>>.
- [15] ROGERS, M. J. et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*, v. 24, n. 5 Suppl, p. 73S–79S, maio 1999. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898340>>.
- [16] DUNFORD, J. E. et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 296, n. 2, p. 235–42, fev. 2001. ISSN 0022-3565. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160603>>.
- [17] RUSSELL, R. G. G. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, v. 19, n. 6, p. 733–59, jun. 2008. ISSN 0937-941X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18214569>>.
- [18] OHNO, K. et al. Computational insights into binding of bisphosphates to farnesyl pyrophosphate synthase. *Current medicinal chemistry*, v. 18, n. 2, p. 220–33, jan. 2011. ISSN 1875-533X. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3343387&tool=pmcentrez&rendert>>.
- [19] ROSS, R. K. R. D. Binding affinity of surface functionalized gold nanoparticles to hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res Part A*, v. 99A, p. 58–66, 2011.
- [20] DEMORO, B. et al. Risedronate metal complexes potentially active against Chagas disease. *Journal of inorganic biochemistry*, Elsevier Inc., v. 104, n. 12, p. 1252–8, dez. 2010. ISSN 1873-3344. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2949467&tool=pmcentrez&rendert>>.
- [21] SZEGEZDI, J.; CSIZMADIA, F. Prediction of dissociation constant using microconstants. 1998–2011. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com/marvin>>.
- [22] VEGA, D.; BAGGIO, R.; GARLAND, M. T. Monosodium 4-Amino-1-hydroxy-1,1-butanedioldiphosphonate Trihydrate (Alendronate). *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, International Union of Crystallography, v. 52, n. 9, p. 2198–2201, set. 1996. ISSN 01082701. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0108270196006105>>.

- [23] FERNÁNDEZ, D.; VEGA, D.; ELLENA, J. a. Two members of the bisphosphonate class of drugs: a zwitterion and a molecular compound. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, v. 59, n. 6, p. o289–o292, maio 2003. ISSN 0108-2701. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0108270103007649>>.
- [24] ASNANI, M. et al. Ab Initio Structure Determination of Anhydrous Sodium Alendronate from Laboratory Powder X-Ray Diffraction Data. v. 98, n. 6, p. 2113–2121, 2009.
- [25] SEARCH, H. et al. First-principles simulation : ideas , illustrations and the CASTEP code. v. 2717, 2002.
- [26] TKATCHENKO, A.; SCHEFFLER, M. Accurate Molecular Van Der Waals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data. *Physical Review Letters*, v. 102, n. 7, p. 073005, fev. 2009. ISSN 0031-9007. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.102.073005>>.
- [27] FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 09 Revision D.01*. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [28] SUPERZEURE, E. X.; SUPERIEURE, E. X. Inhomogeneous Electron Gas. v. 155, n. 1962, 1964.
- [29] ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, v. 120, n. 1-3, p. 215–241, jul. 2007. ISSN 1432-881X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00214-007-0310-x>>.
- [30] JENSEN, F. Atomic orbital basis sets. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, v. 3, n. 3, p. 273–295, maio 2013. ISSN 17590876. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/wcms.1123>>.
- [31] TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical reviews*, v. 105, n. 8, p. 2999–3093, ago. 2005. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16092826>>.
- [32] JAMRÓZ, M. H. Vibrational energy distribution analysis (VEDA): scopes and limitations. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, v. 114, p. 220–30, out. 2013. ISSN 1873-3557. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778167>>.
- [33] PERDEW, J.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical review letters*, v. 77, n. 18, p. 3865–3868, out. 1996. ISSN 1079-7114. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10062328>>.
- [34] PERDEW, J. P.; WANG, Y. No Title. v. 45, n. 23, p. 244–249, 1992.
- [35] AIKENS, C. M.; GORDON, M. S. Incremental Solvation of Nonionized and Zwitterionic Glycine slightly different complex than the one examined by Peteanu. n. 4, p. 12835–12850, 2006.

- [36] BACHRACH, S. M. Microsolvation of glycine: a DFT study. *The journal of physical chemistry. A*, v. 112, n. 16, p. 3722–30, abr. 2008. ISSN 1520-5215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18341310>>.
- [37] IM, S. et al. Arginine zwitterion is more stable than the canonical form when solvated by a water molecule. *The journal of physical chemistry. A*, v. 112, n. 40, p. 9767–70, out. 2008. ISSN 1520-5215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778044>>.
- [38] E.P., P.; R., M.; A.L., B. Infrared assessment of bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res.*, v. 469, p. 2170—2178, 2011. ISSN 1520-5215.
- [39] BECERRIL, N. V.; TELLEZ-JURADO, L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. M. Adsorption of fibronectin on hydroxyapatite functionalized with alendronate. *Journal of the Australian Ceramic Society.*, v. 49, p. 112—118, 2013.
- [40] LANYON, L. E.; BAGGOTT, D. G. Mechanical function as an influence on the structure and form of bone. *J. Bone Joint Surg*, v. 58-B, p. 436—443, 1976.
- [41] SEEMAN, E. Chapter 1: Modeling and Remodeling. *Principles of Bone Biology, 3rd Edition*, p. 2–27, 2008.
- [42] MORGAN, E. F.; BOUXSEIN, M. L. Chapter 2: Biomechanics of Bone and Age-Related Fractures. *Principles of Bone Biology, 3rd Edition*, p. 29–51, 2008.
- [43] BONEWALD, L. F. The Osteocyte. p. 153–174, 2008.
- [44] CONFERENCE, C. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. v. 285, n. 6, 2001.
- [45] HOLROYD, C.; COOPER, C.; DENNISON, E. Epidemiology of osteoporosis. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, Elsevier Ltd, v. 22, n. 5, p. 671–85, out. 2008. ISSN 1878-1594. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028351>>.
- [46] GANDOLFI, A. et al. Fibrosarcoma Arising in Paget ' s Disease of the Vertebra : R e v i e w of the Literature. p. 72–76, 1983.
- [47] DISEASES, M. Paget ' s disease of bone : clinical , pathogenetic and therapeutic aspects. v. 11, n. 1, 1997.
- [48] Lojo Oliveira, L.; Torrijos Eslava, A. Treatment of Paget's Disease of Bone. *Reumatología Clínica (English Edition)*, v. 8, n. 4, p. 220–224, jul. 2012. ISSN 21735743. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2173574312000159>>.
- [49] DITTMER, K. E.; THOMPSON, K. G.; BLAIR, H. T. Pathology of inherited rickets in Corriedale sheep. *Journal of comparative pathology*, Elsevier Ltd, v. 141, n. 2-3, p. 147–55, 2009. ISSN 1532-3129. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19524252>>.
- [50] PAI, B.; SHAW, N. Understanding rickets. *Paediatrics and Child Health*, Elsevier Ltd, v. 21, n. 7, p. 315–321, jul. 2011. ISSN 17517222. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751722211000187>>.

- [51] FLEISCH, H. Inhibitors of calcium phosphate precipitation and their role in biological mineralization. *Journal of Crystal Growth*, v. 53, n. 1, p. 120–134, maio 1981. ISSN 00220248. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022024881900592>>.
- [52] ROELOFS, A. J. et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 25, n. 3, p. 606–16, mar. 2010. ISSN 1523-4681. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3153397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- [53] COXON, F. P. et al. Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone*, v. 42, n. 5, p. 848–60, maio 2008. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325866>>.
- [54] THOMPSON, K. et al. Cytosolic Entry of Bisphosphonate Drugs Requires Acidification of Vesicles after Fluid-Phase Endocytosis. v. 69, n. 5, p. 1624–1632, 2006.
- [55] ROGERS, M. J. et al. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *The Biochemical journal*, v. 303 ( Pt 1, p. 303–11, out. 1994. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- [56] ROGERS, M. J. et al. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*, Elsevier Inc., v. 49, n. 1, p. 34–41, jul. 2011. ISSN 1873-2763. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111853>>.
- [57] BENFORD, H. L. et al. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Molecular pharmacology*, v. 56, n. 1, p. 131–40, jul. 1999. ISSN 0026-895X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385693>>.
- [58] LUCKMAN, S. P. et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 13, n. 4, p. 581–9, abr. 1998. ISSN 0884-0431. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9556058>>.
- [59] BUHAESCU, I.; IZZEDINE, H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutic implications. *Clinical biochemistry*, v. 40, n. 9-10, p. 575–84, jun. 2007. ISSN 0009-9120. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467679>>.
- [60] BEEK, E. van et al. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 264, n. 1, p. 108–11, out. 1999. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527849>>.

- [61] FISHER, J. E. et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 1, p. 133–8, jan. 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15105&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.